

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR_S1110 Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques

THÈSE présentée par :
Margaux HEUSCHKEL

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

Discipline/ Spécialité : **Virologie / Aspects Moléculaires et Médicaux**

**Caractérisation de la Janus kinase JAK1
comme facteur d'hôte du virus de
l'hépatite D et cible antivirale**

THÈSE dirigée par :

Dr. Eloi VERRIER

HDR, CR Inserm, Inserm U1110, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Caroline GOUJON

HDR, DR Inserm, IRIM, Montpellier

Dr. Camille SUREAU

HDR, DR CNRS, Université de Tours

EXAMINATEURS :

Pr. Sylvie FOURNEL

HDR, PU, Université de Strasbourg

Dr. David DURANTEL

HDR, DR Inserm, CIRI, Lyon

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie (1867-1934)
Prix Nobel de physique et de chimie

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr. Caroline Goujon, le Pr. Sylvie Fournel, le Dr. Camille Sureau ainsi que le Dr. David Durantel pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens également à remercier le Pr. Thomas Baumert et le Dr. Catherine Schuster pour m'avoir permis d'intégrer l'Unité Inserm U1110, au sein de laquelle j'ai pu acquérir rigueur scientifique et autonomie.

Je souhaite aussi remercier mon directeur de thèse, le Dr. Eloi Verrier, pour m'avoir accueillie dans son équipe dès mon stage en première année de Master de Virologie et pour m'avoir permis de faire cette thèse. Merci pour ta confiance, ton soutien, tes encouragements et tous tes précieux conseils. Tu as réussi à me transmettre ta passion pour la recherche académique (également pour les Bo Bun) et toujours su trouver les mots pour rassurer la boule de stress que je suis. Je te suis très reconnaissante pour ces quelques années passées dans ton équipe et suis honorée d'avoir été ta première doctorante. J'espère que tu es fier du chemin parcouru.

Un grand merci au « bureau des filles » ! Merci Charlotte pour m'avoir si bien formée lorsque je suis arrivée au laboratoire, pour tous tes conseils et tes encouragements lors de ces trois années de thèse. Ta bonne humeur, ton expression fétiche « bichette » et tes petits éternuements au bureau me manqueront. Merci Laura pour toutes nos discussions, ta gentillesse et tes conseils. J'admire énormément la scientifique que tu es et la passion que tu mets dans ton travail ! Merci également Sarah pour ton précieux soutien, nos pauses-café et pour m'avoir remonté le moral dans les moments difficiles. Tu es vraiment une collègue et amie géniale ! Un grand merci aussi à ma petite Emma pour ta joie de vivre et ton aide précieuse pour la révision du papier, notamment pour les (longues) séries d'extraction ARN. Ton sourire et tes « expressions de jeunes » me manqueront. Je te souhaite plein de bonheur et d'épanouissement pour la suite. Merci également à Florine pour tous les bons moments passés ensemble et ton incroyable gentillesse. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes aventures au laboratoire. Enfin, je souhaite à Claudie pleine réussite pour sa thèse.

Merci également à Valerio pour nos discussions scientifiques, tes recommandations et les bons moments passés autour des buffets lors des congrès. Merci à Joachim pour avoir toujours été de bon conseil et pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci à Zakaria, Léa et Yogy pour nos échanges et les moments passés en réunion le vendredi matin.

Un grand merci à Émilie pour avoir répondu à mes nombreuses questions scientifiques, ton soutien et tous les bons moments passés ensemble, surtout dans les bars et sur la piste de danse. Merci également à Clara, Fabio, Nevena, Cloé, Marie, Romain, Christine et tous les autres membres de l'unité U1110, ceux déjà partis comme ceux encore sur place. Merci à Marine, Patricia, Dominique, Anne, Cinthia et Catherine C. pour tout ce que vous faites pour l'unité. Sans vous, le laboratoire ne pourrait pas tourner. Je voudrais également remercier le Dr. Julie Lucifora, pour sa patience, ses très bonnes idées et pour être venue m'apprendre à faire des expériences de RIP.

Enfin, cette aventure qui a débuté dans un contexte un peu particulier, en pleine pandémie de COVID-19, n'aurait pas pu être possible sans le soutien de ma famille et de mes amis.

Un grand merci à toi Marion pour nos longues discussions, tes conseils (notamment pour faire de superbes présentations) et pour nos sessions de sport au SUAPS. Je te suis reconnaissante de m'avoir soutenue les derniers mois de la thèse et te souhaite le meilleur pour la suite à tous les niveaux. Merci également à toi Sarah pour tous les bons moments partagés et ton soutien depuis plus de dix ans ! Depuis notre rencontre sur les bancs de la fac de médecine, j'ai toujours pu compter sur toi. Merci pour nos chouettes pauses-café et sessions shopping le samedi après-midi lorsque tu étais de retour à Strasbourg. Merci à toi Déborah, ma poulette et acolyte tout au long des études. Sans toi cette aventure n'aurait pas été la même. J'espère de tout cœur que tu pourras t'épanouir dans ta future carrière de scientifique.

J'ai aussi une pensée pour mes grands-parents qui ont toujours été présents pour m'encourager. Merci à toi Papi pour avoir cru en moi. J'aurais tellement aimé pouvoir partager jusqu'au bout cette étape de ma vie avec toi. J'espère néanmoins que de là-haut, tu es fier de ta petite-fille. Merci à ma sœur, « Clairouille l'architecte », d'avoir été ma confidente et pour ton soutien, notamment pendant les périodes de confinement. Tu pourras toujours compter sur moi. Merci à toi mon « Schätzlein » pour ton amour, ton soutien pendant cette période intense et tout ce que tu m'apportes au quotidien. Merci pour ta patience et toutes tes petites attentions qui ont rendu cette fin de thèse plus agréable. Je t'aime très fort ! Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes parents. Merci du fond du cœur pour votre soutien durant toutes ces années, d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de faire de longues études. Je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Papa, maman, je vous aime. Cette thèse, je vous la dédie.

Table des matières

INTRODUCTION	13
Le foie et les hépatites virales	14
1. Le foie : un organe vital	14
2. Les hépatites	16
3. Les hépatites virales	17
3.1 Les virus des hépatites	17
3.2 L'hépatite B chronique, un problème de santé publique mondial	19
L'hépatite D ou delta	21
1. Prévalence de l'hépatite delta dans le monde	21
2. Modes de transmission	23
3. Infection des hépatocytes par le HBV et le HDV	23
3.1 La co-infection HBV/HDV	24
3.2 La surinfection HBV/HDV chez un sujet porteur du HBV	24
3.3 Les interactions entre le HBV et le HDV	24
3.4 Les marqueurs de la double infection HBV/HDV	25
4. Prévention et traitement de l'hépatite delta	27
4.1 Les traitements préventifs.....	27
4.2 Les traitements disponibles avant 2020	28
4.2.1 Les traitements à base d'IFN- α	29
4.2.2 Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques (NUC).....	29
Le virus de l'hépatite delta	30
1. Découverte du HDV	30
2. Classification	30
3. Génotypes et distribution dans le monde	31
4. Structure des virions	32
Organisation et expression du génome du HDV	33
1. Les différentes formes d'ARN du HDV	33
1.1 L'ARN génomique.....	33
1.2 L'ARN antigénomique	33
1.3 L'ARNm.....	33
2. Mécanisme de la réplication de l'ARN du HDV	34
3. Les deux isoformes de l'antigène delta	36
3.1 Caractéristiques et fonctions des antigènes delta	36
3.2 Modifications post-traductionnelles des antigènes delta	37

Le cycle de multiplication du HDV	38
1. Attachement et entrée	39
2. Transport intracellulaire	40
3. Transcription et traduction	40
4. Réplication virale	40
5. Assemblage des nouveaux virions	41
6. Sécrétion des nouvelles particules virales	42
Modèles d'étude de l'entrée et de l'infection par le HDV	43
1. Résumé	43
2. Publication.....	43
Infection par le HDV et réponse antivirale innée	54
1. Activation des voies de signalisation impliquées dans la défense antivirale innée	54
2. Les interférons (IFN).....	55
3. Les voies de signalisation JAK/STAT	56
3.1 Activation de STAT1 et STAT3 par les IFN	57
3.2 Activation de STAT3 par l'IL-6	57
3.3 Interférences des voies JAK/STAT avec d'autres voies de signalisation.....	58
4. Les kinases JAK	58
4.1 Structure des protéines JAK.....	58
4.2 La kinase JAK1.....	59
4.3 Potentiel thérapeutique associé à l'inhibition des JAK	60
4.4 Classification des inhibiteurs de JAK.....	60
4.4.1 Les inhibiteurs réversibles	61
4.4.2 Les inhibiteurs irréversibles	62
4.5 Inhibiteurs de JAK utilisés en clinique	62
4.5.1 L'upadacitinib	62
4.5.2 Le filgotinib.....	63
4.5.3 L'oclacitinib.....	63
4.5.4 Le fedratinib	63
5. Interactions entre le HDV et l'immunité innée.....	63
Nouvelles stratégies antivirales en cours de développement.....	67
1. Le bulevirtide.....	67
2. Les polymères d'acides nucléiques (NAP).....	68
3. Les traitements à base d'IFN-λ	69
4. Le lonafarnib	69
Objectifs de la thèse	71

MATÉRIELS ET MÉTHODES	73
1. Plasmides	74
2. Réactifs	74
3. Lignées cellulaires et cellules primaires	75
4. Production du HDV, HBV, HCV et SARS-CoV-2	75
5. Caractérisation des particules produites par les Huh7-2C8D	76
6. Co-immunoprécipitation MOV10/HDAg	76
7. Baisse de l'expression de <i>JAK1</i> en utilisant de petits ARN interférents	76
8. Baisse de l'expression de <i>STAT3</i> en utilisant de petits ARN interférents	77
9. Établissement d'une lignée KO pour <i>JAK1</i> et de différentes lignées dérivées	77
10. Contrôle de l'expression de gènes par RT-qPCR	78
11. Infection avec le HDV	78
12. Infection avec le HBV, le HCV ou le SARS-CoV-2	79
13. Mesure de la viabilité cellulaire	80
14. Détection de l'expression des protéines par <i>Western blot</i>	80
15. Impact du KO de <i>JAK1</i> sur l'entrée du virus dans la cellule	81
16. Traitements combinant IFN-α-2a et inhibiteurs de <i>JAK1</i>	82
17. Inhibition de <i>JAK1</i> et interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II	82
18. Impact de l'activité kinase de <i>JAK1</i> et de l'infection par le HDV sur la phosphorylation de <i>STAT1</i> et <i>STAT3</i>	83
19. Analyse de la phosphorylation de l'antigène delta	83
20. Activité kinase de <i>JAK1</i> sur la phosphorylation de <i>MAPK</i>	83
21. Analyse et présentation des données	84
RÉSULTATS	85
Production de particules du HDV recombinantes	86
1. Objectifs	86
2. Génération de la lignée cellulaire Huh7-2C8D	86
3. Caractérisation de la lignée cellulaire Huh7-2C8D	86
Caractérisation de <i>JAK1</i> comme facteur d'hôte du HDV et cible antivirale	89
1. Objectifs	89
2. Validation des résultats du criblage primaire	89
2.1 Expériences de perte de fonction dans les cellules Huh7-NTCP	89
2.2 Expériences de perte de fonction dans les PHH	91
3. Étude des interactions entre le HDV et <i>JAK1</i>	92
3.1 Production d'une lignée cellulaire KO pour <i>JAK1</i>	92

3.2	Restauration de l'expression de JAK1 dans les cellules KO et surexpression de mutants fonctionnels de JAK1	94
3.3	Effets du KO de <i>JAK1</i> sur la sensibilité à l'infection par le HDV.....	96
4.	Caractérisation du potentiel de JAK1 comme cible antivirale	98
4.1	Effets des inhibiteurs de JAK sur l'infection par le HDV	98
4.1.1	Utilisation des inhibiteurs dans les cellules Huh7-NTCP	98
4.1.2	Étude de la spécificité de l'activité antivirale de l'upadacitinib.....	101
4.1.3	Validation de l'activité antivirale des inhibiteurs de JAK1 dans les PHH	101
4.2	Effets de l'upadacitinib dans d'autres modèles infectieux	102
5.	Étude du mécanisme d'action de JAK1 sur le HDV.....	103
5.1	Activité provirale de JAK1 et STAT3	103
5.1	Activité provirale de JAK1 et réponse immunitaire induite par le HDV	105
5.2	Activité provirale de JAK1 et modulation de la phosphorylation de l'antigène delta.	109
5.2.1	Effet de l'inhibition de JAK1 sur la phosphorylation de S-HDAg.....	109
5.2.2	Effet de l'inhibition de JAK1 sur l'activité d'autres kinases cellulaires	111
5.2.3	Validation de l'importance de JAK1 pour la phosphorylation de ERK1/2.....	112
5.3	Inhibition de JAK1 et interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II	113
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	115
	BIBLIOGRAPHIE	126
	Annexe 1	152
	Annexe 2	165
	Annexe 3	179

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Structure d'un lobule hépatique.....	15
Figure 2 : Prévalence du virus de l'hépatite B dans le monde chez les patients atteints de cirrhose	19
Figure 3 : Représentation schématique de l'évolution de l'hépatite D chronique	21
Figure 4 : Séroprévalence du virus de l'hépatite D dans le monde parmi la population HBsAg positive	22
Figure 5 : Histoire naturelle de la co-infection ou de la surinfection HBV/HDV	23
Figure 6 : Évolution des marqueurs de la double infection HBV/HDV au cours du temps. ..	27
Figure 7 : Répartition géographique des différents génotypes du HDV	31
Figure 8 : Représentation schématique de la structure du HBV et du HDV	32
Figure 9 : Représentation schématique de l'expression du génome du HDV	34
Figure 10 : Représentation schématique de la réplication en cercle roulant du HDV.....	35
Figure 11 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels des deux isoformes de l'antigène delta.	36
Figure 12 : Modèle du cycle réplicatif du HDV dans un hépatocyte également infecté par le HBV.....	38
Figure 13 : Voies de signalisation activées suite à la détection des ARN viraux par les RLR et les TLR.....	55
Figure 14 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels des protéines JAK	59
Figure 15 : Représentation schématique de la réponse immunitaire innée induite par le HDV	66
Figure 16 : Caractérisation de la lignée Huh7-2C8D	87
Figure 17 : Infection de cellules Huh7-NTCP avec le surnageant des cellules Huh7-2C8D	87
Figure 18 : L'antigène delta interagit avec MOV10 dans les cellules Huh7-2C8D.....	88
Figure 19 : La diminution de l'expression de JAK1 est associée à une baisse de l'infection par le HDV	90
Figure 20 : La diminution de l'expression de JAK1 affecte l'infection du HDV après l'entrée virale	91
Figure 21 : La baisse d'expression de JAK1 inhibe l'infection par le HDV dans les PHH	92
Figure 22 : Étude des effets du KO de YBX1 sur l'infection par le HDV dans les cellules Huh7-NTCP.	93
Figure 23 : Génération de clones Huh7-NTCP-JAK1-KO.....	93
Figure 24 : JAK1 est un facteur d'hôte du HDV	95
Figure 25 : Le KO de JAK1 n'affecte pas l'entrée virale	97

Figure 26 : L'upadacitinib inhibe l'infection par le HDV.	98
Figure 27 : Activité antivirale de l'upadacitinib	99
Figure 28 : Le filgotinib et l'oclacitinib inhibent également la réplication du HDV	100
Figure 29 : Absence d'effet antiviral additif de l'upadacitinib dans les cellules KO pour JAK1	101
Figure 30 : Activité antivirale des inhibiteurs de JAK1 dans les PHH	102
Figure 31 : Spécificité de l'activité antivirale de l'upadacitinib	102
Figure 32 : La baisse de l'expression de STAT3 affecte également l'infection par le HDV.	104
Figure 33 : Traitement des cellules KO pour JAK1 avec de l'IL-6.....	105
Figure 34 : Analyse de l'expression de STAT3 et pSTAT3 à la suite d'une infection par le HDV	106
Figure 35 : Expression d'ISG dans des cellules infectées par le HDV	107
Figure 36 : La baisse de l'expression de JAK1 inhibe l'infection par le HDV dans les cellules HepG2-NTCP.....	107
Figure 37 : L'activité provirale de JAK1 n'est pas associée à la réponse immunitaire innée induite par le HDV	108
Figure 38 : L'activité provirale de JAK1 est associée à une modulation de la phosphorylation de S-HDAg.....	110
Figure 39 : Effet de l'inhibition de JAK1 sur l'activité d'autres kinases cellulaires	111
Figure 40 : JAK1 est impliquée dans la phosphorylation de ERK1/2.....	112
Figure 41 : La déplétion de JAK1 inhibe l'interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II	113
Figure 42 : Effets d'un traitement combinant de l'IFN- α et un inhibiteur de JAK1 sur l'infection par le HDV	121
Figure 43 : Effets des inhibiteurs de JAK1 dans des cellules co-infectées avec le HBV et le HDV	122

Tableau 1 : Comparaison des principaux virus responsables d'hépatites virales..... 18

Tableau 2 : Principales caractéristiques des molécules actives contre le HDV..... 70

Liste des abréviations

ADAR1 : *adenosine deaminase acting on RNA 1*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNccc : *covalently closed circular DNA*

AGL : *antigenic loop*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ATG5 : *autophagy related 5*

BAZ2B : *bromodomain-associated to zinc finger protein 2B*

BSA : *bovine serum albumin solution*

CAD : *carbamoyl-phosphate synthetase II/asoartate*

transcarbamylas/dihydroorotase

CARD : *caspase activation and recruitment domain*

Cas9 : *CRISPR associated protein 9*

CKII : caséine kinase II

CLIA : *chemiluminescent immunoassay*

CMV : Cytomégalovirus

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phénylindole

DDX60 : *DExD/H-Box helicase 60*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNEV : virus de la Dengue

EBV : *Epstein-Barr virus*

EGFR : *epithelial growth factor receptor*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMA : Agence Européenne des Médicaments

ERK1/2 : *extracellular signal-regulated kinases*

ESR1 : récepteur alpha des œstrogènes

EZH2 : *enhancer of zeste homolog 2*

FAM/VIC : *5'-Carboxyfluorescein*

FDA : *Food and Drug Administration*

FERM : *4,1 protein ezrin radixinmoesin*

GAPDH : *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GAS : *interferon-gamma-activated sequence*

GEq : *genome equivalent*

HAV : *Hepatovirus A*

HBsAg : antigènes de surface du HBV

HBV : *Hepatitis B virus*

HCC : hépatocarcinome

HCV : *Hepacivirus C virus*

HDAg : antigène delta

HDV : *Hepatitis D virus*

HEV : *Hepatitis E virus*

HLA : *human leukocyte antigen*

HSPG : protéoglycanes à héparane sulfate

HSV : *Herpes simplex virus*

HTLV : virus T-lymphotrope humain

ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IFN : interférons

IFNAR : *interferon alpha and beta receptor subunit*

IFNLR1 : *interferon lambda receptor 1*

IL : interleukines

IL10R : *interleukine 10 receptor*

IRF : *interferon regulatory factor*

ISG : *interferon stimulated gene*

ISRE : *IFN-sensitive response element*

JAK : *janus kinase*

JH : *JAK homology*

JNK : *Jun N-terminal kinase*

KD : *knock-down*

kDa : kilodalton

KO : *knock-out*

LGP2 : *laboratory of genetics and physiology 2*

M : mole

MAPK : *mitogen-activated protein kinases*

MAVS : *mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA5 : *melanoma differentiation associated gene 5*

MxA : *Myxovirus resistance gene A*

NES : *nuclear export signal*

NFκB : *nuclear factor-kappa B*

NLS : *nuclear localization sequence*

NTCP : *sodium-taurocholate co-transporting polypeptid*

NUC : analogues de nucléosides

OAS1 : *2'-5'-oligoadénylate synthétase 1*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

ORF : *open reading frame*

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*

PBS : *phosphate-buffered saline*

PEG : polyéthylène glycol

PFA : paraformaldéhyde

PHH : hépatocytes primaires humains

PIAS : *protein inhibitor of activated STAT*

PIC : complexe de pré-initiation de la transcription

PKR : protéine kinase R

PRMT1 : protéine arginine méthyltransférase 1

PRR : *pattern recognition receptors*

PTP : *protein tyrosine phosphatase*

RIA : *radioimmunoassay*

RIG-I : *retinoic-acid-inducible gene I*

RIP : *RNA immunoprecipitation assay*

RLR : *RIG-I like receptors*

RNP : ribonucléoprotéine

RSAD2 : *radical S-adenosyl methionine domain containing 2*

RT-qPCR : *real-time quantitative polymerase chain reaction*

siRNA : *small interfering RNA*

SLC10A1 : *solute carrier family 10 member 1*

SOCS : *suppressor of cytokine signaling*

STAT : *signal transducer and activators of transcription*

SUMO1 : *small ubiquitin-related modifier 1*

TBS : *tris-buffered saline*

TLR : *toll-like receptor*

TRIM22 : *tripartite motif containing 22*

VAS : *Virus Assembly Signal*

VZV : *Varicella-Zoster virus*

YBX1 : *Y-box binding protein 1*

YY1 : *yin yang 1*

ZIKV : virus Zika

INTRODUCTION

Le foie et les hépatites virales

1. Le foie : un organe vital

Le foie est l'un des organes les plus complexes de l'organisme et celui qui effectue le plus grand nombre de transformations chimiques. Appartenant au système digestif, il s'agit de l'organe le plus volumineux chez l'adulte avec un poids d'environ 1,5 kg. Il est fortement vascularisé, ce qui lui confère une couleur rouge foncé. En outre, cet organe est traversé par un litre et demi de sang chaque minute. De forme ovoïde, il est situé sous le diaphragme dans la partie supérieure droite de l'abdomen et se compose de deux lobes principaux, eux-mêmes divisés en plusieurs segments (revu dans Abdel-Misih and Bloomston, 2010 ; Kalra *et al.*, 2023).

Le foie est un organe vital impliqué dans plus de 300 fonctions essentielles à la vie. En effet, il joue un rôle clé dans la régulation du glucose dans le sang, dans le métabolisme des protéines (synthèse de l'albumine et du cholestérol), des graisses (stockage du glycogène, des acides gras, du fer), des facteurs de coagulation sanguine et de certains médicaments. Cet organe est également impliqué dans la synthèse de nombreuses substances dont la bile, un liquide nécessaire à l'absorption des graisses et de certaines vitamines (Kalra *et al.*, 2023).

Pour remplir toutes ces fonctions, le foie est alimenté par un double système d'irrigation sanguine : d'une part l'artère hépatique qui approvisionne le foie en sang riche en oxygène, d'autre part la veine porte qui draine le sang riche en substances nutritives provenant de l'estomac et des intestins (revu dans Si-Tayeb, Lemaigre and Duncan, 2010).

Le foie se compose à 80 % de cellules hépatiques appelées hépatocytes, qui sont organisés en travées autour des capillaires sinusoides. Ces derniers constituent de véritables usines biochimiques, assurant de nombreuses fonctions métaboliques telles que le stockage ou la libération du glucose, la dégradation de l'hémoglobine, la sécrétion de la bile, la synthèse du cholestérol et de l'albumine. D'autres types cellulaires sont également retrouvés tels que :

- Les cellules endothéliales : elles bordent les vaisseaux sanguins et favorisent les échanges entre le sang et les hépatocytes ;
- Les cellules de Küppfer : elles constituent les premières cellules immunitaires du foie et forment la plus grande population de macrophages résidants dans les tissus de l'organisme ;

- Les cellules stellaires hépatiques : elles assurent une fonction de stockage de la vitamine A. En situation pathologique, elles synthétisent de la matrice extracellulaire induisant un processus inflammatoire ou fibrotique ;
- Les cholangiocytes : il s'agit de cellules qui tapissent les canaux biliaires permettant l'écoulement de la bile jusque dans le duodénum ;
- Les lymphocytes hépatocytaires : ces cellules jouent un rôle majeur dans le système immunitaire ;
- Les cellules ovales : ces dernières possèdent la capacité de se différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires et constituent une voie de secours pour la régénération du foie lorsque la capacité de prolifération des hépatocytes est altérée (Ding *et al.*, 2016).

Les cellules hépatiques sont regroupées à l'intérieur du foie en lobules hépatiques qui forment l'unité fonctionnelle du foie (**Figure 1**). Ces lobules sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif formant l'espace-porte ou espace de Kiernan, un endroit où cheminent les vaisseaux ainsi que les canaux biliaires intrahépatiques (revu dans Si-Tayeb, Lemaigre and Duncan, 2010).

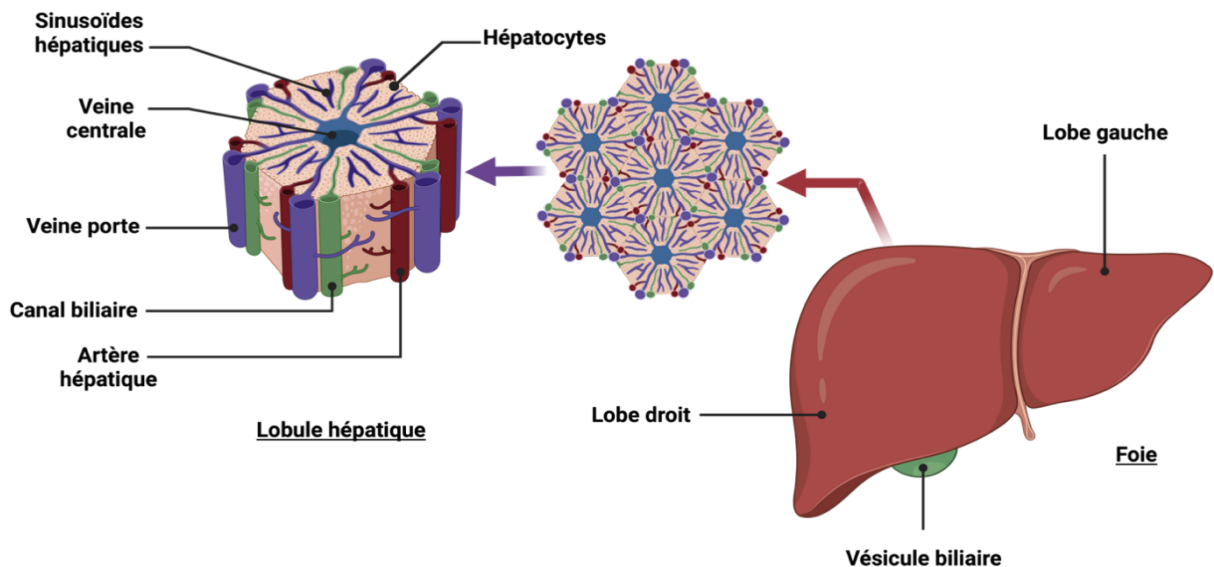


Figure 1 : Structure d'un lobule hépatique. Le foie est un organe composé de millions de lobules hépatiques. Au centre de chaque lobule se trouve une veine centrale chargée de collecter le sang qui quitte le lobule. Entre les différents lobules circulent à la fois des vaisseaux sanguins qui alimentent les lobules et collectent les substances qu'ils produisent mais aussi les canaux biliaires chargés de collecter la bile produite (figure adaptée du modèle représentant la structure d'un lobule hépatique sur BioRender.com).

2. Les hépatites

Une hépatite désigne une lésion inflammatoire aiguë ou chronique du foie associée à une altération plus ou moins dégénérative des cellules hépatiques. L'inflammation peut évoluer vers le stade de la fibrose, puis de la cirrhose et enfin de l'hépatocarcinome (HCC). Dans les cas les plus graves, l'hépatite peut entraîner la destruction du foie et, en l'absence de transplantation hépatique, la mort du patient (hépatite fulminante). Les hépatites peuvent avoir plusieurs origines (revu dans Bernal and Wendon, 2013). On distingue notamment :

- L'hépatite toxique et médicamenteuse : certaines substances telles que l' α -amanitine, des solvants, des médicaments comme le paracétamol (à forte dose) ou l'atorvastatine, un hypolipidémiant qui permet d'abaisser le taux de cholestérol et de triglycérides circulant dans le sang, peuvent provoquer une destruction importante du foie ;
- L'hépatite aiguë alcoolique : il s'agit d'une affection grave qui entraîne une mort cellulaire brutale plus ou moins étendue en raison d'une consommation abusive d'alcool ;
- L'hépatite aiguë bactérienne ou parasitaire : ce type d'hépatite peut survenir à la suite de maladies telles que la brucellose, la tuberculose ou la leptospirose qui sont causées par des bactéries ou encore la bilharziose due à un vers hématophage ;
- L'hépatite auto-immune : cette maladie inflammatoire chronique se caractérise par la présence d'auto-anticorps qui vont reconnaître des antigènes anormaux présents à la surface des hépatocytes (*human leucocyte antigen* ou HLA II), entraînant ainsi la destruction du foie ;
- L'hépatite virale : l'inflammation du foie est la conséquence d'une infection virale. Plusieurs virus, dont les modes de transmission ainsi que les conséquences sur la santé diffèrent, peuvent en être à l'origine.

La physiopathologie des maladies hépatiques est dépendante de leur étiologie. Si la plupart des hépatites sont asymptomatiques, entraînant ainsi un développement silencieux de la maladie sur plusieurs années et retardant le diagnostic, il existe toutefois un certain nombre de symptômes fréquents et non spécifiques retrouvés chez les malades tels que des nausées, une fatigue chronique, de la fièvre, une perte d'appétit ou des urines foncées. L'ictère ou jaunisse, c'est-à-dire la coloration en jaune de la peau et des muqueuses résultant d'une accumulation de bilirubine, est caractéristique mais non spécifique de cette pathologie. Malheureusement, il existe à l'heure actuelle peu de traitements curatifs en cas de maladie hépatique chronique. Très souvent, seule une transplantation hépatique permet la survie du malade (Chung *et al.*, 2012).

3. Les hépatites virales

Les maladies virales qui ciblent le foie sont à l'origine d'épidémies depuis l'Antiquité et constituent un véritable défi de santé publique. En effet, des foyers ont été documentés en Chine il y a 5000 ans et des descriptions de symptômes similaires à ceux de la jaunisse ont été rapportées par Hippocrate sur l'île de Thassos au cinquième siècle avant J.-C (Martin, 2003 ; Fonseca, 2010). Les avancées technologiques réalisées au cours des dernières années ont permis d'identifier les agents viraux à l'origine de ces maladies, suscitant l'intérêt de la communauté scientifique pour comprendre la façon dont elles se propagent et se développent afin de mettre au point des méthodes de diagnostic, des traitements et d'identifier les populations touchées (revu dans Castaneda *et al.*, 2021).

3.1 Les virus des hépatites

Les hépatites virales sont majoritairement causées par cinq virus hépatotropes nommés virus de l'hépatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV) et E (HEV) (**Tableau 1**). En particulier, les types B et C entraînent une maladie chronique chez plusieurs millions de personnes dans le monde et constituent, à eux deux, la cause la plus fréquente de cirrhose et de cancer du foie (OMS 2016).

En effet, les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont révélé que 354 millions de personnes dans le monde étaient atteintes d'hépatite B ou C chronique en 2019. De plus, il y aurait près d'un million de décès chaque année à la suite de complications associées aux hépatites virales chroniques, le plus souvent un cancer du foie (OMS 2019).

La pathogénèse des différents virus hépatiques a été beaucoup étudiée au cours des dernières années. Bien que la majorité d'entre eux soient dominants dans certaines parties du monde, l'accélération de la mondialisation exige une compréhension fine de chaque virus, puisque nous sommes tous susceptibles de rencontrer l'un d'entre eux au cours de notre vie. Grâce aux avancées scientifiques, il est désormais possible de maîtriser, voire de guérir certaines de ces infections en mettant l'accent sur la prévention par le biais de la vaccination.

Une journée mondiale contre l'hépatite a par ailleurs été instaurée l'OMS et est célébrée chaque année le 28 juillet. Elle a pour objectif de sensibiliser le public au problème de l'hépatite virale afin d'attirer son attention sur les moyens de lutte et de prévention disponibles pour la combattre. Lors de la Journée mondiale contre l'hépatite 2022, l'OMS a mis l'accent sur le thème « **Rendre la prise en charge de l'hépatite plus accessible** » et appelle à simplifier les services de prévention en rendant les soins plus accessibles aux communautés. L'OMS souhaite également parvenir à l'élimination de l'hépatite d'ici à 2030 en fixant les objectifs

ambitieux de réduire de 90 % le nombre de nouvelles infections par les virus de l'hépatite B et C et de 65 % le nombre de décès dus à l'hépatite (OMS 2016). Dans ce contexte, de nombreuses avancées dans le domaine des hépatites virales chroniques, particulièrement sur le HBV et le HDV, sont encore nécessaires.






	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
					
Famille	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Kolmioviridae</i>	<i>Hepeviridae</i>
Génome	ARN+	ADN db	ARN+	ARN-	ARN+
Mode de transmission	Orofécale	Parentérale Sexuelle	Parentérale	Parentérale Sexuelle	Orofécale
Chronicité	Non	5 %	60-80 %	15-20 %	Possible

Tableau 1 : Comparaison des principaux virus responsables d'hépatites virales. Famille, organisation génomique, mode de transmission et évolution de la maladie vers une forme chronique lors d'une infection par le virus de l'hépatite A, B, C, D et E.

En plus des cinq virus majeurs mentionnés ci-dessus, les hépatites virales peuvent aussi être causées par des virus non alphabétiques tels que le virus Epstein Barr (EBV), de la fièvre jaune, Ebola, Marburg, de la fièvre de Lassa ainsi que de la fièvre de la vallée du Rift. Ces hépatites sont alors rarement symptomatiques chez les individus immunocompétents et surviennent majoritairement chez des sujets immunodéprimés. D'autres virus comme le virus de l'herpès simplex (HSV), le cytomégalovirus (CMV) ou encore le virus de la rubéole sont responsables d'une maladie fréquemment associée à une atteinte du foie lorsqu'elle est acquise à la naissance ou de façon congénitale (revu dans L. Méheut, 2022). L'état immunitaire, l'âge et la présence de maladies associées chez l'hôte déterminent les caractéristiques de l'infection qui, dans les cas les plus graves, peuvent conduire à une hépatite fulminante. Au cours des dernières années, l'essor des transplantations d'organes ainsi que des états d'immunodépression induits par certains traitements, expliquent un regain d'intérêt pour ces hépatites.

3.2 L'hépatite B chronique, un problème de santé publique mondial

L'infection chronique du foie par le HBV touche 296 millions de personnes dans le monde, avec la plus grande proportion de cas en Chine, en Asie du Sud-Est et en Afrique (68 %). La prévalence la plus faible se trouve en Amérique du Nord (**Figure 2**). En 2019, l'hépatite B a entraîné le décès d'environ 820 000 personnes, principalement par cirrhose ou par cancer du foie (OMS 2020). Au total, dix génotypes et 35 sous-génotypes différents ont été identifiés. Leur répartition varie très largement dans le monde (Velkov *et al.*, 2018).

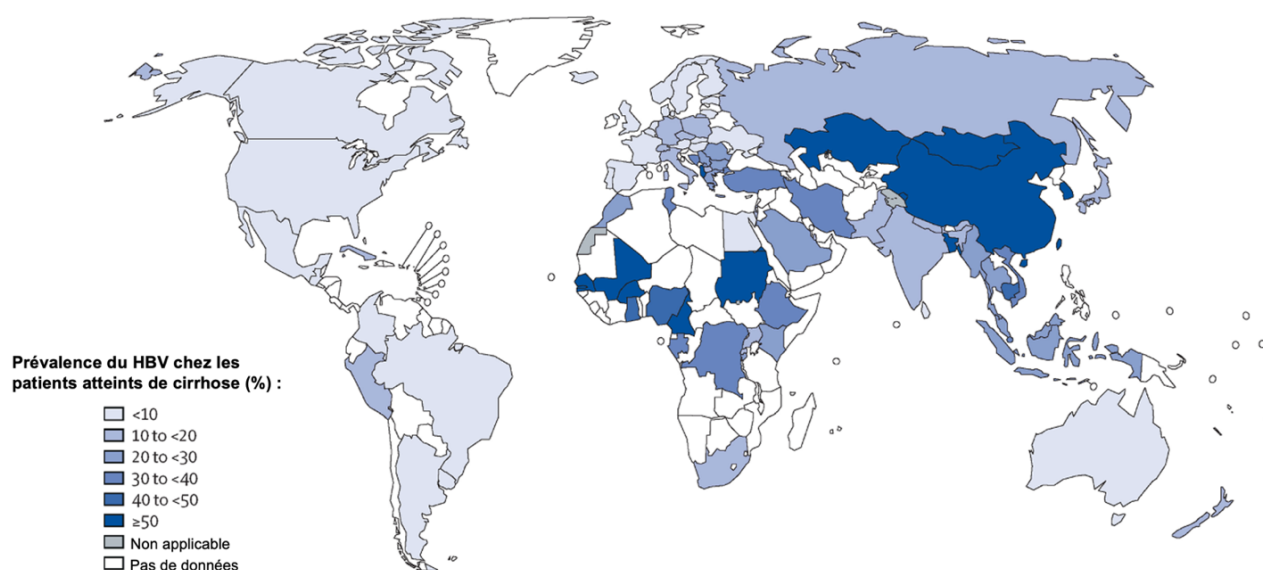


Figure 2 : Prévalence du virus de l'hépatite B dans le monde chez les patients atteints de cirrhose. Les infections par le HBV sont inégalement réparties dans le monde (variations de bleu) avec des zones de forte prévalence situées en Asie du Sud-Est et en Afrique ou des zones de faible prévalence localisées notamment en Amérique du Nord (figure adaptée de Alberts *et al.*, 2022).

L'agent responsable de l'hépatite B, le HBV, est un virus à ADN bicaténaire appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* (**Tableau 1**). Il se transmet le plus souvent de la mère à l'enfant lors de l'accouchement, par contact avec du sang ou d'autres liquides biologiques lors de rapports sexuels avec un partenaire infecté ou lors de l'utilisation de matériel tranchant contaminé (revu dans Castaneda *et al.*, 2021).

Chez l'adulte, une infection par le HBV entraîne une hépatite chronique dans moins de 5 % des cas, alors que chez les nourrissons et les jeunes enfants, elle est associée au développement d'une forme chronique dans 95 % des cas.

Depuis plusieurs décennies, un vaccin préventif contre l'hépatite B est disponible. Toutefois, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif pour les personnes ayant été infectées par le HBV.

Les antiviraux actuels comme le ténofovir ou l'entécavir à base d'analogues de nucléos(t)ides (NUC, pour *nucleos(t)ide analogs*) ciblent directement l'activité de transcriptase inverse de la polymérase virale, permettant ainsi de ralentir la progression de la cirrhose et d'abaisser l'incidence des cancers du foie. Néanmoins, ces traitements doivent être suivis tout au long de la vie et possèdent une efficacité variable.

Dans ce contexte, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire afin d'éradiquer l'hépatite B dans le monde (revu dans Castaneda *et al.*, 2021).

L'hépatite D ou delta

L'hépatite D ou delta est une maladie inflammatoire aiguë ou chronique du foie causée par le HDV, un petit virus satellite du HBV. En effet, le HDV possède un génome qui ne code pas pour ses propres protéines d'enveloppe et est ainsi dépendant de l'expression des antigènes de surface du HBV (HBsAg) pour l'achèvement de son cycle de multiplication et la sécrétion de particules virales infectieuses. L'hépatite D est donc toujours le résultat, soit d'une co-infection du foie par le HBV et le HDV, soit d'une surinfection HDV/HBV chez des patients chroniquement infectés par le HBV (revu dans Mentha *et al.*, 2019).

L'hépatite D est considérée comme la forme la plus grave et la plus sévère des hépatites virales chroniques (**Figure 3**), notamment en raison du risque élevé d'hépatite fulminante (entre 15-20 % des cas de surinfection), de l'évolution rapide de l'atteinte hépatique vers le stade de la cirrhose ainsi que de l'incidence, trois fois plus élevée, de développer un HCC par rapport à l'hépatite B chronique seule, déjà première cause de HCC dans le monde (Fattovich *et al.*, 2000 ; Sureau and Negro, 2016).

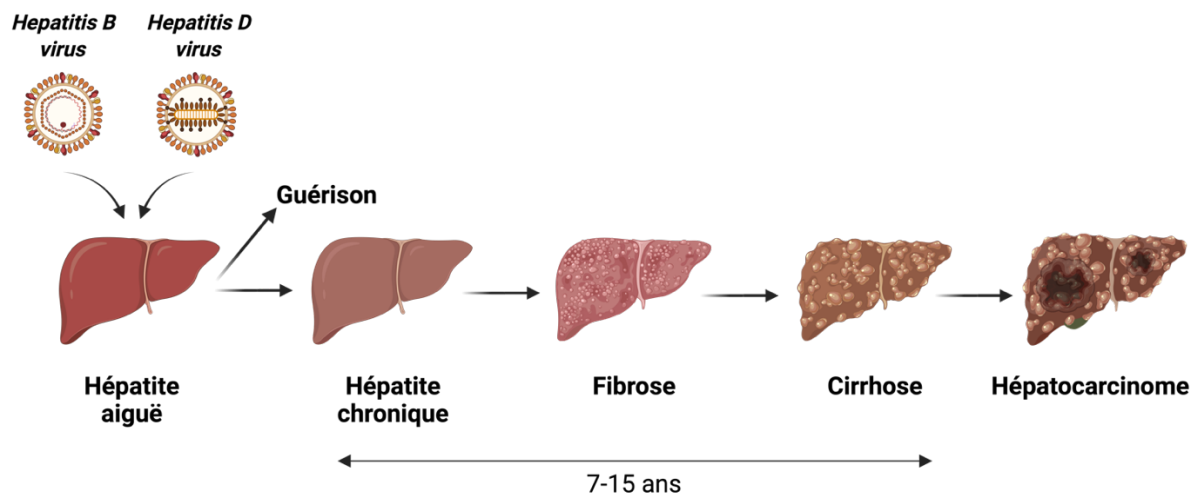


Figure 3 : Représentation schématique de l'évolution de l'hépatite D chronique. La double infection du foie par le HBV et le HDV peut entraîner une hépatite D chronique qui peut alors évoluer au cours du temps vers le stade de la fibrose, de la cirrhose et enfin de l'hépatocarcinome (HCC). En comparaison de l'hépatite B chronique seule, l'évolution de la maladie vers la cirrhose est plus rapide et le risque de mortalité plus élevé. De plus, le risque de développer un HCC est augmenté de trois fois (figure inspirée de Miao *et al.*, 2020).

1. Prévalence de l'hépatite delta dans le monde

L'hépatite delta est une maladie qui touche environ 5 % des 300 millions de personnes chroniquement infectées par le HBV, soit 12 millions d'individus dans le monde (revu dans

Schweitzer *et al.*, 2015 ; Wedemeyer and Negro, 2019). Cependant, en raison des limitations et de la fiabilité des données épidémiologiques, il est très probable que ce nombre soit sous-estimé. De récentes méta-analyses ont d'ailleurs suggéré un total bien plus élevé de 50 à 72 millions d'individus chroniquement infectés par le HDV dans le monde (Chen *et al.*, 2019).

La prévalence de l'infection par le HDV est variable selon les régions (**Figure 4**) et se superpose à celle de l'infection par le HBV. Les zones de forte prévalence comprennent certains pays d'Afrique (Mauritanie, République de centre Afrique) (Butler *et al.*, 2018 ; Groc *et al.*, 2019), du Nord de l'Amérique du Sud (région Amazonienne) (Scarponi *et al.*, 2019) et d'Asie centrale (Mongolie et Pakistan) (Chen *et al.*, 2017). Les zones de prévalence intermédiaire se situent également en Afrique, en Asie, en Océanie, sur le pourtour méditerranéen (Amini *et al.*, 2013), en Europe de l'Est et dans le Sud-Est de la Turquie (Gheorghe *et al.*, 2015). Enfin, le Nord et l'Ouest de l'Europe ainsi que l'Amérique du Nord constituent des zones de faible prévalence où le virus circule principalement dans les populations à risque (Aguilera *et al.*, 2018 ; Terrault *et al.*, 2018 ; Wranke *et al.*, 2018). De façon surprenante, l'hépatite D est peu fréquente en Inde et en Asie du Sud-Est, en dépit de la prévalence élevée du HBV.

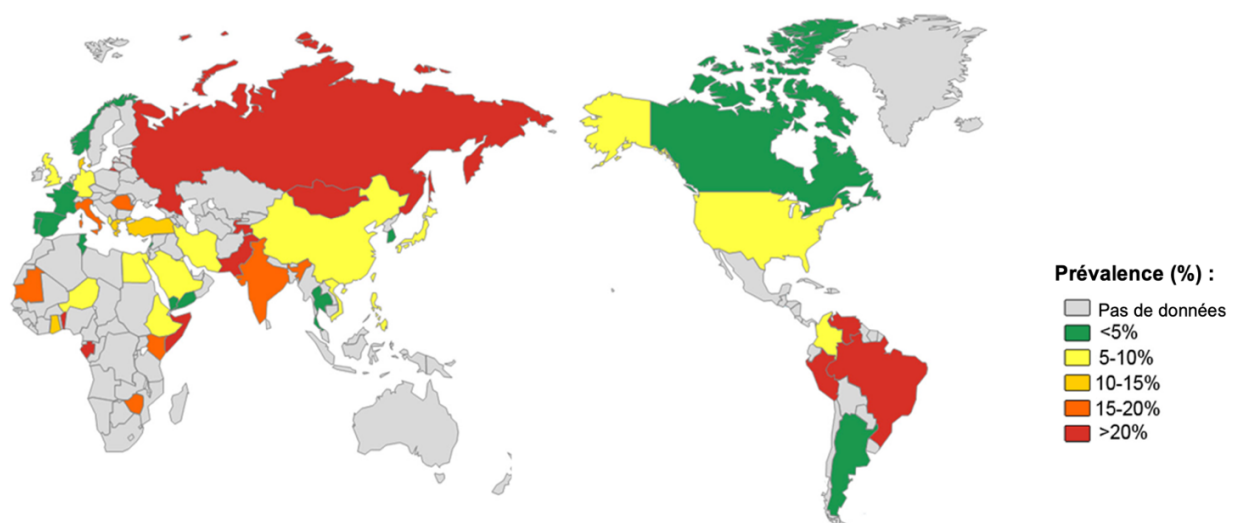


Figure 4 : Séroprévalence du virus de l'hépatite D dans le monde parmi la population HBsAg positive. La prévalence du HDV (du rouge au vert) est inégalement répartie dans le monde. Certaines régions telles que l'Afrique centrale ou l'Amérique du Sud sont particulièrement touchées (figure adaptée de Chen *et al.*, 2019).

Depuis les années 90, l'infection par le HDV est devenue moins fréquente dans les pays développés grâce à la vaccination contre l'hépatite B et au dépistage systématique lors de dons du sang. En Europe occidentale, l'hépatite delta persiste essentiellement en raison de l'immigration de personnes co-infectées issues de régions fortement touchées.

En France, la majorité des cas de co-infection HBV/HDV concerne des individus migrants originaires d'Afrique subsaharienne (53 %) et d'Europe de l'Est (19 %). Les patients co-infectés nés en France (14 %) sont, quant à eux, le plus souvent des usagers de drogues par voie intraveineuse (Servant-Delmas *et al.*, 2014).

2. Modes de transmission

De la même façon que le HBV, le HDV se transmet essentiellement par lésion cutanée, par voie sexuelle ou par contact avec du sang ou des dérivés sanguins infectés. La transmission de la mère à l'enfant est possible, mais rare (revu dans Mentha *et al.*, 2019). Parmi les populations les plus à risque de présenter une co-infection HBV-HDV se trouvent les consommateurs de drogues injectables et les sujets porteurs d'une infection par le HCV ou d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (revu dans Hercun, Koh and Heller, 2020). Le risque de co-infection semble également plus élevé chez les hémodialysés, les hommes ayant des rapports homosexuels et les travailleurs du sexe (revu dans Hercun, Koh and Heller, 2020 ; Stockdale *et al.*, 2020).

3. Infection des hépatocytes par le HBV et le HDV

On distingue deux modèles d'infection par le HDV : d'une part la co-infection HBV/HDV qui se caractérise par l'infection simultanée des hépatocytes par les deux virus, et d'autre part, la surinfection du foie par le HDV chez un sujet déjà porteur chronique du HBV. Il est important de bien distinguer ces deux modèles puisque l'évolution de la maladie ainsi que son pronostic diffèrent selon la situation (revu dans Mentha *et al.*, 2019) (**Figure 5**).

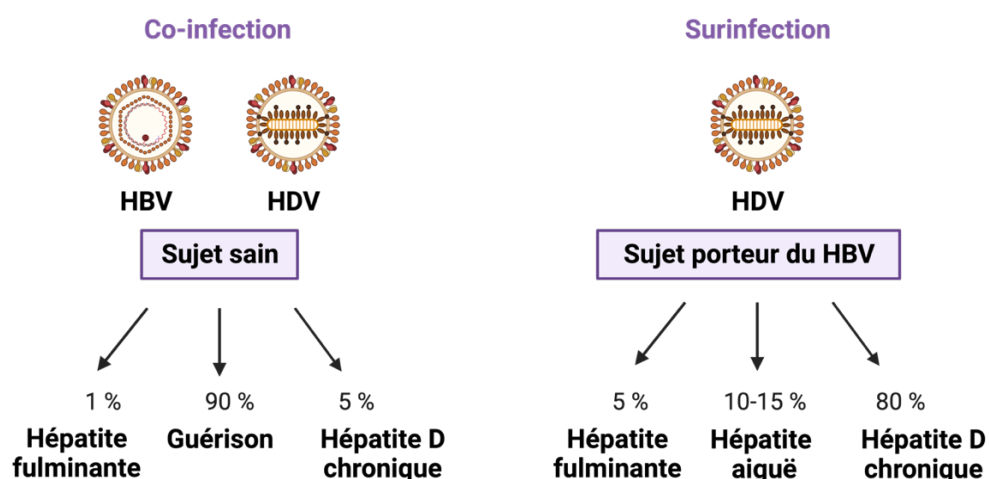


Figure 5 : Histoire naturelle de la co-infection ou de la surinfection HBV/HDV. La co-infection du foie par le HBV et le HDV aboutit dans la grande majorité des cas à l'élimination des deux virus et à la guérison du malade. En revanche, la surinfection par le HDV conduit fréquemment à une chronicité beaucoup plus sévère que lors d'une infection par le HBV seule (figure inspirée de Turon-Lagot *et al.*, 2020)

Pour le HDV, la période d'incubation se situe entre trois et sept semaines. L'hépatite D aiguë est généralement associée à plusieurs symptômes non spécifiques, cependant un ictère est présent chez plus de 65 % des patients. Sur le plan clinique, l'hépatite D chronique ne se distingue pas de l'hépatite B chronique seule, bien que la progression de la maladie vers la cirrhose soit plus rapide et plus souvent associée à des signes d'insuffisance hépatique (WHO 2023).

3.1 La co-infection HBV/HDV

La co-infection des hépatocytes par le HBV et le HDV peut engendrer une hépatite modérée à sévère, parfois fulminante, avec un risque élevé de mortalité en l'absence de transplantation hépatique. Cependant, elle aboutit dans 90 % des cas à l'élimination des deux virus et à la guérison du malade. L'évolution vers une hépatite D chronique est rare et touche moins de 5 % des cas d'hépatite aiguë (revu dans Negro, 2014). Les lymphocytes T cytotoxiques, acteurs clés de la réponse immunitaire, sont majoritairement responsables de la clairance du virus en détruisant les hépatocytes infectés par le HDV. Un retard ou une insuffisance dans la reconnaissance des épitopes explique le passage vers la chronicité (Abbas and Afzal, 2013).

3.2 La surinfection HBV/HDV chez un sujet porteur du HBV

Dans le cadre de la surinfection des hépatocytes par le HDV, l'hépatite aiguë est plus marquée, évoluant dans la majorité des cas vers une forme chronique dont la sévérité est beaucoup plus importante que lors d'une hépatite B chronique seule. La surinfection augmente également de trois fois le risque de développer un HCC. Une hépatite fulminante est observée dans 5 % des cas (revu dans Negro, 2014).

3.3 Les interactions entre le HBV et le HDV

Les interactions entre les deux virus sont complexes et à ce jour pas encore complètement élucidées. Plusieurs études ont révélé que le HDV inhibe la réplication du HBV, ce qui suggère que la maladie hépatique en cas de surinfection HBV/HDV est principalement due au HDV (revu dans Dastgerdi, Herbers and Tacke, 2012). Les mécanismes moléculaires de cette inhibition ont récemment été identifiés dans une étude décrite ci-après et dans laquelle le laboratoire a été impliqué (Lucifora *et al.*, 2023)

La suppression de la réplication du HBV par le HDV n'est cependant pas maintenue pendant toute la durée de la maladie puisque la réponse virale évolue au cours temps

(Wedemeyer and Manns, 2010). Une étude a notamment révélé qu'environ la moitié des patients présentent une réplication significative du HBV (Schaper *et al.*, 2010). Dans l'ensemble, trois phases de l'hépatite D chronique ont ainsi été proposées :

- Une phase précoce active : elle se caractérise par une réplication importante du HDV et la suppression de celle du HBV ;
- Une phase modérément active : la réplication du HDV décroît et l'on observe une réactivation du HBV ;
- Une phase tardive : la maladie évolue vers la cirrhose puis le HCC en raison de la réplication de l'un ou l'autre virus ou, à l'inverse, une rémission est observée à la suite d'une réduction marquée de la réplication des deux virus (revu dans Abbas and Afzal, 2013).

3.4 Les marqueurs de la double infection HBV/HDV

Le HDV déclenche une réponse immunitaire innée et adaptative chez l'hôte infecté, qui se traduit par la production d'immunoglobulines M (IgM) et G (IgG) (Aragona *et al.*, 1987). Par conséquent, les trois marqueurs spécifiques du HDV présents dans le sérum des patients infectés sont : l'ARN du HDV, l'antigène delta (HDAg) et les anticorps anti-HDV (revu dans Pascarella and Negro, 2011) (**Figure 6**).

L'ARN du HDV est principalement détecté par RT-PCR, avec une limite de détection de 10^5 génomes/millilitre (Madejón *et al.*, 1990 ; Zignego *et al.*, 1990 ; Cariani *et al.*, 1992 ; Dinolfo *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 1995). Dans les échantillons de foie, l'ARN viral peut être détecté par hybridation *in situ*. Cette technique n'est cependant pas utilisée en routine en raison de sa complexité et de sa durée. De nouvelles analyses automatisées sont en cours d'élaboration pour faciliter le suivi cinétique de l'ARN du HDV dans le sérum des patients pendant le traitement (Mederacke *et al.*, 2010 ; Schaper *et al.*, 2010).

L'HDAg sérique peut être détecté par deux méthodes différentes, soit par dosage immunoenzymatique (ELISA, pour *enzyme-linked immunosorbent assay*), soit par dosage radioimmunologique (RIA, pour *radioimmunoassay*) (Shattock and Morgan, 1984). Dans les biopsies hépatiques, l'HDAg peut également être détecté par immunofluorescence ou coloration immunohistochimique. Enfin, de la même manière que l'HDAg, les anticorps anti-HDV IgM et IgG sériques peuvent être détectés par ELISA ou RIA (revu dans Pascarella and Negro, 2011).

Ces différents outils de diagnostic doivent bien sûr indiquer s'il y a une infection par le HDV, mais aussi permettre de distinguer la co-infection de la surinfection et s'il s'agit d'une infection

chronique ou aiguë. De plus, comme le HDV est dépendant du HBV, il est nécessaire de vérifier la présence des HBsAg avant d'analyser d'autres marqueurs.

Dans ce contexte, la co-infection aiguë HBV/HDV est mise en évidence par la présence d'un titre élevé d'IgM anti-HBc, des anticorps qui disparaissent en cas d'infection chronique par le HBV. Elle présente par ailleurs les mêmes caractéristiques que la surinfection aiguë par le HDV. L'HDAg apparaît tôt mais disparaît également rapidement, sauf chez les patients immunodéficients (Buti *et al.*, 1986).

L'ARN du HDV est un marqueur précoce et sensible de la réplication du HDV en phase aiguë et est présent chez 90 % des patients. En cas de surinfection, la quantité de HDV dans le sérum peut atteindre 10^{12} particules contenant de l'ARN par millilitre entre deux et cinq semaines après l'inoculation. Enfin, les anticorps anti-HDV apparaissent tardivement, mais la séroconversion permet d'établir le diagnostic en l'absence d'autres tests (revu dans Pascarella and Negro, 2011).

Lors d'une infection chronique par le HDV, les HDAg forment des complexes immuns avec les anticorps anti-HDV, rendant la détection des HDAg par ELISA infaisable. La détection de l'HDAg dans le foie n'est ainsi possible que chez la moitié des patients chroniquement infectés depuis dix ans ou plus (Wu *et al.*, 1995).

L'ARN du HDV est généralement détectable dans le sérum. Le titre des anticorps anti-HDV de type IgG est très élevé chez les patients chroniquement infectés, ce qui permet de distinguer les infections récentes des infections passées. La persistance des anticorps anti-HDV de type IgM après la phase aiguë est caractéristique de l'évolution vers la chronicité, contrairement aux autres infections virales hépatiques (Pascarella and Negro, 2011).

En résumé, la première étape pour établir un diagnostic consiste à détecter les anticorps anti-HDV. Le diagnostic peut ensuite être confirmé par une coloration immunohistochimique de l'HDAg dans le foie ou par détection de l'ARN du HDV dans le sérum. Enfin, si l'infection par le HDV est confirmée, l'étape suivante consiste à évaluer le stade de la maladie afin de mettre en place une stratégie thérapeutique adaptée (revu dans Pascarella and Negro, 2011).

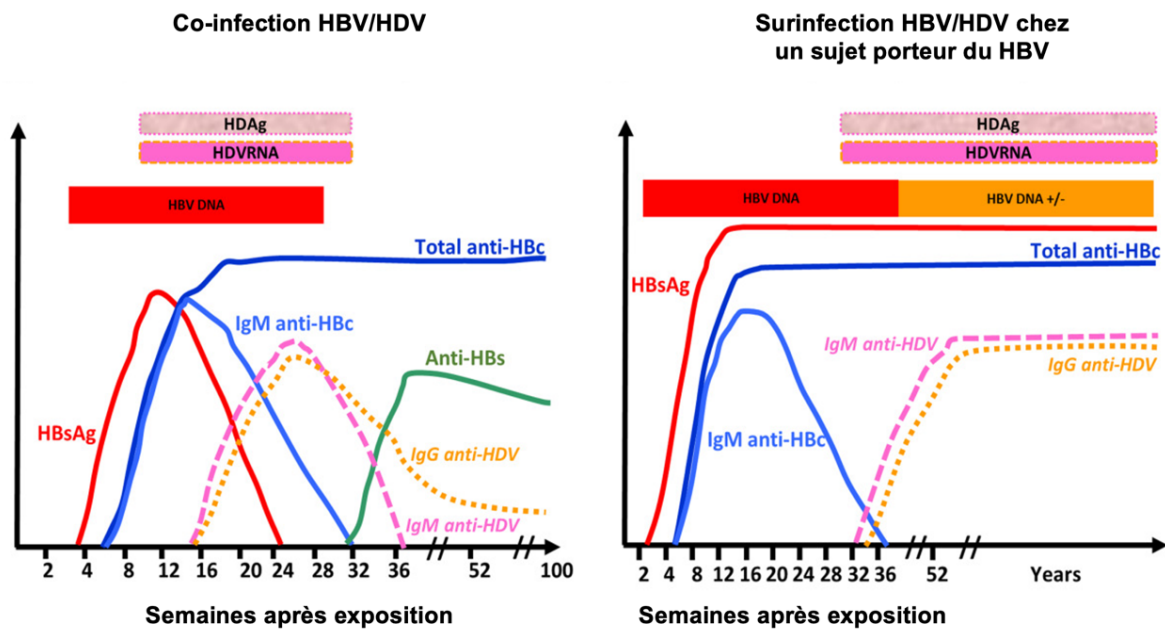


Figure 6 : Évolution des marqueurs de la double infection HBV/HDV au cours du temps. Les trois marqueurs de l'infection par le HDV présents dans le sérum des patients sont l'ARN viral (HDV RNA), les antigènes delta (HDAg) et les anticorps anti-HDV (IgM et IgG anti-HDV). Par ailleurs, il est également possible de suivre les marqueurs de l'infection par le HBV, à savoir l'ADN viral (HBV DNA), les antigènes de surface du HBV (HBsAg) et les anticorps anti-HBV (Anti-HBs) (figure adaptée de Kamili et al., 2017).

4. Prévention et traitement de l'hépatite delta

Malgré les progrès réalisés au cours des dernières années dans la prise en charge des hépatites virales, le traitement de l'hépatite D reste à ce jour difficile et les taux de guérison sont faibles.

4.1 Les traitements préventifs

La mesure la plus efficace pour prévenir l'hépatite D reste la prévention de la transmission de l'hépatite B, grâce à la vaccination. En effet, un vaccin contre le HBV est disponible depuis les années 80. Ce dernier est constitué d'HBsAg initialement purifiés à partir du plasma de porteurs asymptomatiques chroniques du HBV (Maupas *et al.*, 1976).

De nos jours, les vaccins administrés dans le monde sont générés par génie génétique et composés d'HBsAg recombinants adsorbés sur l'aluminium. Ces vaccins peuvent être utilisés seuls ou combinés, notamment pour la vaccination des nourrissons. Un titre d'anticorps anti-HBs supérieur ou égal à 10 UI (unité internationale)/litre après vaccination est considéré, dans la population générale, comme protecteur (revu dans Launay and Floret, 2015).

Le schéma vaccinal standard se compose de deux injections intramusculaires espacées d'un mois, suivi d'un rappel entre six et douze mois plus tard. Une réponse protectrice quelques semaines après la troisième injection est obtenue chez plus de 90 % des personnes vaccinées. Les meilleurs taux de réponse sont obtenus chez les nourrissons et les enfants (Lemon and Thomas, 1997 ; Poland and Jacobson, 2004). Par ailleurs, les données disponibles démontrent que la protection après une vaccination dans l'enfance est au minimum de 30 ans et qu'elle peut s'étendre sur une vie entière (Bruce *et al.*, 2016).

En France, la vaccination contre l'hépatite B est obligatoire pour tous les nourrissons depuis le 1^{er} janvier 2018, dès l'âge de deux mois (Décret n°2018-42 du 25 janvier 2018 relatif à la vaccination obligatoire). La vaccination est également recommandée, en rattrapage, chez tous les enfants et adolescents jusqu'à l'âge de 15 ans révolus, non antérieurement vaccinés. À partir de 16 ans, la vaccination est recommandée aux personnes exposées à un risque d'infection par le HBV et obligatoire chez les adultes pour l'exercice de certaines activités professionnelles, notamment dans le domaine de la santé.

Cependant, il est important de noter que la vaccination ne permet pas de protéger contre une infection par le HDV chez un patient déjà infecté par le HBV. Les autres mesures de prévention reposent donc sur certaines règles d'hygiène comme l'utilisation de préservatifs lors de rapports sexuels, le recours à du matériel à usage unique ou stérile pour la réalisation de tatouages ou piercings, ainsi que l'absence de partage du matériel d'injection de drogues ou d'objets d'hygiène personnels comme les rasoirs.

4.2 Les traitements disponibles avant 2020

Le but principal du traitement de l'hépatite D est de diminuer la réplication virale afin de limiter les conséquences de la maladie chronique sur le foie en prévenant la progression de la fibrose vers la cirrhose ainsi que ses complications, en particulier le HCC, améliorant ainsi la survie du patient. Dans l'idéal, l'objectif consiste à observer une perte des HBsAg avec une séroconversion anti-HBs. Bien qu'il n'existe pas de recommandations formelles pour la surveillance des traitements, un dosage des transaminases et de la charge virale (HDV et HBV) doit idéalement être réalisé à douze semaines, 24 semaines puis toutes les 24 semaines après le début du traitement (revu dans Asselah *et al.*, 2020).

À l'heure actuelle, les traitements contre l'infection par le HDV sont majoritairement peu efficaces et ne permettent pas d'éliminer totalement le virus. En raison de sa structure particulière, cibler le HDV constitue un défi majeur, d'où la nécessité de continuer à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Verrier *et al.*, 2020).

4.2.1 Les traitements à base d'IFN- α

Bien que leur mécanisme d'action précis ne soit pas encore totalement élucidé, les traitements à base d'interférons-alpha (IFN- α) ont été largement utilisés comme stratégie anti-HDV au cours des 20 à 30 dernières années. Ces thérapies constituent encore à ce jour le seul traitement recommandé par les directives internationales pour le traitement de l'hépatite D chronique (revu dans Terrault *et al.*, 2018 ; Asselah *et al.*, 2020). L'IFN- α pégylé (PEG-IFN- α), dont le temps de demi-vie plasmatique est prolongé, est associé à une meilleure efficacité que l'IFN- α standard. Un traitement de 48 semaines par injections sous-cutanées hebdomadaires de PEG-IFN- α supprime la réplication du HDV chez environ 20 à 30 % des patients 24 semaines après l'arrêt de la thérapie, mais avec des effets secondaires significatifs (revu dans Urban, Neumann-Haefelin and Lampertico, 2021). Une administration continue d'IFN pendant plus de 48 semaines peut réduire la probabilité de progression de la maladie, avec une perte des HBsAg survenant chez environ 10 % des patients lors du suivi à long terme (Heller *et al.*, 2014).

Malgré ces résultats, l'IFN- α présente une utilisation limitée en pratique clinique puisque ce médicament est contre-indiqué chez les personnes âgées, chez celles présentant des signes de maladie auto-immune et chez les individus avec une maladie hépatique avancée. De plus, de nombreux patients ont déjà été exposés sans succès aux traitements standards ou à du PEG-IFN- α par le passé. La combinaison de PEG-IFN- α avec d'autres molécules comme le fumarate de ténofovir disoproxil (pro-drogue) pendant 96 semaines n'a pas significativement amélioré les réponses virologiques après l'arrêt du traitement (Wedemeyer *et al.*, 2019). Par ailleurs, chez la moitié des répondeurs, une rechute virologique tardive est observée à la 24^{ème} semaine après l'arrêt du traitement, remettant en question l'efficacité à long terme de ce traitement (Heidrich *et al.*, 2014).

4.2.2 Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques (NUC)

Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques (NUC) agissent sur la transcriptase inverse du HBV et inhibent efficacement la réplication du HBV avec peu d'effet sur l'expression des HBsAg. Même si en théorie l'inhibition du virus auxiliaire devrait affecter le cycle de multiplication du HDV, les NUC sont en réalité inefficaces contre le HDV. Les molécules testées dans l'infection par le HDV comprennent le famciclovir (Yurdaydin *et al.*, 2002), la ribavirine (en association avec du PEG-IFN- α) (Gunsar *et al.*, 2005), la lamivudine (Yurdaydin *et al.*, 2008) et l'entécavir (Abbas *et al.*, 2016). Malheureusement, aucune d'entre elles n'a démontré d'activité antivirale pour le HDV.

Le virus de l'hépatite delta

1. Découverte du HDV

L'année 2017 a marqué le 40^{ème} anniversaire de la publication de Mario Rizzetto et son équipe dans la revue *Gut* relatant la découverte d'un nouveau virus chez l'Homme, le virus de l'hépatite D ou delta. Ces premières contributions ont permis l'identification d'un nouvel antigène jusque-là inconnu à partir de biopsies de foie de patients atteints d'une forme sévère d'hépatite B, qu'ils ont alors nommé antigène delta (HDAg) (Rizzetto *et al.*, 1977).

Le HDV a ainsi été découvert 14 ans après les HBsAg par Baruch Blumberg et sept ans après la découverte du HBV par David Dane (Dane, Cameron and Briggs, 1970). À cette époque, de nombreux sous-types du HBV étaient déjà connus. Bien que l'hypothèse d'un variant du HBV ait été envisagée, le HDV est apparu comme un virus distinct du HBV grâce à des études de transmission expérimentale notamment chez le Chimpanzé (Rizzetto *et al.*, 1980) et diverses expériences de clonage du génome viral (Denniston *et al.*, 1986 ; Wang *et al.*, 1986 ; Makino *et al.*, 1987). Ces recherches ont démontré que l'HDAg est associé à un agent infectieux distinct. En effet, le HDV est un virus satellite qui dépend de l'expression des antigènes de surface du HBV pour son encapsidation, sa libération et sa transmission. Bien que de récentes études ont démontré que le HDV est capable de se propager *in vitro* indépendamment du HBV en utilisant les glycoprotéines d'enveloppe de plusieurs genres de virus tels que les vésiculovirus, les flavivirus et les hépacivirus (dont le HCV) (Perez-Vargas *et al.*, 2019), les investigations cliniques confirment sa forte association avec l'infection par le HBV (Cappy *et al.*, 2021 ; Chemin *et al.*, 2021 ; Pflüger *et al.*, 2021). Depuis sa découverte en 1977 en Italie, le HDV a rejoint la catégorie des virus hépatiques et s'est imposé comme un nouveau virus à ARN humain aux caractéristiques uniques.

2. Classification

L'origine du HDV reste encore aujourd'hui mal comprise. Ce virus a été jusqu'en 2018 le seul représentant du genre des *Deltavirus* (Magnius *et al.*, 2018). Cependant, l'identification au cours des dernières années de virus apparentés au HDV chez les oiseaux, les serpents, les poissons, les amphibiens et les invertébrés suggère que l'histoire évolutive des *Deltavirus* est beaucoup plus complexe que celle précédemment supposée (Szirovicza *et al.*, 2019).

Plus petit virus capable d'infecter l'Homme, le HDV est également le seul virus satellite humain connu (Bahoussi *et al.*, 2022). En raison de son génome circulaire et de son mécanisme de réplication, le HDV possède des similitudes avec les viroïdes, de petits ARN circulaires qui représentent une grande famille d'agents pathogènes subviraux chez les

plantes (revu dans Flores, Owens and Taylor, 2016 ; Adkar-Purushothama and Perreault, 2020). Toutefois, le HDV se distingue clairement des viroïdes par la taille plus importante de son génome ainsi que sa capacité à coder une protéine (Netter *et al.*, 2021). Cet agent pathogène particulier a depuis été reclassé dans le nouveau règne des *Ribozyviria*, le genre *Deltavirus* et la famille des *Kolmioviridae* au sein de laquelle se trouvent huit espèces, correspondant aux divers génotypes du HDV (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2020) Deltavirus).

Comme le HBV, le HDV se caractérise par une spécificité d'hôte très stricte, son seul réservoir naturel avéré étant l'Homme. Toutefois, il est supposé que le HDV peut circuler avec le HBV dans d'autres hôtes mammifères comme le Chimpanzé, sans savoir à l'heure actuelle si cette espèce constitue un autre hôte naturel du virus (Verrier *et al.*, 2018).

3. Génotypes et distribution dans le monde

En raison des variations de séquences observées dans les isolats du HDV, huit clades nommés génotypes 1 à 8 ont été répertoriés (Le Gal *et al.*, 2017) (**Figure 7**). Ces derniers sont répartis de manière inégale dans le monde et présentent des différences remarquables dans leur efficacité de réplication (Wang *et al.*, 2021). Le génotype 1 est retrouvé dans le monde entier, les génotypes 2 et 4 associés à une maladie hépatique moins sévère sont retrouvés en Extrême-Orient, les génotypes 5 et 8 sont prédominants en Afrique tandis que le génotype 3 associé à un risque d'insuffisance hépatique plus élevé est principalement présent en Amérique du Sud (Rizzetto, 2015).

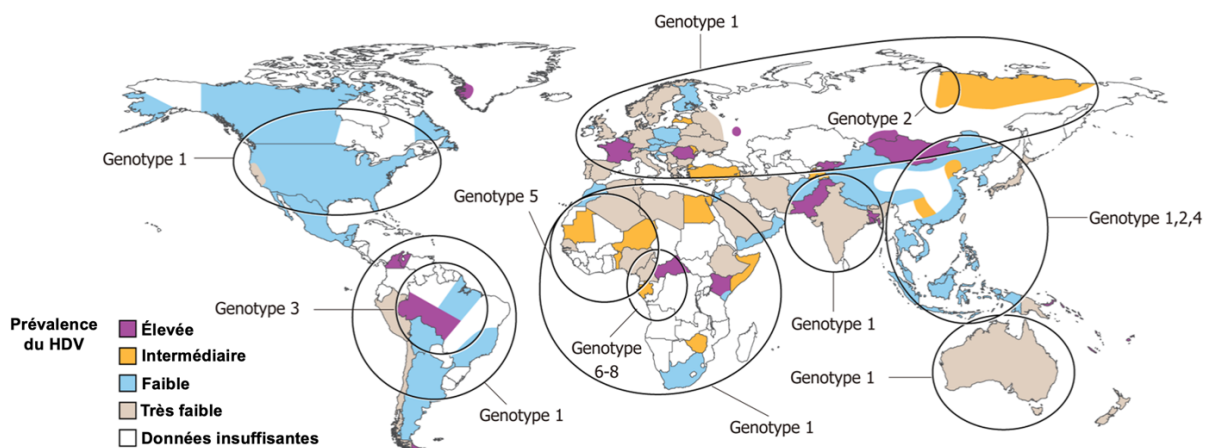


Figure 7 : Répartition géographique des différents génotypes du HDV dans le monde. Les génotypes du HDV (1 à 8) sont inégalement répartis sur l'ensemble du globe (figure adaptée de Gilman, Heller and Koh, 2019).

4. Structure des virions

Le HDV est un petit virus sphérique mesurant environ 35 nm de diamètre. Il s'agit d'une particule chimérique formée de composants externes fournis par le HBV et de composants internes propres au HDV (**Figure 8**).

En effet, le HDV possède une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrés les trois antigènes de surface du HBV (HBsAg S, M et L). Ces trois protéines partagent un domaine C-terminal commun, le domaine S, seul composant de l'antigène S-HBsAg. L'antigène M-HBsAg possède en plus une partie N-terminale hydrophile qui correspond au domaine PrÉS2. Enfin, la partie N-terminale de la protéine L-HBsAg se caractérise par la présence d'un domaine supplémentaire nommé PrÉS1 (revu dans Mentha *et al.*, 2019).

L'enveloppe du HDV renferme un complexe ribonucléoprotéique (RNP) qui contient le génome viral associé aux deux isoformes de l'unique protéine codée par le HDV, l'antigène delta (HDAg) : S-HDAg pour la forme courte et L-HDAg pour la forme longue (Sureau and Negro, 2016).

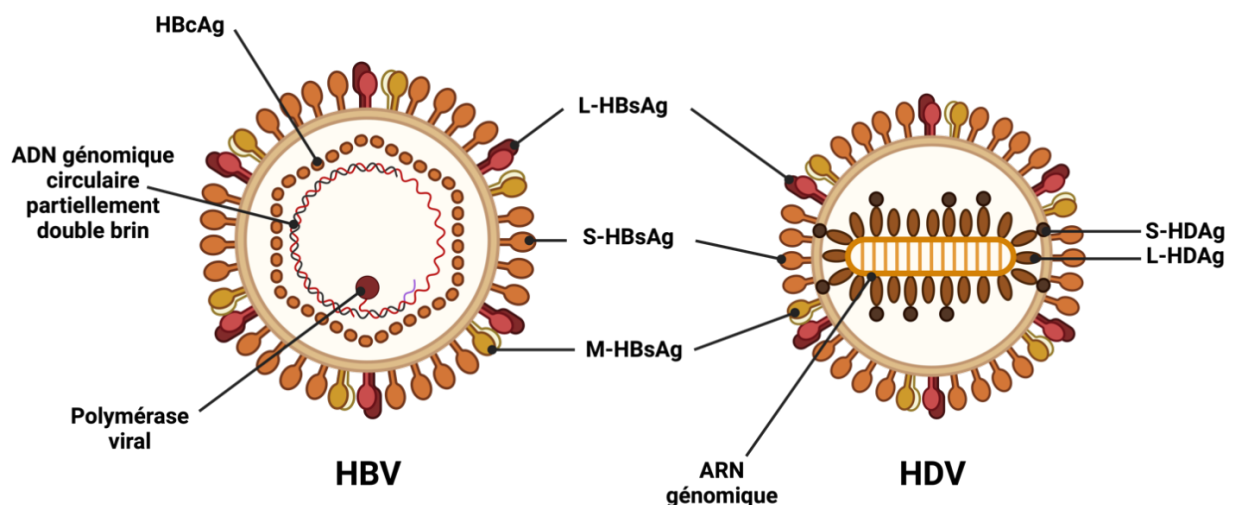


Figure 8 : Représentation schématique de la structure du HBV et du HDV. Les deux virus utilisent les protéines de surface du HBV (HBsAg L, M et S) pour leur assemblage. La capsidic de symétrie icosaédrique du HBV est formée de multimères de la protéine de core HBcAg et renferme une copie de l'ADN génomique viral partiellement double brin (ou ADN circulaire relâché) associée à la polymérase virale. Les virions du HDV contiennent, quant à eux, une copie du génome viral à ARN circulaire simple brin fortement apparié associé aux deux formes de l'antigène delta (S et L-HDAg) (figure inspirée de Turon-Lagot *et al.*, 2020).

Organisation et expression du génome du HDV

1. Les différentes formes d'ARN du HDV

Lors de la réplication du HDV, trois formes différentes d'ARN sont produites : l'ARN génomique, l'ARN antigénomique et dans des quantités plus faibles, l'ARN messager (ARNm) (**Figure 9**). À noter qu'une activité ribozyme est retrouvée à la fois sur le génome et l'antigénome (revu dans Mentha *et al.*, 2019).

1.1 L'ARN génomique

La structure complète du génome du HDV a été décrite pour la première fois en 1986 et consiste en un ARN de polarité négative d'environ 1,7 kilobases, dont la longueur est variable selon les huit génotypes viraux, allant de 1668 à 1697 nucléotides (Le Gal *et al.*, 2017). Ce génome à ARN monocaténaire circulaire adopte une configuration quasi-bicaténaire en raison d'une complémentarité de bases de 74 % associée à un taux de guanine-cytosine de 60 %. Ainsi, l'ARN du HDV est décrit comme une tige non ramifiée associant des zones parfaitement bicaténaires à de petites protubérances et des boucles internes, ce qui lui confère une structure flexible (Villiers *et al.*, 2015).

1.2 L'ARN antigénomique

L'ARN antigénomique, qui est le complément exact de la séquence génomique, constitue un intermédiaire de la réplication. Il possède un cadre de lecture ouvert unique (ORF, pour *open reading frame*) codant pour les deux isoformes de la protéine delta, S-HDAg de 194-195 acides aminés (environ 24 kDa) et L-HDAg de 213-215 acides aminés (environ 27 kDa). Cet ARN antigénomique peut être édité par l'enzyme cellulaire ADAR1 (*adenosine deaminase acting on RNA I*) permettant ainsi la conversion de l'adénosine en position 1012 en inosine et la synthèse de la forme longue de l'HDAg (revu dans Mentha *et al.*, 2019).

1.3 L'ARNm

Au début du cycle viral, l'ARN génomique sert de matrice pour la synthèse de l'ARNm codant la protéine S-HDAg (Taylor, 2006). Cet ARNm, qui possède une coiffe et une queue polyA (Gudima *et al.*, 2000), est traduit dans le cytoplasme en protéine S-HDAg. S-HDAg migre alors grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS, pour *Nuclear Localisation Signal*) dans le noyau afin de stimuler la réplication virale. Environ 1000 copies d'ARNm s'accumulent dans la cellule (Chen *et al.*, 1986).

Plus tardivement dans le cycle, l'ARN antigénomique produit dans le nucléole et édité par ADAR1 est recopié par l'ARN polymérase ADN-dépendante II pour générer un génome HDV qui sera transcrit en ARNm tardif dans lequel le codon STOP d'origine, UAG, est converti en un codon UGG spécifique du tryptophane. Cette conversion met ainsi fin à la synthèse de S-HDAg et permet à la traduction de se poursuivre jusqu'au codon STOP suivant. Ceci conduit à la synthèse de la forme longue de l'antigène delta, L-HDAg, qui possède 19 acides aminés supplémentaires au niveau de son extrémité C-terminale (revu dans Mentha *et al.*, 2019).

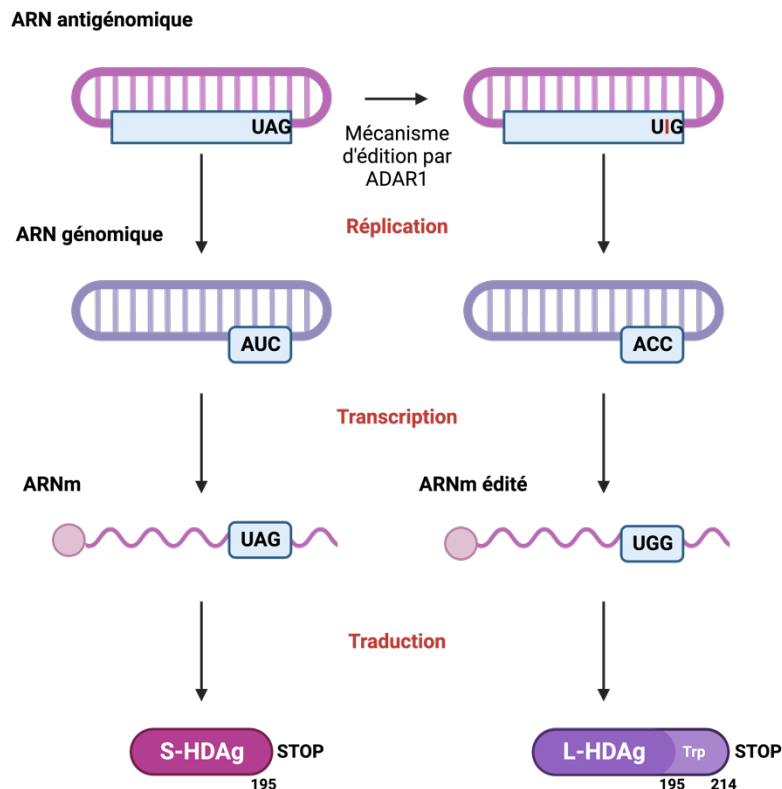


Figure 9 : Représentation schématique de l'expression du génome du HDV. L'ARN antigénomique du HDV possède un cadre de lecture ouvert unique permettant l'expression des deux isoformes de l'HDAg. Cet ARN antigénomique peut être édité par ADAR1 permettant ainsi la conversion de l'adénosine en position 1012 en inosine. Après réplication et transcription de l'ARNm, le codon STOP d'origine, UAG, est converti en codon UGG spécifique du tryptophane. Cette conversion met fin à la synthèse de S-HDAg et permet à la traduction de se poursuivre jusqu'au codon STOP suivant, ce qui entraîne la synthèse de L-HDAg, qui possède 19 acides aminés supplémentaires au niveau de son extrémité C-terminale (figure inspirée de Mentha *et al.*, 2019).

2. Mécanisme de la réplication de l'ARN du HDV

La réplication du HDV se produit dans le nucléole de la cellule infectée indépendamment de celle du HBV. Étant donné que le HDV ne code pas sa propre ARN polymérase ARN dépendante et n'utilise pas non plus la polymérase du HBV, il est fortement dépendant des polymérases de l'hôte pour l'accomplissement de son cycle de multiplication.

Plusieurs études ont révélé l'implication de l'ARN polymérase II, mais la participation des autres ARN polymérase cellulaires dans la réplication du HDV est encore débattu (Modahl *et al.*, 2000 ; Taylor, 2006). Il a notamment été démontré que les ARN polymérase I et III se lient toutes les deux à l'ARN du HDV. Tandis que l'ARN polymérase I semble impliquée dans la transcription de l'ARN antigénomique, aucune fonction précise n'a été trouvée à ce jour pour l'ARN polymérase III (Greco-Stewart, Schissel and Pelchat, 2009).

Le HDV constitue un cas unique en virologie humaine. En effet, le mécanisme par lequel le virus est capable de détourner la/les ARN polymérase(s) de la cellule hôte pour sa réplication est encore largement inconnu.

La structure secondaire de l'ARN du HDV semble jouer un rôle dans le recrutement de l'ARN polymérase II puisque l'enzyme est capable de reconnaître des sites situés aux deux pôles de la structure en tige du génome viral (Greco-Stewart *et al.*, 2007). La petite forme de l'antigène delta, S-HDAg, joue également un rôle important dans ce processus (revu dans Abeywickrama-Samarakoon *et al.*, 2018).

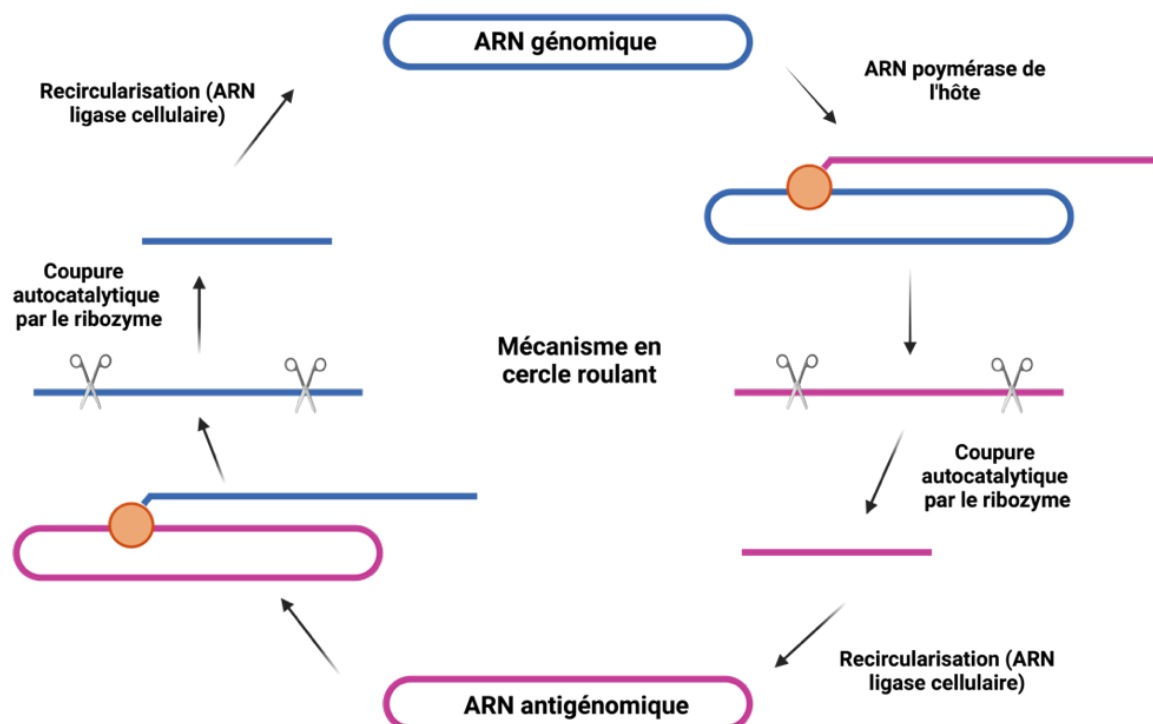


Figure 10 : Représentation schématique de la réplication en cercle roulant du HDV. Le brin d'ARN génomique du HDV (bleu) est utilisé comme matrice pour générer l'ARN antigénomique (rose) à l'aide d'une polymérase de l'hôte. Les différentes étapes se répètent sur les brins antigénomiques pour produire de l'ARN génomique nouvellement synthétisé (figure inspirée de Goodrum and Pelchat, 2018).

La réplication de l'ARN du HDV se fait selon un mécanisme en cercle roulant (**Figure 10**) et induit la synthèse de multimères d'ARN antigénomiques. Ces multimères linéaires sont clivés en monomères via l'activité ribozyme de l'ARN antigénomique, puis recircularisés selon un mécanisme encore inconnu. L'ARN antigénomique sert ensuite de matrice pour la néosynthèse, également selon un mécanisme en cercle roulant, de multimères d'ARN génomiques qui sont à leur tour clivés en monomères par l'activité ribozyme de l'ARN génomique (Greco-Stewart *et al.*, 2007).

3. Les deux isoformes de l'antigène delta

3.1 Caractéristiques et fonctions des antigènes delta

Le HDV est un virus qui possède la particularité de ne coder que deux protéines structurales, S-HDAg et L-HDAg, dépourvues de toute activité enzymatique, mais qui jouent chacune un rôle clé lors du cycle viral. En effet, les 19 acides aminés supplémentaires présents au niveau de l'extrémité C-terminale de L-HDAg lui confèrent des propriétés fonctionnelles différentes de celles de S-HDAg. S-HDAg est nécessaire à l'initiation de la réplication du génome du HDV tandis que L-HDAg, qui est produite à un stade avancé de la réplication virale, inhibe la réplication et est essentielle pour l'assemblage de nouvelles particules virales (Greco-Stewart and Pelchat, 2010 ; Dastgerdi, Herbers and Tacke, 2012). L-HDAg ne régule pas seulement la réplication du génome du HDV mais aussi sa propre synthèse en inhibant la réplication virale (Sato, Cornillez-Ty and Lazinski, 2004).

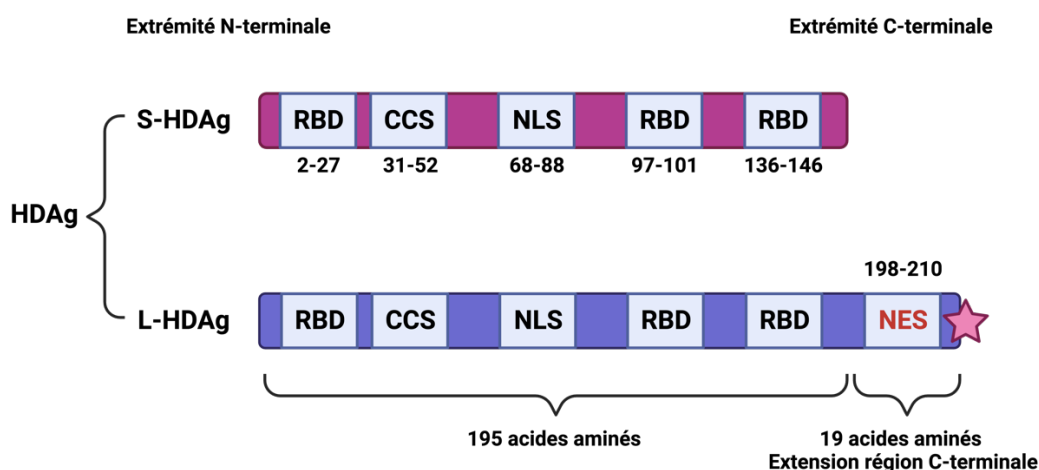


Figure 11 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels des deux isoformes de l'antigène delta. S-HDAg et L-HDAg sont caractérisés par la présence de trois domaines de liaison à l'ARN (BRD, pour RNA-binding domain), une superhélice (CCS, pour coiled-coil sequence) et un signal de localisation nucléaire (NLS, pour nuclear localization signal). L-HDAg possède en plus un signal d'export nucléaire (NES, pour nuclear export signal). Par ailleurs, un signal de farnésylation est retrouvé au niveau de l'extension C-terminale de L-HDAg (étoile rose) (figure inspirée Zi *et al.*, 2022).

Les deux isoformes de l'HDAg contiennent plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 11**), tels qu'un domaine de liaison à l'ARN, une superhélice et un NLS. Par ailleurs, L-HDAg possède quelques domaines supplémentaires, dont un signal d'assemblage du virus (VAS, pour *Virus Assembly Signal*) et un signal d'export nucléaire (Greco-Stewart and Pelchat, 2010 ; Dastgerdi, Herbers and Tacke, 2012). La présence du VAS rend L-HDAg obligatoire pour l'assemblage des nouveaux virions (Tseng and Lai, 2009). Les HDAg peuvent ainsi activer directement la transcription du génome viral en se liant à l'ARN. De plus, ils peuvent faciliter l'élongation de la transcription en remplaçant le répresseur de la transcription lié à l'ARN polymérase II (Tseng and Lai, 2009 ; Greco-Stewart and Pelchat, 2010 ; Dastgerdi, Herbers and Tacke, 2012). En l'absence des HBsAg, S-HDAg et L-HDAg ont tendance à se localiser dans le noyau en raison de leurs NLS. Les HBsAg-L, M et S sont donc essentiels pour la translocation cytoplasmique de L-HDAg, car seule L-HDAg possède un signal d'exportation nucléaire qui lui permet de jouer son rôle dans l'assemblage du virion (Wang *et al.*, 2009).

3.2 Modifications post-traductionnelles des antigènes delta

Les deux protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui sont d'une importance capitale car elles peuvent moduler leurs fonctions et impacter la progression du cycle viral (revu dans Abbas and Afzal, 2013). Ces modifications post-traductionnelles comprennent la phosphorylation de la sérine et de la thréonine, l'acétylation de la lysine, la méthylation de l'arginine, la sumoylation de la lysine ainsi que la farnésylation de la cystéine (Sikora *et al.*, 2009 ; Greco-Stewart and Pelchat, 2010). Pour accomplir ces modifications, le HDV est dépendant des protéines de la cellule hôte (Abbas and Afzal, 2013).

La phosphorylation se produit au niveau des résidus sérine et thréonine de S-HDAg, alors que seuls les résidus sérine sont phosphorylés dans L-HDAg (Choi, Park and Hwang, 2002 ; Greco-Stewart and Pelchat, 2010). En particulier, la phosphorylation de S-HDAg au niveau du résidu sérine-177 est cruciale pour son interaction avec l'ARN polymérase II, et donc pour la réplication du génome (Hong and Chen, 2010). La méthylation de S-HDAg favorise également la réplication de l'ARN du HDV (Li, Stallcup and Lai, 2004 ; Wang *et al.*, 2009). L'acétylation des résidus lysine de S-HDAg et L-HDAg est associée à une modulation de la réplication virale. En effet, l'absence d'acétylation de S-HDAg entraîne sa relocalisation dans le cytoplasme et conduit à la synthèse de L-HDAg plus précocement (Mu *et al.*, 2004). La sumoylation de S-HDAg stimule la synthèse de l'ARN génomique et de l'ARNm, sans effet sur la transcription antigénomique (Tseng *et al.*, 2010). Enfin, la farnésylation de la cystéine du résidu cystéine-211 dans l'extrémité C-terminale de L-HDAg inhibe la réplication de l'ARN viral et facilite l'assemblage des virions en médiant l'interaction directe entre L-HDAg et les protéines d'enveloppe du HBV (Greco-Stewart and Pelchat, 2010).

Le cycle de multiplication du HDV

Les différentes étapes du cycle du HDV sont relativement bien décrites. Cependant, les interactions moléculaires entre le virus et les facteurs de l'hôte, notamment les polymérases cellulaires, ne sont pas encore bien comprises et certaines étapes du cycle viral, telles que l'assemblage des nouveaux virions et leur libération, restent floues ou controversées. Une représentation schématique du cycle de multiplication du HDV est proposée dans la **Figure 12**.

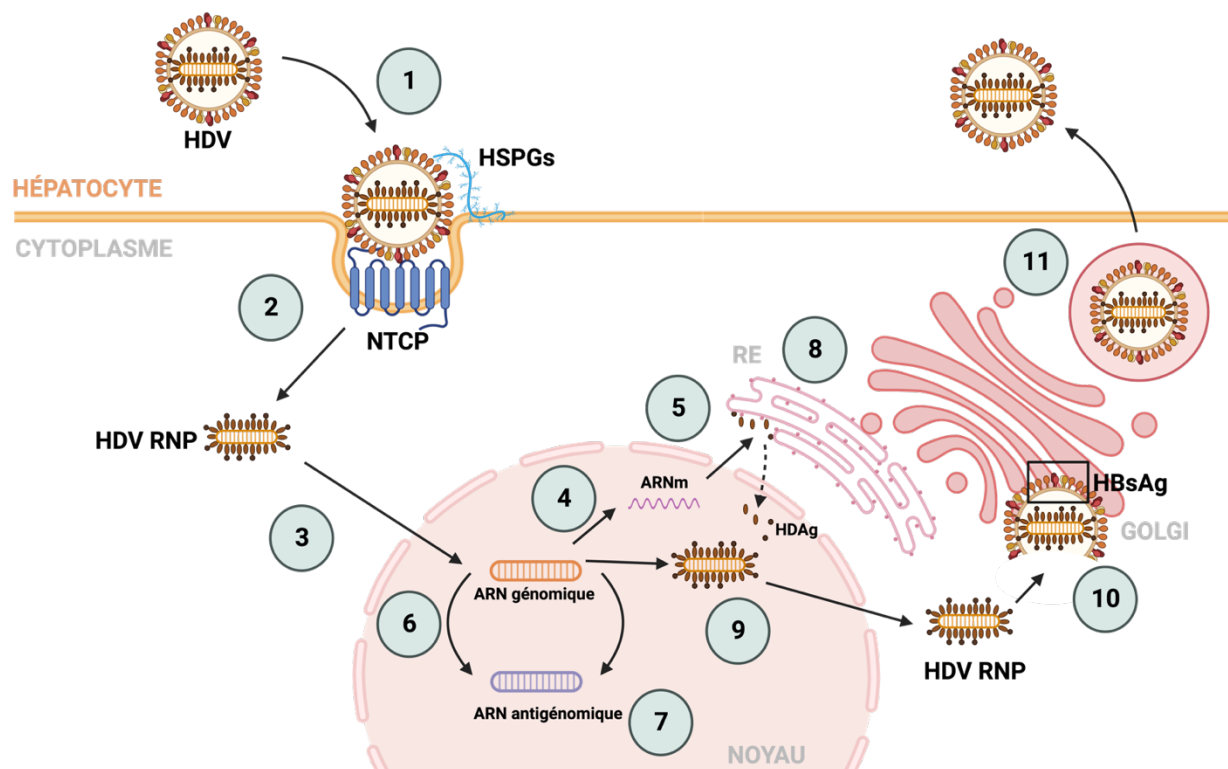


Figure 12 : Modèle du cycle réplcatif du HDV dans un hépatocyte également infecté par le HBV. (1) Attachement de la particule virale aux HSPG, puis interaction spécifique avec le récepteur NTCP ; (2) entrée du virus par endocytose clathrine-dépendante ; (3) la RNP du HDV est transportée jusqu'au noyau pour y relarguer son génome qui sert de matrice pour la transcription en ARNm de l'HDAg (4) à partir duquel la protéine S-HDAg est traduite (5) ; la réplication (6) est réalisée par les polymérases de l'hôte en présence de S-HDAg via un mécanisme en cercle-roulant permettant ainsi la production d'ARN antigénomiques intermédiaires ; l'ARN antigénomique peut être édité par ADAR1 (7) conduisant à la synthèse d'un ARN génomique édité qui sert à la production de L-HDAg ; la farnésylation de L-HDAg est essentielle pour réguler la réplication et l'assemblage des nouveaux virions (8) ; les nouvelles RNP du HDV sont assemblées dans le noyau (9) puis exportées et enveloppées avec les antigènes de surface du HBV (10) ; les nouveaux virions sont sécrétés via l'appareil de Golgi (11) (figure inspirée de Mentha et al., 2019).

1. Attachement et entrée

Le HDV et le HBV partagent les mêmes protéines d'enveloppe. Par conséquent, il est probable que les deux virus pénètrent dans les hépatocytes par une voie commune (Sureau and Negro, 2016). L'infectivité de ces deux virus dépend de deux déterminants, dont l'un est spécifique de l'antigène L-HBsAg, et plus particulièrement des 75 résidus myristoylés de l'extrémité N-terminales du domaine PréS1 (Engelke *et al.*, 2006). Le second déterminant est situé sur la boucle antigénique (AGL pour *antigenic loop*) de la protéine S-HBsAg (Le Duff, Blanchet and Sureau, 2009).

L'entrée du HDV dans la cellule nécessite une première étape indispensable d'attachement de la particule virale à la surface des hépatocytes au niveau des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), dont Glypican 5 (Schulze, Gripon and Urban, 2007 ; Verrier *et al.*, 2016). La liaison du virus aux HSPG est médiée par des interactions électrostatiques entre les HSPG chargés négativement et deux résidus chargés positivement situés dans la boucle antigénique du domaine S présent dans toutes les protéines d'enveloppe du HBV (Sureau and Salisse, 2013). Par conséquent, cette interaction de faible affinité stabilise le virus à la surface de la cellule et favorise sa liaison de haute affinité par l'intermédiaire du domaine PréS1 avec le récepteur d'entrée du HBV et du HDV identifié en 2012, la protéine NTCP (*sodium-taurocholate co-transporting polypeptide*). Cette protéine joue un rôle crucial dans la circulation entéro-hépatique en tant que transporteur des acides biliaires (Yan *et al.*, 2012 ; Ni *et al.*, 2014). La protéine NTCP est codée par le gène *SLC10A1* et est exclusivement exprimée au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes, ce qui suggère que l'hépatotropisme du HBV et du HDV est exclusivement dépendant de la présence du récepteur viral (Urban *et al.*, 2014). La régulation de l'expression membranaire de NTCP est notamment contrôlée par des mécanismes post-traductionnels (Anwer, 2014) et régulée par plusieurs facteurs cellulaires, dont la E-cadhérine. Cette protéine d'adhésion intercellulaire dépendante du calcium et qui est capable de se lier à la protéine NTCP glycosylée, facilitant ainsi sa relocalisation vers la membrane plasmique basolatérale (Hu *et al.*, 2020).

En supposant un mécanisme d'entrée comparable pour le HBV et le HDV, l'entrée du HDV dans la cellule serait médiée par un processus d'endocytose clathrine-dépendante (Herrscher *et al.*, 2020) impliquant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), agissant comme un co-facteur d'entrée qui déclencherait l'internalisation de la particule virale (Iwamoto *et al.*, 2019). Il convient cependant de noter que ces mécanismes ont été décrits pour l'entrée du HBV et qu'il est nécessaire de les valider à l'aide de modèles d'infection appropriés pour le HDV.

2. Transport intracellulaire

Une fois dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN du HDV est transporté vers le noyau grâce à son interaction avec l'HDAg. En effet, S et L-HDAg possèdent un NLS au niveau des acides aminés 66-75 nécessaire à l'entrée nucléaire des RNP du HDV par la caryophérine 2- α , une protéine appartenant au complexe du pore nucléaire assurant la médiation de l'importation des molécules cytoplasmiques dans le noyau (Moroianu *et al.*, 1995 ; Greco-Stewart and Pelchat, 2010).

3. Transcription et traduction

L'ARNm du HDV est principalement transcrit par l'ARN polymérase II car il s'agit de la seule polymérase de l'hôte capable d'interagir avec les enzymes de coiffage pour produire des ARN coiffés (Ramanathan, Robb and Chan, 2016). Parmi les autres protéines susceptibles de participer à la transcription de l'ARNm figurent les protéines impliquées dans l'initiation, l'élongation et la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase II, telles que les hélicases CCAR1 et CDC5L, les protéines hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) et divers facteurs de transcription (Abraham and Pelchat, 2008 ; Cao *et al.*, 2009 ; Sikora *et al.*, 2009).

Par ailleurs, de nombreuses protéines de l'hôte impliquées dans l'épissage des ARNm comme le facteur ASF (Sikora *et al.*, 2009), la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène L (hnRNP L) ou D (hnRNP D) (Mota *et al.*, 2009 ; Sikora *et al.*, 2009), la protéine à doigts de zinc 326 (ZNF326) (Mota *et al.*, 2009), CDC5L (Joshi and Coffin, 2018), SF3B155 (Tavanez *et al.*, 2020), SC35 (Bichko and Taylor, 1996) et la protéine de type ELAV (Mendes *et al.*, 2013) se sont révélées interagir avec l'ARN du HDV, l'HDAg ou les deux. Ces données sont particulièrement intéressantes sachant qu'à l'heure actuelle, aucun phénomène d'épissage n'a été décrit pour les ARNm du HDV (Stephenson-Tsoris and Liang, 2023). Enfin, des études ont révélé que le HDV est capable d'interagir avec la machinerie traductionnelle de l'hôte. On retrouve notamment le facteur d'élongation eucaryote 1A1 (eEF1A1), l'EIF3D, la protéine de liaison du polyadénylate (PABP) et la sous-unité 1 du facteur 2 d'initiation de la traduction eucaryote (Cao *et al.*, 2009 ; Mota *et al.*, 2009 ; Sikora *et al.*, 2009 ; Mendes *et al.*, 2013).

4. Réplication virale

Plusieurs études ont démontré que l'ARN polymérase II, ses facteurs de transcription ainsi que de nombreuses protéines régulatrices positives et négatives jouent un rôle clé dans la réplication de l'ARN du HDV (revu dans Greco-Stewart *et al.*, 2007 ; Lehmann, Brueckner and Cramer, 2007 ; Abraham and Pelchat, 2008 ; Cao *et al.*, 2009 ; Stephenson-Tsoris and Liang,

2023). Cependant, l'identité de l'ARN polymérase cellulaire impliquée dans la réplication de l'ARN antigénomique du HDV à partir d'une matrice génomique fait encore l'objet d'un grand débat. L'ARN antigénomique ne s'étant pas encore avéré être coiffé, ceci soulève la question de l'implication de l'ARN polymérase II. Il a donc été proposé que l'ARN polymérase I soit le principal transcripteur de l'ARN antigénomique, notamment en raison de la colocalisation de l'ARN antigénomique et de l'ARN polymérase I dans le nucléole (Li *et al.*, 2006). Toutefois, d'autres études ont révélé qu'aucune sous-unité spécifique de l'ARN polymérase I ou III n'interagit avec le HDV au cours de la réplication (Cao *et al.*, 2009). Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires afin de pouvoir élucider ce mécanisme dans le futur (Li *et al.*, 2019).

Plus récemment, un criblage par perte de fonction a permis d'identifier l'enzyme CAD comme un facteur clé de la réplication du HDV. De plus, le récepteur des œstrogènes alpha (ESR1), un activateur de CAD, est également important pour la réplication du génome et de l'antigénome du HDV (Verrier *et al.*, 2020). Par ailleurs, il a été démontré que l'ARN du HDV est capable d'interagir avec les protéines de liaison à l'ARN NONO, SFPQ, PSPC1 ainsi qu'avec l'ARNnc NEAT1 présent dans les *paraspeckles* nucléaires (Greco-Stewart, Thibault and Pelchat, 2006 ; Sikora *et al.*, 2009 ; Beeharry *et al.*, 2018). Les *paraspeckles* sont de petits corps sub-nucléaires situés dans l'espace interchromatidien contenant à la fois de l'ARN et des protéines (Fox and Lamond, 2010). Ces derniers seraient impliqués dans la régulation transcriptionnelle, principalement en séquestrant l'ARNm et en éditant l'adénosine-inosine des ARN (Fox and Lamond, 2010).

Enfin, au cours de la réplication en cercle roulant du génome et de l'antigénome du HDV, une ligase cellulaire est nécessaire afin de recirculariser les monomères linéaires produits (revu dans Stephenson-Tsoris and Liang, 2023). Ainsi, les ligases de l'hôte possiblement impliquées comprennent l'ADN ligase 1, agissant comme une ligase d'ARN dans les viroïdes, ou C12orf29, la seule enzyme humaine connue pour catalyser la ligature d'ARN de façon dépendante de l'ATP entre un groupement 5'-P et un groupement 3'-OH (Nohales, Flores and Daròs, 2012 ; Yuan *et al.*, 2023).

5. Assemblage des nouveaux virions

Afin d'exporter l'ARN du HDV hors du noyau, L-HDAg, qui est associé à l'ARN viral, interagit avec une protéine d'interaction avec le signal nucléaire (NESI) grâce à son NES qui s'étend sur les résidus 198 à 210 (Wang *et al.*, 2005). Ce NES permet également la liaison du récepteur cellulaire d'exportation TAP (ou NXF1) et de sa protéine adaptatrice ALY responsables de l'exportation des ARN de l'hôte (Huang *et al.*, 2016).

La farnésylation du domaine C-terminal de L-HDAg permet son interaction avec la membrane lipidique cellulaire et les HBsAg pour l'empaquetage des RNP du HDV (Chang *et al.*, 1991 ; Bordier *et al.*, 2003). Bien que ce mécanisme ne soit pas encore complètement élucidé, des études antérieures ont démontré que la RNP du HBV peut être empaquetée avec les HBsAg-S, M et L, mais que seuls les virions contenant les trois protéines d'enveloppe présentent des signes d'infectivité dans les cellules permissives au HDV (Sureau, Guerra and Lanford, 1993). En outre, la farnésylation de L-HDAg inhibe également la réplication virale par un mécanisme inhibiteur dominant-négatif (Chao, Hsieh and Taylor, 1990 ; Modahl and Lai, 2000).

6. Sécrétion des nouvelles particules virales

Le mécanisme par lequel le HDV est excrété de la cellule n'est à l'heure actuelle pas encore entièrement élucidé. Il semblerait que la sécrétion des nouveaux virions se fasse via l'appareil de Golgi en même temps que celle des particules sous-virales (PSV) non infectieuses du HBV (Huang *et al.*, 2009). Une récente étude suggère par ailleurs l'implication du gène de susceptibilité aux tumeurs 101 (TSG101) dans la libération du HBV (Zheng *et al.*, 2023). Cependant, il est possible que le HDV ne suive pas le même processus de sortie que le HBV, puisque l'HDAg et la RNP peuvent interagir avec différentes protéines de l'hôte. En particulier, il existe une région homologue adaptatrice de la clathrine qui permet à L-HDAg d'interagir avec la chaîne lourde de la clathrine, ce qui pourrait faciliter l'exocytose clathrine-dépendante (Cao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Modèles d'étude de l'entrée et de l'infection par le HDV

1. Résumé

Bien que le cycle de multiplication du HDV soit relativement bien décrit, l'absence de modèles expérimentaux simples a limité l'étude des interactions entre le virus et son hôte, bien qu'elles représentent des cibles thérapeutiques pertinentes. Ces dernières années, la découverte du polypeptide NTCP en tant que récepteur d'entrée du HBV et du HDV a permis de développer de nouveaux modèles de culture cellulaire sensibles à l'infection par le HBV et le HDV. Dans une revue publiée dans *Viruses* en 2021, j'ai résumé les principaux modèles *in vitro* utilisés pour l'étude de l'entrée et de l'infection par le HDV, expliqué leurs avantages et leurs limites, et souligné les perspectives pour le développement futur d'autres modèles.

2. Publication



Cell Culture Models for the Study of Hepatitis D Virus Entry and Infection

[Heuschkel MJ](#), Baumert TF, Verrier ER

Revue publiée dans *Viruses*, Août 2021 (13(8):1532)

Review

Cell Culture Models for the Study of Hepatitis D Virus Entry and Infection

 Margaux J. Heuschkel ¹, Thomas F. Baumert ^{1,2}  and Eloi R. Verrier ^{1,*} 

¹ Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, 67000 Strasbourg, France; margaux.heuschkel@etu.unistra.fr (M.J.H.); thomas.baumert@unistra.fr (T.F.B.)

² Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatologie-Digestif, Nouvel Hôpital Civil, 1 Place de L'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

* Correspondence: e.verrier@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-37-06

Abstract: Chronic hepatitis D is one of the most severe and aggressive forms of chronic viral hepatitis with a high risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC). It results from the co-infection of the liver with the hepatitis B virus (HBV) and its satellite, the hepatitis D virus (HDV). Although current therapies can control HBV infection, no treatment that efficiently eliminates HDV is available and novel therapeutic strategies are needed. Although the HDV cycle is well described, the lack of simple experimental models has restricted the study of host-virus interactions, even if they represent relevant therapeutic targets. In the last few years, the discovery of the sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) as a key cellular entry factor for HBV and HDV has allowed the development of new cell culture models susceptible to HBV and HDV infection. In this review, we summarize the main in vitro model systems used for the study of HDV entry and infection, discuss their benefits and limitations and highlight perspectives for future developments.

Keywords: viral cell entry; hepatitis B virus (HBV); hepatitis D virus (HDV); sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP); hepatoma cell lines; primary hepatocytes



Citation: Heuschkel, M.J.; Baumert, T.F.; Verrier, E.R. Cell Culture Models for the Study of Hepatitis D Virus Entry and Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 1532. <https://doi.org/10.3390/v13081532>

Academic Editor: Stephan Urban

Received: 2 July 2021

Accepted: 29 July 2021

Published: 3 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic hepatitis D constitutes one of the most severe and aggressive forms of chronic viral hepatitis with an accelerated development of liver disease towards fibrosis, cirrhosis, and a high risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC) compared to chronic hepatitis B. It is caused by the hepatitis delta virus (HDV), a small hepatotropic virus discovered in Italy in 1977 [1] belonging to the *Deltavirus* genus [2]. HDV is not only the smallest RNA virus known to interact with a human host, but also an HBV satellite virus whose production and release of viral particles depend on the expression of HBV envelope proteins [3]. Therefore, hepatitis D is the result of either HBV and HDV co-infection or HDV/HBV superinfection in chronically HBV-infected patients [4].

According to a recent meta-analysis, the number of people infected with HDV has been estimated to approximately 12 million worldwide [5]. However, due to significant limitations in reliable epidemiological data and varying geographic distribution, this number is most likely to be underestimated. Other studies have suggested a total of 50 to 72 million cases worldwide with variable prevalence across regions, increasing in developed countries despite the existence of a preventive HBV vaccine that also protects against HDV infection [6,7].

The 35-nm HDV virion is composed of a ribonucleoprotein (RNP) core complex and an HBV-derived envelope. The RNP complex contains an approximately 1.7 kb, single-stranded, circular, and negative-sense RNA genome associated with the two isoforms of the delta antigen (HDAg): small (S-HDAg) and large (L-HDAg). This genome is highly paired in a characteristic rodlike structure similar to plant viroid genomes [8,9]. During virus replication, two other forms of HDV RNA are produced: the replication intermediate

antigenomic RNA and the two forms of HDV mRNA leading to the production of S- and L-HDAg. Both genomic and antigenomic RNA exhibit a ribozyme activity [10]. The virus envelope is composed of an endoplasmic reticulum (ER)-derived lipid bilayer embedding the three HBV envelope proteins: small (S-), medium (M-), and large (L-) HBsAg. These three proteins share a common C-terminal domain named S, corresponding to the small surface antigen (S-HBAG). The medium antigen (M-HBAG) carries an additional hydrophilic N-terminal domain named PreS2. Finally, the N-terminal part of the large antigen (L-HBAG) is characterized by the presence of an additional PreS1 domain [11].

Despite recent progress in the understanding of HDV infection, the treatment of chronic hepatitis D remains challenging. Indeed, HDV is highly dependent on host factors for the completion of its replication cycle. It encodes only one structural protein excluding any polymerase activity that could be targeted by direct antiviral therapy. In addition, attempts to use inhibitors targeting HDV ribozyme activity have been limited by a marked toxicity observed *in vitro* [12]. Moreover, HDV replication is insensitive to nucleos(t)ide analogues used against HBV [13]. Pegylated interferon (peg-IFN)-based therapies, which have been commonly used as a treatment for HDV infection for decades, have numerous side effects and fail to inhibit HBsAg expression, thus causing a rebound of HDV viral load in most patients after treatment cessation [14]. Although current treatments for hepatitis D are not completely satisfying, the discovery of sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) as a bona-fide receptor for HBV and HDV in the last few years has opened new perspectives for a better understanding of the viral cycle, whose different steps, including the virus entry in the cells, may constitute relevant therapeutic targets against HDV infection [15,16]. Indeed, direct host-targeting agents (HTAs) such as the HDV/HBV entry inhibitor Bulvertide (Mycludex B/Hepcludex) which, in July 2020, received conditional marketing authorization in the European Union as the first HDV-specific drug [17,18] or the molecule Lonafarnib, which blocks the interaction between L-HDAg and HBsAg during HDV assembly, represent a suitable and robust option for the development of novel therapeutic strategy [19]. This approach, however, requires a deep understanding of the molecular interactions between the virus and its host, which has been impaired for decades in the case of HDV due to the lack of robust easy-to-use cell culture system for the study of its life cycle. Notably, the molecular mechanisms of virus entry into cells have remained poorly understood until recently.

2. Molecular Virology of HDV Entry

HDV entry into hepatocytes is a multistep process. As HDV and HBV share the same envelope proteins, it is likely that both viruses enter the cells through a common pathway [11]. In this context, it has to be noticed that HDV has been widely studied as a surrogate model for the study of viral entry, given its replication characteristics, which make it an easier virus to handle than HBV. Their infectivity depends on two determinants, one of which is specific to the L-HBAG antigen, and more particularly to the seventy-five myristoylated residues of the N-terminal sequence of PreS1 domain. The second determinant is located on the antigenic loop (AGL) of the S-HBAG protein [11,20–23].

HDV entry requires an essential first step of attachment of the viral particle to the hepatocyte surface through a low-affinity interaction to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), including Glypican 5 [24]. The virus binding to HSPGs is mediated by electrostatic interactions between the negatively charged HSPG and two positively charged residues (Arg122 and Lys141) in the AGL region of the S domain present in all HBV envelope proteins [25]. Therefore, this low-affinity interaction stabilizes the virus at the cell surface and promotes its high-affinity binding via the PreS1 domain to the virus receptor. NTCP is encoded by *SLC10A1* gene and is exclusively expressed at the basolateral membrane of hepatocytes, suggesting that HDV and HBV hepatotropism strongly relies on its expression pattern [26]. The regulation of NTCP membrane expression is notably controlled by post-translational mechanisms [27] and regulated by several host factors, such as E-cadherin,

a calcium-dependent cell–cell adhesion protein capable of binding to glycosylated NTCP, facilitating its relocalization to the basolateral plasma membrane [28].

Assuming a comparable entry mechanism for HBV and HDV, HDV entry into the cell would then be mediated through clathrin-dependent endocytosis [29] involving the epidermal growth factor receptor (EGFR), acting as a host-entry co-factor triggering HBV internalization [30]. It must be noted that these mechanisms were described for HBV entry and would need to be properly validated using HDV infection models to draw a conclusion.

Following endocytosis, enveloped viruses usually continue along the endocytic pathway. For HBV and HDV, this mechanism is not yet fully understood. EGFR activation has been shown to trigger HBV transport to late endosomes/lysosomes. Thus, all these data suggest that HBV/HDV are co-transported with EGFR and NTCP to late endosomes. However, the signals triggering endosomal fusion remain unknown [31].

Although several elements of the HDV and HBV entry process into hepatocytes remain to be elucidated, such as the presence of other entry co-factors, the recent characterization of the virus receptor has killed two birds with one stone. First, it provided a highly valuable target for antiviral therapy. Second, it allowed the development of novel simple in vitro models for the understanding of the full life cycle. These NTCP-overexpressing cell lines represent an attractive complement to the previously existing models, opening a promising perspective for the near characterization of HDV–hepatocyte interactions and novel antiviral targets. Here, we summarize the current models available for the study of HDV entry and infection and discuss their strengths and limitations.

3. Primary Hepatocytes (PHH and PTH)

Primary human hepatocytes (PHHs) are the natural hosts of HBV and HDV and are susceptible and permissive to both virus infections [32]. However, the investigation of HBV/HDV infection in PHHs is restricted by a series of constraints (Table 1). First, their supply is limited. Moreover, PHHs are difficult to manage in culture conditions, do not expand, have a limited lifetime, and rapidly lose their hepatocyte-specific characteristics in culture, such as polarization and the expression of critical hepatocyte markers for HDV infections such as NTCP [33]. This observation may explain why primary hepatocytes are susceptible to HBV and HDV for only a few days after isolation. Furthermore, in addition to restrictive culture conditions including the use of dimethyl sulfoxide (DMSO), the susceptibility of PHHs to virus infection is highly donor-to-donor dependent. Consequently, the number of reproducible studies is limited [32]. Nevertheless, the development of novel technologies in the last few years allowing the long-term culture of primary hepatocytes may help to provide a more stable system for the investigation of viral infection [34].

HBV and HDV can also infect primary cultures of *Tupaia belangeri* hepatocytes (PTH) [35,36]. The use of PTH allowed Yan et al. to elegantly identify NTCP as a receptor for HDV, by characterizing the interactome of a synthetic HBV PreS1-derived peptide, known to bind the virus receptor at the cell surface, thus demonstrating their suitability and high interest for the study of virus entry and infection [15].

To conclude, despite their limitations, primary cultures of hepatocytes are the most relevant in vitro model for the study of HDV infection. Indeed, they exhibit normal hepatic functions such as hepatocyte polarization and the whole presence of hepatic host factors. In addition, they possess a fully functional innate immune system which allows their use to validate HDV-related host factors and to confirm the activity of antiviral molecules [37].

Table 1. In vitro models used for the investigation of HBV and HDV entry and infection. The respective model system and their key benefits and limitations are shown.

Cell Model	Benefits	Limitations
PHH	Natural host of HBV/HDV Physiological model (Hepatic functions) Support complete virus life cycle Functional immune response	Low infection efficiency Donor variability Restrictive culture conditions Supply difficulties
PTH	More reproducible infections than PHH	Non-human cells and limited infection efficiency
HepaRG Cell Line	Exhibit a significant number of physiological liver functions Support infection	Limited infection efficacy Delicate culture conditions Long-term differentiation
Huh7-NTCP/ HepG2-NTCP	Easily available High reproducibility	Only partially mimic hepatocytes High viral inoculum
iHep Cells	Mimic natural hepatocytes Unlimited in supply Support full virus life-cycle	Complex differentiation conditions
Other NTCP-Overexpressing Hepatoma Cell Lines:		
Li23-derived cells	High susceptibility to HBV Different genetic background than HepG2 cells	Only partially mimic hepatocytes
Huh7-END	Stable HDV particle production Study of the full viral life cycle Screening of antiviral drugs	Only partially mimic hepatocytes
Non-Hepatic Human Cell Lines:		
HeLa-NTCP	Mimic more natural infection conditions Susceptibility to HDV but less to HBV	No hepatocyte functions
293T-NE-3NRs	High susceptibility to HBV Mimic more natural infection conditions	No hepatocyte functions Not yet tested with HDV

PHH: primary human hepatocytes; PTH: primary *Tupaia* hepatocytes; iHep cells: induced human hepatocyte-like cells.

4. Differentiated HepaRG Cells

The HepaRG cell line is an immortalized hepatic progenitor cell line derived from a hepatitis C virus (HCV)-induced liver tumor [38]. This cell line has the particularity of conserving a significant number of liver functions and exhibiting a transcriptomic profile comparable to hepatocytes, including the expression of innate immune system factors [39]. For this reason, these cells are widely used for drug metabolism and toxicology tests [37]. Nevertheless, HepaRG cells require a long-term DMSO-mediated differentiation process to acquire susceptibility to HDV infection. These cells are then able to support viral entry and replication, which make them a suitable model for the study of many steps in the HDV life cycle and new drug screening [40]. Notably, the use of the HDV/HepaRG infection system has greatly enhanced the understanding of HBV and HDV entry into cells before the characterization of the receptor, notably demonstrating the importance of virion attachment to HSPGs in the initiation of HDV entry [41]. Taking advantage of the critical step of cell differentiation process in the susceptibility to HDV infection, Ni et al. independently discovered NTCP as a key receptor for both HBV and HDV [16]. By comparing the transcriptomic pattern of non-differentiated and differentiated cells, they isolated NTCP as a main candidate expressed at the cell membrane, exclusively in hepatocytes, and presenting the ability to bind HBV PreS1-derived peptides [16].

Despite many advantages, the HepaRG infection model remains restrictive. Notably, the long-term differentiation process of the cells may affect the reproducibility of the observed results. In addition, culture conditions are delicate, and the infection efficiency

is low, which makes these cells an inadequate model for high-throughput studies [37]. Recently, Lucifora and colleagues proposed a new procedure allowing fast differentiation and efficient HDV-infection of HepaRG cells, opening the way to an easier use of this highly relevant model [42].

5. NTCP-Expressing Cell Lines

5.1. Huh7 and HepG2-Derived Cell Lines

Huh7 and HepG2 cells are two hepatoma-derived cell lines commonly used as a substitute model for hepatocytes, even if they only partially mimic hepatocyte functions [37]. In the context of HDV infection, these cells do not express NTCP and are therefore not susceptible to the virus [37]. Thus, these models do not allow a comprehensive understanding of the full viral cycle, including the early stages of viral entry and trafficking in hepatocytes [43,44]. By contrast, these cells can support complete HDV replication, as their co-transfection with plasmids encoding the HDV genome and HBV envelope proteins leads to the production of recombinant HDV particles able to infect susceptible cells [37].

Thanks to the confirmation of NTCP receptor importance in HBV and HDV infection of hepatocytes, Yan et al. demonstrated that NTCP-overexpressing Huh7 and HepG2 cells became susceptible to HDV infection [15], providing the first HDV-susceptible cancer-derived cell line suitable for high-throughput studies.

Since their development, numerous studies have been conducted using NTCP-overexpressing cell lines to identify new factors involved in HDV infection and to characterize the different steps of the life cycle. Regarding viral entry, they allowed the characterization of the attachment factor GPC5 [24] and the involvement of IL6 in the regulation of NTCP expression [45]. Interestingly, these cells were also used to understand the involvement of NTCP in the entry process of another major hepatotropic virus, HCV [46]. Their ability to support high-throughput genetic screens was recently highlighted by the identification of 191 candidate factors for HDV infection from a drugable siRNA library. Among them were found the estrogen receptor alpha (ESR1) and the triple enzyme CAD involved in pyrimidine biosynthesis and playing a critical role in HDV replication [47]. NTCP-overexpressing cell lines also allowed researchers to highlight the interaction between HDV RNA and the innate immune sensor MDA5 that leads to a robust activation of the type I and III IFN pathway and the expression of several ISGs [48]. Elegantly pointing out an unexpected characteristic of this satellite virus, Giersch et al. took advantage of NTCP-overexpressing cells to demonstrate that HDV may persist by transmitting HDV RNA to dividing cells even in the absence of HBV coinfection. This strong persistence capacities of HDV could also explain why HDV clearance is difficult to achieve in HBV/HDV chronically infected patients [49].

In addition to the characterization of virus-related host factors or specific characteristics of the viral life cycle, these cell lines have been used to test antiviral agents, notably through targeting NTCP such as Myrcludex B, a lipopeptide derived from the HBV envelope protein, which has been shown to inhibit HBV and HDV entry in hepatocytes [50]. Additional small molecules, such as cyclosporin A [51,52], irbesartan [53,54], and vanitaracin A have demonstrated antiviral against HBV and HDV in NTCP-overexpressing cells [55].

Thus, these innovative cell culture systems are useful tools to improve our understanding of the HDV life cycle. Indeed, they have the advantage of infinite cells' proliferation. However, a limit of these models concerns the genetic and metabolic differences compared to hepatocytes [37]. In addition, they require a high viral inoculum in contrast to infection under physiological conditions. Therefore, validation steps in alternative model systems are recommended, including PHH or suitable *in vivo* models such as human liver chimeric mice or transgenic mice expressing a chimeric version of NTCP [56,57].

5.2. Other NTCP-Overexpressing Hepatoma Cell Lines

The key role of the NTCP cellular receptor in HBV and HDV entry has also allowed the development of other hepatoma cell lines overexpressing this factor, such as human cell line Li23-derived cells overexpressing NTCP (A8 cells subcloned from Li23 cells), whose gene expression profile is distinct from that of HepG2-NTCP or Huh7-NTCP cells. As the HBV susceptibility of A8 cells was far weaker than HepG2-NTCP cells, Ueda et al., successfully established a new cell line A8.15.78.10 exhibiting high HBV susceptibility comparable to HepG2-NTCP cells by repeated subcloning of A8 cells. The characterization of this new cell line demonstrated that the increase in HBV susceptibility was associated with an increase in the protein and glycosylation levels of NTCP, as well as to a reduction of STING expression [58].

In addition, by stably transducing HepG2 cells with genes encoding the NTCP-receptor and the HBV envelope proteins, Lempp et al. produce a cell line (HepNB2.7) that allows continuous secretion of infectious progeny HDV following primary infection. This cell line supports the complete HDV replication cycle and presents a convenient tool for antiviral drug evaluation [59]. The same group recently produced the Huh7-END cell line generated through stepwise stable integration of the cDNA of the HDV antigenome, the genes for the HBV envelope proteins and the HBV/HDV receptor NTCP. These cells can release HDV particles and are susceptible to de novo HDV entry. Thus, Huh7-END cells are a novel tool for the screening of antiviral drugs targeting HDV [60].

6. In Vitro Model Systems Based on Engineered Non-Hepatic Cell Lines

As an alternative strategy for the comprehensive characterization of the virus life cycle, recapitulating virus infection in non-hepatic cells may allow us to discriminate the key number of liver-specific factors required for virus infection. In this context, the expression of hNTCP in the non-hepatic human HeLa cells or in mouse-derived cells confers susceptibility to HDV while HBV is still restricted, suggesting that hNTCP, critical for viral entry, may be the only cell-specific factor limiting HDV infection [61].

Moreover, Yang et al. developed a non-hepatic cell culture model by exogenous expression of four host genes, which are the HBV/HDV entry receptor NTCP and the three nuclear hormone receptors HNF4 α , RXR α and PPAR α , in human non-hepatic 293T cells. 293T or HEK 293T is a human cell line derived from human embryonic kidney 293 cells (HEK293 cell line) that expresses a mutant version of the SV40 large T antigen, and that is commonly used in biology for protein expression or the production of recombinant retrovirus. The results obtained by Yang et al., indicated that this cell culture model supports HBV entry, transcription, and replication, as evidenced by the detection of HBV pgRNA, HBV cccDNA, HBsAg, HBeAg, HBcAg and HBV DNA. Interestingly, these 293T-NE-3NRs cells were successfully infected with HBV even at low GEq which mimics natural physiological conditions more accurately [62]. Contrary to HBV, HDV does not seem to require the expression of these hepatocyte-enriched transcription factors. Although not tested in the study, NTCP-expressing 293T cells should be susceptible to HDV infection.

7. In Vitro Model Systems Based on Induced Human Hepatocyte-Like Cells

Recent advances in cell reprogramming techniques made possible the production of induced human hepatocyte-like cells (iHep). These cells are generated from induced pluripotent stem cells or by induced differentiation of human embryonic stem cells and exhibit at least some aspects of the innate immune response. They are expected to have more physiological characteristics of human hepatocytes than cell lines and can support the full life cycle of HBV, including the spread of the virus between cells due to the long-term maintenance of hepatic differentiation. iHep cells are virtually unlimited, appropriate for genetic manipulation, and recapitulate infected hepatocytes in humans [63–65]. Additional solid data including strategies to optimize or transdifferentiate pluripotent stem cells would be required to assess the ability of these systems to be deeply used for the study of HBV and HDV infection [66].

8. Conclusions and Perspectives

Despite recent advances in the field, *in vitro* models for the study of HDV entry and infection remain imperfect and are individually limited by a series of constraints (Table 1). Indeed, primary hepatocytes are difficult to handle in culture and have a restricted capacity of infection by HDV. In the same way, HepaRG cells require specific culture conditions and a long differentiation process, thus limiting their availability for high-throughput studies [37]. In addition, the development of NTCP-overexpressing hepatoma cell lines has led to major discoveries in the understanding of the interactions between HDV and hepatocyte host factors. However, these cancer cells only possess a limited amount of human hepatocyte features, making them an interesting but limited model system in recapitulating the complex biology of hepatocytes [67]. Thus, other models for studying HDV and HBV infection have been developed to simulate the conditions of infection as closely as possible, such as systems based on induced human hepatocyte-like cells.

In this context, systems based on organoid cultures have been recently developed as a substitute *in vitro* model to mimic tissues. This may help to join the gap between 2D cultures and *in vivo* mouse or human models [68]. Liver organoids have been produced for multiple species derived from induced embryonic stem cells, pluripotent stem cells, hepatoblasts, and adult tissue-derived cells. They recapitulate the complexity of the liver, maintain innate immune responses, and retain cell polarity, thus mimicking the natural entry of HBV and HDV. This system is an advancement in the models for generating fundamental knowledge of HBV and HDV biology and providing a promising platform toward screening potential new therapies and the development of customized hepatitis treatment [69]. However, these models require specific culture conditions [68] and solid data on their infection by HDV are still required at the time of this review.

To conclude, the recent advances in HDV and HBV biology provide a series of highly complementary models that can be used to cover of the aspects of the HDV life cycle through a broad battery of molecular approaches. The integration of different models coupled with validation in existing *in vivo* models may help to rapidly conduct a comprehensive overview of the molecular interactions between HDV and its specific host, for the development of new therapeutic strategies to tackle this worldwide health threat.

Funding: This research was funded by the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS, ECTZ104527). This work has been published under the framework of the LabEx ANR-10-LAB-28 and benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the Future (Investissements d’Avenir) program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rizzetto, M.; Canese, M.G.; Aricò, S.; Crivelli, O.; Trepo, C.; Bonino, F.; Verme, G. Immunofluorescence Detection of New Antigen-Antibody System (Delta/Anti-Delta) Associated to Hepatitis B Virus in Liver and in Serum of HbsAg Carriers. *Gut* **1977**, *18*, 997–1003. [\[CrossRef\]](#)
2. Magnusius, L.; Taylor, J.; Mason, W.S.; Sureau, C.; Deny, P.; Norder, H. ICTV virus taxonomy profile: Deltavirus. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 1565–1566. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Rizzetto, M.; Canese, M.G.; Gerin, J.L.; London, W.T.; Sly, D.L.; Purcell, R.H. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 590–602. [\[CrossRef\]](#)
4. Huang, C.R.; Lo, S.J. Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 14589–14597. [\[CrossRef\]](#)
5. Stockdale, A.J.; Kreuels, B.; Henrion, M.Y.R.; Giorgi, E.; Kyomuhangi, I.; de Martel, C.; Hutin, Y.; Geretti, A.M. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.* **2020**, *73*, 523–532. [\[CrossRef\]](#)

6. Chen, H.Y.; Shen, D.T.; Ji, D.Z.; Han, P.C.; Zhang, W.M.; Ma, J.F.; Chen, W.S.; Goyal, H.; Pan, S.; Xu, H.G. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: A systematic review and meta-analysis. *Gut* **2019**, *68*, 512–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Miao, Z.; Zhang, S.; Ou, X.; Li, S.; Ma, Z.; Wang, W.; Peppelenbosch, M.P.; Liu, J.; Pan, Q. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 1677–1687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wang, K.S.; Choo, Q.L.; Weiner, A.J.; Ou, J.H.; Najarian, R.C.; Thayer, R.M.; Mullenbach, G.T.; Denniston, K.J.; Gerin, J.L.; Houghton, M. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* **1986**, *323*, 508–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kos, A.; Dijkema, R.; Arnberg, A.C.; van der Meide, P.H.; Schellekens, H. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA. *Nature* **1986**, *323*, 558–560. [[CrossRef](#)]
10. Kuo, M.Y.; Sharmeen, L.; Dinter-Gottlieb, G.; Taylor, J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4439–4444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sureau, C.; Negro, F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, S102–S116. [[CrossRef](#)]
12. Buchmann, B.; Döhner, K.; Schirdewahn, T.; Sodeik, B.; Manns, M.P.; Wedemeyer, H.; Ciesek, S.; von Hahn, T. A screening assay for the identification of host cell requirements and antiviral targets for hepatitis D virus infection. *Antivir. Res.* **2017**, *141*, 116–123. [[CrossRef](#)]
13. Farci, P.; Chessa, L.; Balestrieri, C.; Serra, G.; Lai, M.E. Treatment of chronic hepatitis D. *J. Viral Hepat.* **2007**, *14*, 58–63. [[CrossRef](#)]
14. Asselah, T.; Loureiro, D.; Tout, I.; Castelnau, C.; Boyer, N.; Marcellin, P.; Mansouri, A. Future treatments for hepatitis delta virus infection. *Liver Int.* **2020**, *40*, 54–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yan, H.; Zhong, G.; Xu, G.; He, W.; Jing, Z.; Gao, Z.; Huang, Y.; Qi, Y.; Peng, B.; Wang, H.; et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **2012**, *1*, e00049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ni, Y.; Lempp, F.A.; Mehrle, S.; Nkongolo, S.; Kaufman, C.; Fälth, M.; Stindt, J.; Königer, C.; Nassal, M.; Kubitz, R.; et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1070–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Urban, S.; Neumann-Haefelin, C.; Lampertico, P. Hepatitis D virus in 2021: Virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut* **2021**, *2020*, 323888.
18. Loglio, A.; Ferenci, P.; Uceda Renteria, S.C.; Tham, C.Y.L.; van Bömmel, F.; Borghi, M.; Holzmann, H.; Perbellini, R.; Trombetta, E.; Giovanelli, S.; et al. Excellent safety and effectiveness of high-dose myrcludex-B monotherapy administered for 48 weeks in HDV-related compensated cirrhosis: A case report of 3 patients. *J. Hepatol.* **2019**, *71*, 834–839. [[CrossRef](#)]
19. Deterding, K.; Wedemeyer, H. Beyond Pegylated Interferon-Alpha: New Treatments for Hepatitis Delta. *AIDS Rev.* **2019**, *21*, 126–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Blanchet, M.; Sureau, C. Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Pre-S Domain Are Confined to the N-Terminal 75 Amino Acid Residues. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5841–5849. [[CrossRef](#)]
21. Chouteau, P.; Le Seyec, J.; Cannie, I.; Nassal, M.; Guguen-Guillouzo, C.; Gripon, P. A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **2001**, *75*, 11565–11572. [[CrossRef](#)]
22. Le Du, Y.; Blanchet, M.; Sureau, C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12443–12451. [[CrossRef](#)]
23. Le Seyec, J.; Chouteau, P.; Cannie, I.; Guguen-Guillouzo, C.; Gripon, P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2052–2057. [[CrossRef](#)]
24. Verrier, E.R.; Colpitts, C.C.; Bach, C.; Heydmann, L.; Weiss, A.; Renaud, M.; Durand, S.C.; Habersetzer, F.; Durantel, D.; Abou-Jaoudé, G.; et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* **2016**, *63*, 35–48. [[CrossRef](#)]
25. Sureau, C.; Salisse, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* **2013**, *57*, 985–994. [[CrossRef](#)]
26. Taylor, J.M. Replication of the hepatitis delta virus RNA genome. *Adv. Virus Res.* **2009**, *74*, 103–121. [[PubMed](#)]
27. Anwer, M.S. Role of protein kinase C isoforms in bile formation and cholestasis. *Hepatology* **2014**, *60*, 1090–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hu, Q.; Zhang, F.; Duan, L.; Wang, B.; Ye, Y.; Li, P.; Li, D.; Yang, S.; Zhou, L.; Chen, W. E-cadherin Plays a Role in Hepatitis B Virus Entry Through Affecting Glycosylated Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Distribution. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Herrscher, C.; Pastor, F.; Burlaud-Gaillard, J.; Dumans, A.; Seigneuret, F.; Moreau, A.; Blanchard, E. Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell. Microbiol.* **2020**, *22*, e13205. [[CrossRef](#)]
30. Iwamoto, M.; Saso, W.; Sugiyama, R.; Ishii, K.; Ohki, M.; Nagamori, S.; Suzuki, R.; Aizaki, H.; Ryo, A.; Yun, J.H.; et al. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 8487–8492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Herrscher, C.; Roingeard, P.; Blanchard, E. Hepatitis B Virus Entry into Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Gripon, P.; Diot, C.; Theze, N.; Fourel, I.; Loreal, O.; Brechot, C.; Guguen-Guillouzo, C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4136–4143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zeisel, M.B.; Lucifora, J.; Mason, W.S.; Sureau, C.; Beck, J.; Levrero, M.; Kann, M.; Knolle, P.A.; Benkirane, M.; Durantel, D.; et al. Towards an HBV cure: State-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut* **2015**, *64*, 1314–1326. [[CrossRef](#)]
34. Levy, G.; Bomze, D.; Heinz, S.; Ramachandran, S.D.; Noerenberg, A.; Cohen, M.; Shibolet, O.; Sklan, E.; Braspenning, J.; Nahmias, Y. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 1264–1271. [[CrossRef](#)]
35. Walter, E.; Keist, R.; Niederost, B.; Pult, I.; Blum, H.E. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* **1996**, *24*, 1–5. [[CrossRef](#)]
36. Kock, J.; Nassal, M.; MacNelly, S.; Baumert, T.F.; Blum, H.E.; von Weizsacker, F. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.* **2001**, *75*, 5084–5089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Verrier, E.R.; Colpitts, C.C.; Schuster, C.; Zeisel, M.B.; Baumert, T.F. Cell culture models for the investigation of hepatitis B and D virus infection. *Viruses* **2016**, *8*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Andersson, T.B.; Kanebratt, K.P.; Kenna, J.G. The HepaRG cell line: A unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 909–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Luangsay, S.; Gruffaz, M.; Isorce, N.; Testoni, B.; Michelet, M.; Faure-Dupuy, S.; Maadadi, S.; Ait-Goughoulte, M.; Parent, R.; Rivoire, M.; et al. Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 1314–1322. [[CrossRef](#)]
40. Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Le Seyec, J.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C.; Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15655–15660. [[CrossRef](#)]
41. Schulze, A.; Gripon, P.; Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **2007**, *46*, 1759–1768. [[CrossRef](#)]
42. Lucifora, J.; Michelet, M.; Salvetti, A.; Durantel, D. Fast Differentiation of HepaRG Cells Allowing Hepatitis B and Delta Virus Infections. *Cells* **2020**, *9*, 2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sells, M.A.; Chen, M.L.; Acs, G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1005–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sureau, C.; Romet-Lemonne, J.L.; Mullins, J.L.; Essex, M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* **1986**, *47*, 37–47. [[CrossRef](#)]
45. Bouezzedine, F.; Fardel, O.; Gripon, P. Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology* **2015**, *481*, 34–42. [[CrossRef](#)]
46. Verrier, E.R.; Colpitts, C.C.; Bach, C.; Heydmann, L.; Zona, L.; Xiao, F.; Thumann, C.; Crouchet, E.; Gaudin, R.; Sureau, C.; et al. Solute Carrier NTCP Regulates Innate Antiviral Immune Responses Targeting Hepatitis C Virus Infection of Hepatocytes. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 1357–1368. [[CrossRef](#)]
47. Verrier, E.R.; Weiss, A.; Bach, C.; Heydmann, L.; Turon-Lagot, V.; Kopp, A.; El Saghire, H.; Crouchet, E.; Pessaux, P.; Garcia, T.; et al. Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* **2020**, *69*, 158–167. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, Z.; Filzmayer, C.; Ni, Y.; Sultmann, H.; Mutz, P.; Hiet, M.S.; Vondran, F.W.R.; Bartenschlager, R.; Urban, S. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 25–35. [[CrossRef](#)]
49. Giersch, K.; Bhadra, O.D.; Volz, T.; Allweiss, L.; Riecken, K.; Fehse, B.; Lohse, A.W.; Petersen, J.; Sureau, C.; Urban, S.; et al. Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. *Gut* **2019**, *68*, 150–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Baumert, T.F.; Verrier, E.R.; Nassal, M.; Chung, R.T.; Zeisel, M.B. Host-targeting agents for treatment of hepatitis B virus infection. *Curr. Opin. Virol.* **2015**, *14*, 41–46. [[CrossRef](#)]
51. Iwamoto, M.; Watashi, K.; Tsukuda, S.; Aly, H.H.; Fukasawa, M.; Fujimoto, A.; Suzuki, R.; Aizaki, H.; Ito, T.; Koiwai, O.; et al. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 808–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nkongolo, S.; Ni, Y.; Lempp, F.A.; Kaufman, C.; Lindner, T.; Esser-Nobis, K.; Lohmann, V.; Mier, W.; Mehrle, S.; Urban, S. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 723–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Blanchet, M.; Sureau, C.; Labonté, P. Use of FDA approved therapeutics with hNTCP metabolic inhibitory properties to impair the HDV lifecycle. *Antiviral. Res.* **2014**, *106*, 111–115. [[CrossRef](#)]
54. Ko, C.; Park, W.J.; Park, S.; Kim, S.; Windisch, M.P.; Ryu, W.S. The FDA-approved drug irbesartan inhibits HBV-infection in HepG2 cells stably expressing sodium taurocholate co-transporting polypeptide. *Antivir. Ther.* **2015**, *20*, 835–842. [[CrossRef](#)]
55. Kaneko, M.; Watashi, K.; Kamisuki, S.; Matsunaga, H.; Iwamoto, M.; Kawai, F.; Ohashi, H.; Tsukuda, S.; Shimura, S.; Suzuki, R.; et al. A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11945–11953. [[CrossRef](#)]
56. Allweiss, L.; Dandri, M. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **2016**, *64* (Suppl. S1), S17–S31. [[CrossRef](#)]
57. Yan, H.; Peng, B.; He, W.; Zhong, G.; Qi, Y.; Ren, B.; Li, W. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7977–7991. [[CrossRef](#)]

58. Ueda, Y.; Gu, W.; Dansako, H.; Nishitsuji, H.; Satoh, S.; Shimotohno, K.; Kato, N. A new hepatoma cell line exhibiting high susceptibility to hepatitis B virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *515*, 156–162. [[CrossRef](#)]
59. Lempp, F.A.; Schlund, F.; Rieble, L.; Nussbaum, L.; Link, C.; Zhang, Z.; Urban, S. Recapitulation of HDV infection in a fully permissive hepatoma cell line allows efficient drug evaluation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ni, Y.; Zhang, Z.; Engelskircher, L.; Verch, G.; Tu, T.; Lempp, F.A.; Urban, S. Generation and characterization of a stable cell line persistently replicating and secreting the human hepatitis delta virus. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Lempp, F.A.; Mutz, P.; Lipps, C.; Wirth, D.; Bartenschlager, R.; Urban, S. Evidence that hepatitis B virus replication in mouse cells is limited by the lack of a host cell dependency factor. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 556–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yang, X.; Cai, W.; Sun, X.; Bi, Y.; Zeng, C.; Zhao, X.; Zhou, Q.; Xu, T.; Xie, Q.; Sun, P.; et al. Defined host factors support HBV infection in non-hepatic 293T cells. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 2507–2518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Shlomai, A.; Schwartz, R.E.; Ramanan, V.; Bhatta, A.; de Jong, Y.P.; Bhatia, S.N.; Rice, C.M. Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12193–12198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Xia, Y.; Carpentier, A.; Cheng, X.; Block, P.D.; Zhao, Y.; Zhang, Z.; Liang, T.J. Human stem cell-derived hepatocytes as a model for hepatitis B virus infection, spreading and virus-host interactions. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, 494–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kaneko, S.; Kakinuma, S.; Asahina, Y.; Kamiya, A.; Miyoshi, M.; Tsunoda, T.; Watanabe, M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hu, J.; Lin, Y.Y.; Chen, P.J.; Watashi, K.; Wakita, T. Cell and Animal Models for Studying Hepatitis B Virus Infection and Drug Development. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 338–354. [[CrossRef](#)]
67. Witt-Kehati, D.; Bitton Alaluf, M.; Shlomai, A. Advances and Challenges in Studying Hepatitis B Virus In Vitro. *Viruses* **2016**, *8*, 21. [[CrossRef](#)]
68. Wose Kinge, C.N.; Bhoola, N.H.; Kramvis, A. In Vitro Systems for Studying Different Genotypes/Sub-Genotypes of Hepatitis B Virus: Strengths and Limitations. *Viruses* **2020**, *12*, 353. [[CrossRef](#)]
69. Prior, N.; Inacio, P.; Huch, M. Liver organoids: From basic research to therapeutic applications. *Gut* **2019**, *68*, 2228–2237. [[CrossRef](#)]

Infection par le HDV et réponse antivirale innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'hôte en cas d'infection par un agent pathogène. Elle se met en place très rapidement, est peu spécifique et possède la capacité de faire la distinction entre le soi et le non-soi, ainsi qu'entre différentes classes d'agents pathogènes. L'immunité innée repose sur l'activation de récepteurs membranaires ou cytosoliques, les PRR (*pattern recognition receptors*), chargés de reconnaître de manière constitutive des motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). Lorsque ces récepteurs sont activés, les cellules qui les expriment (macrophages, cellules dendritiques, cellules NK (*natural killer*)) agissent directement sur l'agent infectieux pour le détruire ou limiter sa propagation. Bien qu'elle ne permette pas de développer une mémoire immunologique, l'immunité innée constitue une barrière essentielle et précoce contre les infections virales (revu dans Georgel and Bahram, 2006).

Dans le cadre d'une infection par le HDV, les réponses immunitaires développées par l'organisme ainsi que les mécanismes de contre-défense du virus ne sont pas encore complètement élucidés. Néanmoins, les interactions entre le HDV et les acteurs de l'immunité innée semblent jouer un rôle important dans l'infection des hépatocytes et le développement de la maladie, d'où l'importance de poursuivre les études sur le sujet.

1. Activation des voies de signalisation impliquées dans la défense antivirale innée

Dans le cadre des infections virales, des modifications caractéristiques des génomes viraux, des intermédiaires de la réplication virale, des ARNm ainsi que des structures d'ARN particulières qui sont normalement absentes dans les cellules eucaryotes peuvent être reconnus par deux familles de PRR : d'une part les récepteurs endosomaux de type TLR (*toll-like receptors*), d'autre part les récepteurs cytosoliques de type RLR (*RIG-I like receptors*). Ces PRR se composent de deux membres activateurs, RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) ainsi que d'une troisième molécule accessoire appelée LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) (**Figure 13**). Alors que MDA5 détecte les ARN double brin de grande taille, RIG-I reconnaît le groupement 5'-triphosphate à l'extrémité des ARN double brin courts ou des structures en épingle à cheveux (revu dans Jung, Altstetter and Protzer, 2020).

L'interaction des RLR avec leurs motifs d'ARN spécifiques entraîne des changements de conformation intramoléculaires, exposant leur domaine N-terminal d'activation et de

recrutement des caspases (CARD) pour interagir avec le domaine CARD d'une autre protéine, la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS). En conséquence, l'activation des MAVS déclenche des cascades de signalisation à partir du site de détection en stimulant l'activité de divers facteurs de transcription comme le facteur $\text{NF}\kappa\text{B}$ (*nuclear factor-kappa B*) ou les IRF (*interferon regulatory factors*) afin de transférer l'information au noyau et déclencher un programme de transcription spécifique qui confère un état antiviral à l'hôte. Parmi les gènes dont l'expression est stimulée, nous retrouvons diverses cytokines comme les interleukines (IL) ou les interférons (IFN).

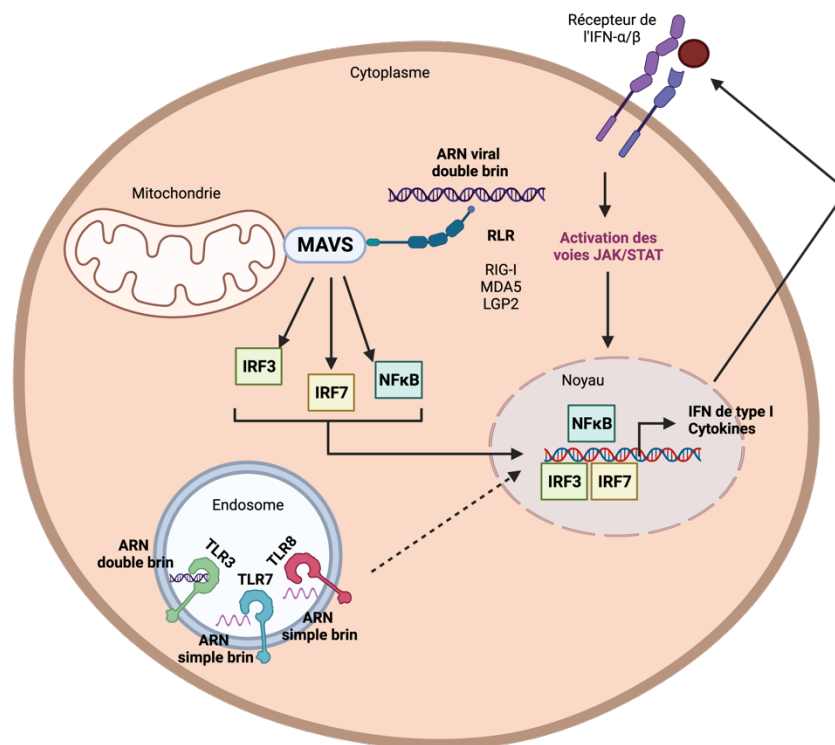


Figure 13 : Voies de signalisation activées suite à la détection des ARN viraux par les RLR et les TLR. L'ARN viral intracellulaire est détecté par les récepteurs endosomaux de type TLR et les récepteurs cytoplasmiques de type RLR. La stimulation de ces récepteurs induit une cascade de signalisation dont l'étape ultime est l'activation de facteurs de transcription tels que les IRF 3 ou 7 et $\text{NF}\kappa\text{B}$. Ces derniers peuvent ensuite migrer jusqu'au noyau et se fixer sur les promoteurs de plusieurs gènes afin d'activer leur transcription. Parmi ces gènes, on retrouve diverses cytokines à activité antivirale ainsi que les IFN, notamment de type I. Les molécules d'IFN sécrétées vont ensuite pouvoir se fixer au niveau de leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules et initier la transduction de signaux impliquant les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT (figure inspirée de Jung, Altstetter and Protzer, 2020)

2. Les interférons (IFN)

Les IFN sont des glycoprotéines de la famille des cytokines découvertes en 1957 par Isaacs et Lindenmann (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ces dernières ont été nommées ainsi car elles interfèrent avec la réplication des virus. En effet, les IFN vont émettre des signaux

agissant de manière autocrine et paracrine, ce qui entraîne un état antiviral qui protège à la fois les cellules infectées et non infectées (revu dans Jung, Altstetter and Protzer, 2020).

Il existe trois familles distinctes d'interférons. La famille des IFN de type I est une famille de cytokines qui code pour 13 sous-types d'IFN- α partiellement homologues chez l'Homme, un seul IFN- β et plusieurs autres protéines nommées IFN- ε , IFN- τ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ , et IFN- ζ . La famille des IFN de type II se compose d'un seul membre, l'IFN- γ , qui est principalement produit par les lymphocytes T et les cellules NK. Enfin, la famille des IFN de type III comprend l'IFN- λ 1, l'IFN- λ 2, l'IFN- λ 3 et l'IFN- λ 4 qui ont des fonctions similaires aux cytokines de la famille des IFN de type I, mais une activité plus restreinte puisque l'expression de leurs récepteurs est largement limitée aux surfaces des cellules épithéliales (revu dans Negishi, Taniguchi and Yanai, 2018).

Les IFN de type I et III sont impliqués dans l'immunité innée antivirale dans la plupart des cellules de l'organisme, tandis que le type II joue un rôle de molécule de communication entre les cellules spécialisées du système immunitaire. L'être humain possède 21 gènes codant pour des interférons. Chez les vertébrés, la quasi-totalité des cellules peut produire des IFN de type I. Les IFN de type III sont aussi produits par plusieurs types cellulaires mais semblent plus spécifiques des tissus fortement exposés aux infections virales comme les muqueuses (revu dans Jung, Altstetter and Protzer, 2020).

En tant que molécules de communication intercellulaire, les IFN sécrétés par les cellules productrices vont diffuser dans le milieu extracellulaire et se lier à leur récepteur spécifique à la surface cellulaire pour initier la transduction de signaux via les voies impliquant les kinases JAK (*janus kinase*) et les facteurs de transcription STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (**Figure 13**). Les interférons α et β possèdent un récepteur commun formé de l'hétérodimère entre les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. Les interférons λ se fixent, quant à eux, sur un récepteur qui leur est spécifique et qui est formé par les sous-unités IFNLR1 et IL-10R2 (revu dans Majzoub, Wrensch and Baumert, 2019).

3. Les voies de signalisation JAK/STAT

Les protéines JAK et STAT sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée. Le principe de transmission du signal repose sur la fixation de ligands extracellulaires au niveau de récepteurs membranaires monomériques, ce qui va entraîner la dimérisation de leurs deux sous-unités, et par conséquent activer les kinases JAK qui leur sont associées. Une fois activées, ces kinases vont à leur tour phosphoryler les facteurs de transcription cytosoliques STAT favorisant ainsi leur dimérisation. Ce changement de conformation des protéines STAT

permet leur migration dans le noyau où elles vont se fixer sur le promoteur de plusieurs gènes à activité antivirale afin de stimuler leur transcription. À ce jour, quatre kinases JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) ainsi que sept facteurs de transcription STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6) sont connus (revu dans Philips *et al.*, 2022).

Étant donné l'importance des voies de signalisation JAK/STAT, en particulier dans la signalisation des cytokines, les cellules disposent d'une variété de mécanismes de régulation faisant notamment appel aux protéines PIAS (*protein inhibitors of activated STAT*), PTP (*protein tyrosine phosphatases*) et SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) (revu dans Hu *et al.*, 2021).

3.1 Activation de STAT1 et STAT3 par les IFN

Lors d'une infection virale, les IFN peuvent initier un programme transcriptionnel antiviral passant par STAT1 et STAT2. En effet, en réponse à une stimulation par les IFN de type II, JAK1 peut phosphoryler STAT1 qui forme alors des homodimères ou des hétérodimères avec STAT3, capables de se fixer au niveau de la séquence promotrice GAS (*interferon-gamma-activated sequence*). L'activation de STAT1 lors d'une stimulation par les IFN de type I conduit en revanche à la formation d'hétérodimères STAT1/STAT2 qui peuvent se fixer au niveau de la séquence promotrice ISRE (*IFN-sensitive response element*). Dans les deux cas, l'activation de STAT1 stimule l'expression de gènes à activité antivirale en favorisant l'inflammation, l'apoptose et en inhibant la prolifération cellulaire (Khodarev, Roizman and Weichselbaum, 2012). Par ailleurs, l'activation de STAT3 par les IFN entraîne un rétrocontrôle négatif de la voie passant par STAT1 grâce à l'expression de gènes anti-inflammatoires qui stimulent la survie et la prolifération cellulaire (revu dans Roca Suarez *et al.*, 2018).

3.2 Activation de STAT3 par l'IL-6

L'activation du facteur de transcription NF κ B induit la production de cytokines telles que l'IL-6 qui va permettre l'activation de la voie impliquant JAK1 et STAT3 après sa fixation sur des récepteurs spécifiques. L'activation par STAT3 de gènes régulés par l'IL-6 va jouer un rôle important dans la régénération du foie en permettant la transduction de signaux pro-mitotiques (Cong *et al.*, 2012). L'activation du récepteur à l'IL-6 induit également l'expression d'une autre classe de gènes activés par STAT3 et qui comprend SOCS3 (*suppressor of cytokines signaling 3*), un suppresseur de la signalisation des cytokines qui inhibe l'activation des facteurs de transcription STAT grâce à une boucle de rétrocontrôle négatif (revu dans Roca Suarez *et al.*, 2018).

3.3 Interférences des voies JAK/STAT avec d'autres voies de signalisation

Les interférences entre les composants de la voie JAK/STAT et ceux d'autres voies de signalisation sont complexes, se produisent à différents niveaux et impliquent diverses molécules, telles que des récepteurs, les JAK, les STAT et des facteurs de transcription. Dans ce contexte, les voies JAK/STAT peuvent notamment interférer avec la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinases*) (revu dans Hu *et al.*, 2021).

Les voies des MAPK sont des voies de signalisation complexes qui régulent diverses activités cellulaires, telles que l'inflammation, l'apoptose, la prolifération et la différenciation. La famille des MAPK comprend trois sous-familles principales : les kinases ERK (*extracellular regulated kinases*), les kinases JNK (*c-jun-N-terminal kinase*) et les MAP14. La voie de signalisation JNK, bien connue pour son rôle dans les activités cellulaires, est impliquée à la fois dans l'apoptose et dans la survie des cellules cancéreuses. Par exemple, JNK est un médiateur de la prolifération cellulaire compensatoire dans les tumeurs. Néanmoins, en régulant le gène *fos* et le gène pro-apoptotique *hid*, la voie JAK/STAT et l'effecteur en aval ZFH2 favorisent la survie cellulaire médiée par JNK et inhibent l'apoptose cellulaire médiée par JNK (Wu *et al.*, 2019). Par ailleurs, une protéine importante pour la signalisation MAPK/ERK, appelée GRB2, possède un domaine SH2 et peut donc se lier aux récepteurs phosphorylés par les JAK. GRB2 agit alors pour permettre à la voie MAPK/ERK de progresser. Enfin, la protéine MAPK activée par la voie des MAPK peut phosphoryler les STAT, augmentant ainsi la transcription de gènes par les STAT (revu dans Rawlings, Rosler and Harrison, 2004).

4. Les kinases JAK

Depuis la découverte des JAK il y a une trentaine d'années (Wilks, 1989), de grands efforts ont été déployés pour comprendre leur structure et leurs fonctions. Les quatre kinases JAK jouent en effet un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose ou la survie et sont, de ce fait, apparues comme des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de différentes maladies.

4.1 Structure des protéines JAK

La structure des protéines JAK se caractérise par la présence de sept régions distinctes d'homologie JAK (JH) nommés JH1 à JH7 (**Figure 14**). Les quatre kinases JAK possèdent les mêmes domaines fonctionnels avec une similarité globale de 48 %. Le domaine kinase

catalytiquement actif (JH1) est situé à l'extrémité C-terminale et est suivi au niveau de sa partie N-terminale directement par le domaine pseudo-kinase (JH2) enzymatiquement inactif mais qui fournit des fonctions régulatrices essentielles (Ghoreschi, Laurence and O'Shea, 2009). En effet, des mutations artificielles ou associées à des maladies dans le domaine JH2 peuvent réguler positivement ou négativement l'activité kinase des JAK. Par ailleurs, la partie N-terminale des JAK contient un domaine SH2-like (JH3-JH4) et un domaine d'homologie 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) (JH6 et JH7). Ce domaine FERM médie la liaison des JAK au récepteur des cytokines transmembranaires et régule l'activité kinase (Luo *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2000).

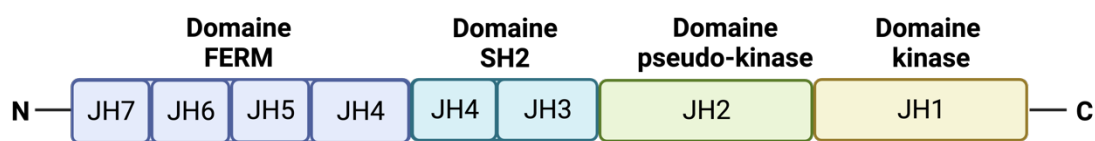


Figure 14 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels des protéines JAK. Les protéines JAK sont composées de sept domaines d'homologie JAK (JH). JH1 constitue le domaine kinase, JH2 le domaine pseudo-kinase, JH3 et JH4 forment ensemble le domaine SH2. Enfin, le domaine FERM est composé des domaines JH5, JH6, JH7 et d'une partie du domaine JH4 (figure inspirée de Hu *et al.*, 2021)

4.2 La kinase JAK1

Le gène codant pour la protéine JAK1 est situé sur le chromosome 1 humain. Comme les autres membres de la famille, JAK1 est une protéine relativement grande contenant plus de 1000 acides aminés. JAK1 est également largement exprimé dans les tissus de l'organisme et capable de phosphoryler toutes les protéines STAT.

JAK1 peut être activé par trois familles de récepteurs de cytokines différentes : (1) les récepteurs de cytokines avec la sous-unité γ_c (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R et IL-15R) ; (2) les récepteurs de cytokines de classe II (IFN- α/β R, IFN- γ R et récepteurs de cytokines de la famille IL-10) ; (3) les récepteurs avec la sous-unité gp130 (IL-6R, IL-11R, CNTF-R, OSM-R, LIF-R et CT-1R). De ce fait, cette kinase est impliquée dans de nombreux processus cellulaires et joue notamment un rôle clé dans l'expression de gènes qui médient l'inflammation, le remodelage épithélial et la progression des cancers métastatiques (revu dans Garrido-Trigo and Salas, 2020). Par ailleurs, JAK1 est un composant clé de la réponse immunitaire et inflammatoire médiée par la voie IL-6/JAK1/STAT3 et constitue une cible thérapeutique pour atténuer les « tempêtes de cytokines » lors de certaines infections virales. L'activité kinase de JAK1 est

directement inhibée par la protéine suppresseur de signalisation des cytokines 1 (SOCS1) (revu dans Roca Suarez *et al.*, 2018).

Alors que des déficits pour les protéines TYK2 et JAK3 ont été étudiés chez l'Homme et la souris, des individus présentant une déficience pour JAK1 n'ont pas encore été décrits. Cette observation est en accord avec le phénotype létal périnatal observé chez des souris KO (*knock-out*) pour JAK1, probablement en raison de déficits neurologiques (Rodig *et al.*, 1998).

4.3 Potentiel thérapeutique associé à l'inhibition des JAK

Les voies de signalisation JAK/STAT sont responsables de la transmission de signaux impliquant diverses cytokines et facteurs de croissance qui jouent un rôle essentiel dans les processus inflammatoires et les maladies auto-immunes (Hammarén *et al.*, 2019). Parmi les membres des kinases JAK, JAK1 joue un rôle crucial dans la dermatite atopique (Yasuda *et al.*, 2016), la rhinite allergique (Shen *et al.*, 2016), l'asthme (Wills-Karp *et al.*, 1998) ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Harris and Cummings, 2021). L'inhibition de JAK1 avec de petites molécules inhibitrices s'est avérée efficace dans le traitement de ces maladies (Wills-Karp *et al.*, 1998 ; T Virtanen *et al.*, 2019 ; Zak *et al.*, 2019). En outre, plusieurs petites molécules inhibitrices de JAK1 et JAK2 ont également présenté des bénéfices thérapeutiques dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou du psoriasis (revu dans Schwartz *et al.*, 2017). Par ailleurs, plusieurs inhibiteurs sélectifs de JAK3 ont été étudiés pour leur efficacité dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (revu dans Schwartz *et al.*, 2017) et des inhibiteurs de JAK1/TYK2 ont été développés au cours des dernières années, offrant de potentielles nouvelles options thérapeutiques pour le traitement des maladies inflammatoires (Menet, 2018). De plus, des inhibiteurs spécifiques de TYK2 peuvent aussi être utiles dans le traitement des maladies auto-immunes (revu dans Schwartz *et al.*, 2017 ; Wroblewski *et al.*, 2019). À noter qu'une activation excessive des JAK a été rapportée dans différents types de cancer (Buchert, Burns and Ernst, 2016).

4.4 Classification des inhibiteurs de JAK

Les inhibiteurs de JAK peuvent être divisés en deux générations (Angelini *et al.*, 2020). La première génération comprend des petites molécules telles que le baricitinib et le tofacitinib qui agissent, comme des inhibiteurs non sélectifs des JAK. En revanche, les inhibiteurs de deuxième génération comme l'upadacitinib ou le filgotinib, ont une activité inhibitrice sélective contre les JAK. Les différences de sélectivité entre les deux générations d'inhibiteurs sont associées à des variations dans leur efficacité et leur sécurité d'emploi (Shawky *et al.*, 2022). Par ailleurs, les inhibiteurs de JAK peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur

mode de liaison et du type d'interaction établi avec les acides aminés des JAK : il y a, d'une part les inhibiteurs réversibles (compétitifs), et d'autre part les inhibiteurs irréversibles (covalents).

4.4.1 Les inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs compétitifs des JAK forment des liaisons non covalentes avec les acides aminés des quatre JAK. Les liaisons formées par ce type d'inhibiteurs comprennent des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. On distingue deux types d'inhibiteurs compétitifs :

- Les inhibiteurs compétitifs pour l'ATP : le mécanisme d'action de ces inhibiteurs dépend de leur compétition avec l'ATP pour le site de liaison à l'ATP présent dans les JAK. Ces inhibiteurs peuvent également être classés en fonction de la conformation du domaine kinase auquel ils se lient :
 - **Les inhibiteurs de type I** : ces inhibiteurs se lient au site de liaison de l'ATP des JAK sous la conformation active du domaine kinase (Leroy and Constantinescu, 2017 ; Vainchenker *et al.*, 2018). Ce groupe inclut des molécules comme le filgotinib, un inhibiteur sélectif de JAK1 ou le fedratinib, un inhibiteur spécifique de JAK2 (Wernig *et al.*, 2008 ; Schwartz *et al.*, 2017). D'autres molécules comme le tofacitinib ou le peficitinib agissent en bloquant plusieurs JAK (Schwartz *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2021). La capacité des inhibiteurs de JAK de type I à se lier à plusieurs kinases et à agir comme des inhibiteurs non sélectifs pourrait être due à la structure très conservée du site de liaison à l'ATP dans les quatre JAK (T Virtanen *et al.*, 2019).
 - **Les inhibiteurs de type II** : ces inhibiteurs se lient également au site de liaison de l'ATP du domaine kinase, mais dans la conformation inactive des JAK (Leroy and Constantinescu, 2017 ; Vainchenker *et al.*, 2018). Les inhibiteurs sélectifs de JAK2 comme les composés NVP-BBT594 et NVP-CHZ868 constituent des exemples caractéristiques de cette catégorie (Andraos *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2015).
- Les inhibiteurs allostériques : ces inhibiteurs comprennent de petites molécules qui se lient à un site autre que le site de liaison à l'ATP dans les JAK (Leroy and Constantinescu, 2017 ; Vainchenker *et al.*, 2018). Parmi ces inhibiteurs, le deucravacitinib agit comme un inhibiteur allostérique sélectif de TYK2 (Burke *et al.*, 2019).

4.4.2 Les inhibiteurs irréversibles

Pour les inhibiteurs irréversibles de JAK, on retrouve notamment des molécules qui ciblent JAK3. Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs dépend de l'interaction covalente avec le résidu unique cystéine 909 de JAK3 (Casimiro-Garcia *et al.*, 2018).

4.5 Inhibiteurs de JAK utilisés en clinique

En 2011, le ruxolitinib est devenu le premier inhibiteur de JAK approuvé par la FDA (*food and drug administration*). Depuis, huit autres inhibiteurs ont été approuvés pour le traitement de différentes maladies. En effet, le tofacitinib a été approuvé en 2012 pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En 2017, le baricitinib a été approuvé pour le traitement de polyarthrite rhumatoïde. Par ailleurs, trois autres inhibiteurs de JAK ont été approuvés pour une utilisation en clinique en 2019. Ces médicaments comprennent le fedratinib et l'upadacitinib, qui ont été approuvés par la FDA, alors que le peficitinib avait déjà été approuvé au Japon pour la polyarthrite rhumatoïde. En 2020, le delgocitinib et le filgotinib ont également été approuvés au Japon pour le traitement de la dermatite atopique et de la polyarthrite rhumatoïde, respectivement (revu dans Shawky *et al.*, 2022). Enfin, le delgocitinib a été approuvé pour le traitement de la dermatite atopique au Japon. Ci-dessous, un résumé plus détaillé des applications cliniques de quatre inhibiteurs de JAK1 ou JAK2 utilisés lors des différentes expériences est présenté.

4.5.1 L'upadacitinib

L'upadacitinib est un inhibiteur sélectif de JAK1 de deuxième génération qui a été évalué pour le traitement de différents types de maladies inflammatoires et immunitaires. L'évaluation de l'upadacitinib dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde a révélé un profil d'efficacité rapide et favorable (Serhal and Edwards, 2019; Smolen *et al.*, 2019). En août 2019, l'upadacitinib a ainsi été approuvé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde modérée à sévère. En outre, plusieurs essais cliniques ont également été réalisés pour évaluer l'efficacité de l'upadacitinib dans le traitement de l'arthrite psoriasique. Depuis, cet inhibiteur est approuvé par la FDA et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) pour le traitement de patients atteints de rhumatisme psoriasique actif (Funk *et al.*, 2022; Muensterman *et al.*, 2022). Par ailleurs, après avoir démontré une efficacité supérieure à celle du traitement de référence (Blauvelt *et al.*, 2021), l'upadacitinib est depuis janvier 2022 également approuvé par la FDA pour le traitement de la dermatite atopique réfractaire modérée à sévère, chez les enfants âgés de plus de douze ans.

4.5.2 Le filgotinib

Le filgotinib est un inhibiteur sélectif de JAK1, compétiteur pour l'ATP. Il a d'abord été étudié pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde pour lequel il a démontré une efficacité prometteuse dans deux essais de phase 2. En 2020, le filgotinib a été approuvé par l'EMA pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde modérée à sévère (Dhillon and Keam, 2020). Cet inhibiteur a aussi été évalué dans un essai de phase 2 pour le traitement de la maladie de Crohn et a démontré des résultats prometteurs (Vermeire *et al.*, 2017 ; Labetoulle, Paul and Roblin, 2018). Par ailleurs, le filgotinib a été testé pour le traitement de la colite ulcéreuse (Feagan *et al.*, 2021) et pour le traitement de l'arthrite psoriasique active (Mease *et al.*, 2018).

4.5.3 L'oclocitinib

L'oclocitinib est un inhibiteur présentant une sélectivité plus élevée pour JAK1 par rapport aux autres JAK et a été approuvé en 2013 par la FDA pour le traitement de la dermatite atopique et allergique chez le chien (Gonzales *et al.*, 2014). En outre, Haugh *et al.* ont rapporté une première utilisation de l'oclocitinib par voie orale dans le traitement d'un homme atteint de dermatite atopique (Haugh, Watson and Alan Menter, 2018). Une étude a également évalué l'association entre l'oclocitinib et des agents antibactériens chez le chien (Rynhoud *et al.*, 2021). Enfin, un effet immunosuppresseur a été rapporté chez le chien lorsque l'oclocitinib est utilisé à une dose supérieure à celle utilisée dans le traitement du prurit allergique (Collard *et al.*, 2014).

4.5.4 Le fedratinib

Le fedratinib est un inhibiteur compétitif de JAK2 approuvé par la FDA en août 2019 pour le traitement de la myélofibrose (Blair, 2019). Le fedratinib a également démontré une activité inhibitrice contre d'autres kinases, telles que les kinases FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase*) et RET (*rearranged during transfection*) (Ciceri *et al.*, 2014). La surexpression de FLT3 a été rapportée dans des cas de leucémies aiguës (revu dans Poubel *et al.*, 2019).

5. Interactions entre le HDV et l'immunité innée

Le HDV est un virus non cytopathique qui, contrairement au HBV, active fortement la voie des IFN de type I et III grâce à la reconnaissance de l'ARN viral dans le cytoplasme par le senseur de l'immunité innée MDA5 (**Figure 15**), à la fois dans les lignées cellulaires et chez les souris, ceci sans que la réplication virale ne soit affectée (Alfaiate *et al.*, 2016 ; Suárez-Amarán *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2018). Par ailleurs, une étude récente a révélé que la liaison

de LGP2 à l'ARN viral est une condition préalable à la formation de complexes stables entre l'ARN du HDV et MDA5 (Gillich *et al.*, 2023).

La reconnaissance de l'ARN du HDV entraîne l'expression accrue d'ISG tels que MxA (*Myxovirus resistance gene A*), OAS1 (2'-5'-oligoadénylate synthétase 1) ou RSAD2 (*radical S-adenosyl methionine domain containing 2*) (Williams *et al.*, 2009 ; Alfaiate *et al.*, 2016 ; Giersch *et al.*, 2017), contribuant ainsi à l'inhibition de la réplication du HBV au profit de celle du HDV.

Bien que les mécanismes d'interférences du HDV sur le HBV ne soient pas encore complètement élucidés, Lucifora *et al.*, ont récemment démontré que le HDV interfère avec le HBV par des mécanismes dépendants et indépendants de l'IFN. Plus précisément, des analyses de transcriptomiques dans différents modèles cellulaires ou murins de co-infection ont révélé que l'infection par le HDV est associée à une augmentation de l'expression de 73 ISG, notamment TRIM22 (*tripartite motif containing 22*), DDX60 (*DExD/H-Box helicase 60*) et l'ISG20 (*interferon stimulated exonuclease gene 20*) qui ont tous été suggérés pour avoir une activité antivirale contre le HBV (Lucifora *et al.*, 2023).

En effet, il est supposé que TRIM22 inhibe l'activité du promoteur central du HBV en agissant ainsi comme un répresseur transcriptionnel (Gao *et al.*, 2009). DDX60, une hélicase d'ARN cytoplasmique, favorise quant à elle la dégradation des ARN du HBV dans le cytoplasme (Kouwaki *et al.*, 2016). Enfin, l'ISG20 dégrade spécifiquement les ARN du HBV en reconnaissant la modification N6-méthyladénosine sur la structure en boucle de la tige epsilon, présente dans tous les ARN du HBV (Liu *et al.*, 2017; Imam *et al.*, 2020) (revu dans Thiyagarajah, Basic and Hildt, 2023).

Selon Lucifora *et al.*, la mutation du motif de reconnaissance de l'ISG20 dans la structure epsilon n'a pas affecté la suppression du HBV, ce qui laisse supposer que l'ISG20 n'est pas impliqué dans la suppression du HBV induite par HDV ou que l'effet peut être compensé par d'autres mécanismes d'interférence du HDV. De plus, les résultats de cette étude ont révélé que l'inhibition de la voie de l'interféron n'a que partiellement inversé l'effet suppressif du HDV sur le HBV, soulignant ainsi l'implication d'autres facteurs de l'hôte indépendants de la réponse IFN ou une implication directe des composants viraux dans la suppression du HBV (Lucifora *et al.*, 2023).

Par ailleurs, des études menées par Belloni *et al.* ont décrit que le traitement avec de l'IFN- α induit une hypoacétylation des histones associées à l'ADNccc (*covalently closed circular DNA*) du HBV, entraînant le recrutement du répresseur transcriptionnel YY1 (*yin yang 1*) et de la protéine EZH2 (*enhancer of zeste polycomb repressive complex 2 subunit*), qui à

leur tour régulent la transcription du HBV de manière épigénétique (Belloni *et al.*, 2012). Des études antérieures ont déjà démontré la capacité du HDV à contrôler épigénétiquement certains gènes associés à des modifications de l'acétylation des histones (Liao *et al.*, 2009). Ainsi, il est possible que le HDV exerce également un contrôle épigénétique sur le HBV en recrutant YY1 et EZH2 sur l'ADNccc (revu dans Thiagarajah, Basic and Hildt, 2023).

Néanmoins, à ce jour, l'interaction entre le HDV et la réponse aux IFN de la cellule hôte n'est pas totalement clarifiée. La réplication du virus semble peu sensible à la réponse IFN endogène mais peut être inhibée par l'administration d'IFN- α exogènes, qui en stimulant l'expression de l'enzyme ADAR1, entraînent une synthèse accrue de la protéine L-HDAg chargée de réguler négativement la réplication. Cependant, on ignore toujours si d'autres facteurs de restriction IFN-dépendants existent.

La protéine ADAR1 existe sous deux isoformes : une forme courte, ADAR1p110, exprimée de manière constitutive et présente dans le noyau, ainsi qu'une forme longue, ADAR1p150, inductible par l'IFN et qui est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans les cellules Huh7 non traitées, ADAR1p110 non inductible est principalement responsable de l'expression de L-HDAg, tandis que ADAR1p150 peut augmenter les taux d'édition de l'ARN du HDV jusqu'à un tiers en cas de traitement par l'IFN (Wong and Lazinski, 2002 ; Hartwig *et al.*, 2004, 2006). Bien que les chercheurs aient émis l'hypothèse que l'édition d'ADAR1p150 soit partiellement responsable des effets antiviraux du traitement à l'IFN- α , cet effet semble être limité par d'autres mécanismes de régulation (Jung, Altstetter and Protzer, 2020).

Malgré la capacité de codage très limitée de son génome, il semblerait que le HDV ait développé des mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et pour résister à la forte réponse aux IFN induite par sa propre réplication. Tout d'abord, le HDV peut échapper à une reconnaissance par les PRR cytoplasmiques ou endosomaux en se répliquant dans le noyau, profitant ainsi de la compartimentation cellulaire. En outre, il forme un génome à ARN circulaire sans extrémités 5' ou 3' accessibles pour les PRR dont RIG-I ainsi qu'un complexe RNP réduisant la liaison des PRR aux structures caractéristiques du virus (Wesselhoeft *et al.*, 2019). Par ailleurs, il a été démontré que le HDV active les facteurs de transcription NF κ B et STAT3 via le stress oxydatif (Makhoul *et al.*, 2013). Cette interférence du HDV avec les voies de signalisation JAK/STAT pourrait contribuer à la persistance du virus dans les hépatocytes.

Enfin, le HDV offre également peu de possibilités d'attaque pour l'immunité adaptative puisque seules deux protéines virales, dont la séquence protéique se chevauche légèrement, sont exprimées. Ainsi, peu de peptides dérivés du HDV peuvent être présentés sur les cellules infectées et reconnus par les lymphocytes T (Karimzadeh *et al.*, 2018).

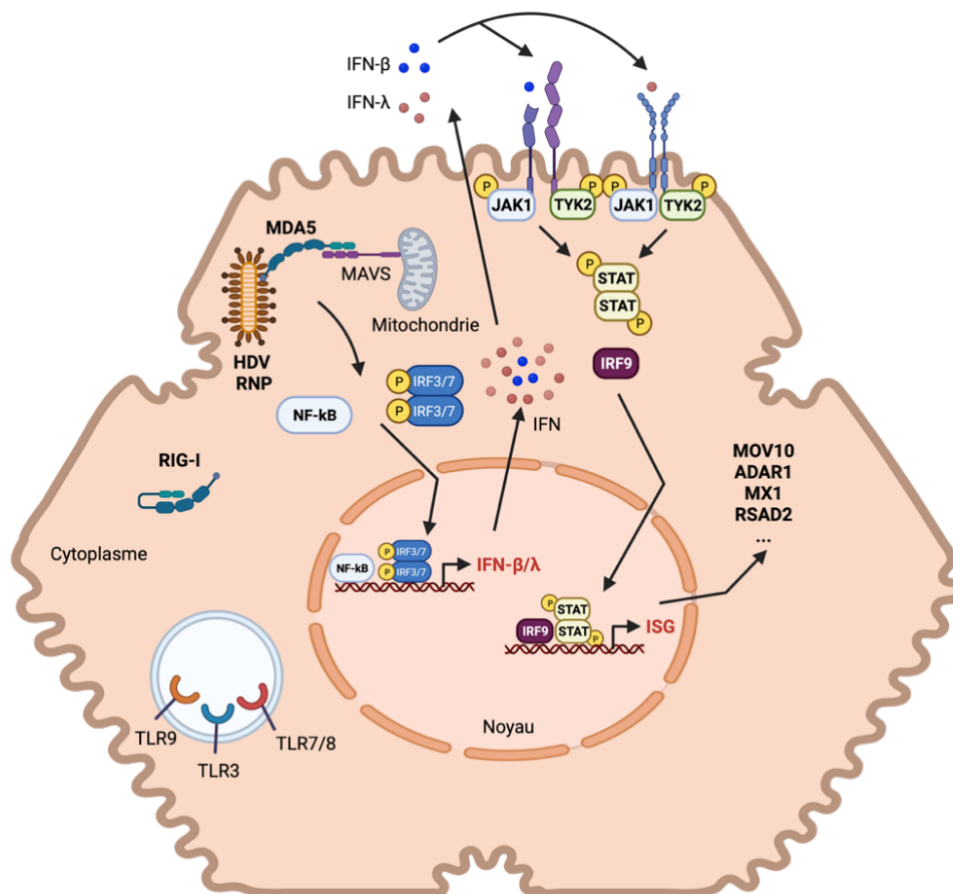


Figure 15 : Représentation schématique de la réponse immunitaire innée induite par le HDV. L'ARN du HDV peut être reconnu par le senseur de l'immunité innée MDA5, ce qui active fortement la voie des IFN de type I et III et entraîne l'expression accrue d'ISG tels que MOV10, ADAR1, MX1 ou RSAD2 (figure inspirée de Zhang et al., 2020).

Nouvelles stratégies antivirales en cours de développement

Malgré les progrès de la recherche dans la compréhension du HDV, le traitement de l'hépatite D chronique reste à ce jour difficile. En effet, le HDV est un virus fortement dépendant des facteurs de l'hôte pour la réalisation de son cycle de multiplication. Il code uniquement pour deux protéines structurales dépourvues de toute activité enzymatique et ne possède pas sa propre polymérase dont la fonction pourrait être ciblée par un traitement antiviral direct. Par ailleurs, les tentatives d'utilisation d'inhibiteurs ciblant l'activité ribozyme du HDV se sont révélées peu concluantes en raison de la très forte toxicité observée *in vitro*. De plus, la réplication du HDV est insensible aux analogues nucléos(t)idiques utilisés contre le HBV. Les traitements basés sur l'utilisation de PEG-IFN entraînent de nombreux effets secondaires et ne permettent pas d'inhiber l'expression des HBsAg à l'origine d'un rebond de la charge virale du HDV chez la plupart des patients après l'arrêt du traitement. Par conséquent, les facteurs cellulaires essentiels au cycle viral constituent des cibles pertinentes pour le développement de nouveaux antiviraux ciblant l'hôte (HTA, pour *host targeting agents*), parmi lesquels certains sont déjà en cours d'essais cliniques (revu dans Asselah *et al.*, 2020).

1. Le bulevirtide

Le bulevirtide, un lipopeptide synthétique dérivé du domaine Prés1 de la grande protéine d'enveloppe du HBV, inhibe l'entrée du HBV et du HDV dans les hépatocytes en se liant au récepteur NTCP et en l'inactivant (Petersen *et al.*, 2008 ; Lütgehetmann *et al.*, 2012). Dans un essai clinique de phase 2, il a été démontré que le bulevirtide induit une baisse prononcée de l'ARN du HDV et des taux de transaminases de type ALT (*alanine aminotransferase*) (Bogomolov *et al.*, 2016 ; Wedemeyer *et al.*, 2023). Les résultats de cet essai, combinés aux données de l'étude de phase 1 (Blank *et al.*, 2016), ont servi de base pour l'approbation conditionnelle du bulevirtide dans l'Union Européenne en 2020, administré à la dose de 2 mg par jour, pour le traitement de l'hépatite D chronique chez les adultes souffrant d'une maladie hépatique stable (revu dans Asselah *et al.*, 2020). Il s'agit du tout premier traitement spécifique approuvé contre le HDV. Néanmoins, le bulevirtide n'a pas encore été approuvé par la FDA (Wedemeyer, Aleman, *et al.*, 2023).

Un essai clinique de phase 3 est actuellement en cours et comprend 144 semaines de traitement ainsi que 96 semaines de suivi post-traitement. L'objectif consiste à évaluer l'efficacité et la sécurité du bulevirtide en monothérapie chez des patients atteints d'hépatite D chronique répartis dans trois groupes (un groupe recevant 2 mg de bulevirtide, un groupe recevant 10 mg de bulevirtide et un groupe témoin). Les premiers résultats de l'étude ont

démonstré qu'après 48 semaines, le taux d'ARN du HDV était indétectable chez 12 % des patients du groupe 2 mg et chez 20 % des patients du groupe 10 mg. Le taux d'ALT s'est normalisé chez 12 % des patients du groupe témoin, 51 % du groupe 2 mg et 56 % du groupe 10 mg. Une perte de l'expression des HBsAg ou une diminution du taux des HBsAg ne s'est pas produite dans les groupes traités au bulevirtide après 48 semaines. Par ailleurs, de nombreux effets secondaires tels que des céphalées, un prurit, des réactions au site d'injection, des douleurs abdominales ou de l'asthénie ont été plus fréquemment rapportés dans les groupes 2 mg et 10 mg combinés par rapport au groupe témoin. Des augmentations dose-dépendantes des taux d'acides biliaires ont également été observées pour les groupes traités au bulevirtide. Ainsi, bien que des données à plus long terme soient nécessaires, le bénéfice clinique du bulevirtide pose question (Wedemeyer, Aleman, *et al.*, 2023).

2. Les polymères d'acides nucléiques (NAP)

Les polymères d'acides nucléiques (NAP) sont des molécules amphipathiques dotées d'un large spectre antiviral. Bien que leur mécanisme d'action précis soit encore débattu, leur action anti-HBV semble résulter d'une inhibition de la libération des HBsAg par les hépatocytes (Blanchet *et al.*, 2019). Par ailleurs, une interaction supplémentaire avec l'HDAg a été décrite et pourrait expliquer l'effet antiviral observé contre le HDV (Fernandez de la Mora, 2018). En outre, la réduction drastique des niveaux d'HBsAg circulants observée chez les patients favoriserait la normalisation de la réponse immunitaire humorale (Bazinet *et al.*, 2017).

À ce jour, un essai de phase 2 a été mené pour étudier les effets des NAP sur le HDV. Cet essai a permis le suivi de douze patients pendant trois ans et demi dans le cadre d'un protocole de traitement impliquant des perfusions hebdomadaires de REP2130-Ca pendant 15 semaines, puis de REP2130-Ca en association avec du PEG-IFN- α pendant 15 semaines et finalement du PEG-IFN- α seul pour 33 semaines supplémentaires. À la fin du traitement, l'ARN du HDV n'était plus détectable chez 75 % des patients et le suivi sur le long terme a montré des réponses virologiques soutenues (Bazinet *et al.*, 2017, 2021). D'autres études sur le REP2139-Mg en association avec le PEG-IFN- α et le ténofovir sont prévues, avec l'avantage supplémentaire de permettre la transition vers un dosage sous-cutané dans les essais futurs (Bazinet *et al.*, 2017, 2021 ; Vaillant, 2019). Par ailleurs, de récentes données ont révélé que le REP2139 est sûr, bien toléré et efficace chez trois patients sur une période de 48 semaines, l'ARN du HDV devenant indétectable au bout de quatre à cinq semaines de traitement (revu dans Olsen *et al.*, 2023).

L'ensemble de ces données préliminaires obtenues sur une petite série de patients est prometteur, notamment pour les patients en échec thérapeutique avec le bulevirtide.

Cependant, des confirmations sont nécessaires dans de plus grandes cohortes de malades (revu dans Caviglia, Ciancio and Rizzetto, 2022).

3. Les traitements à base d'IFN- λ

L'interféron-lambda (IFN- λ) est un IFN de type III dont les caractéristiques structurales et biologiques sont distinctes de celles de l'IFN- α , tout en partageant des voies d'induction d'ISG communes associées à une activité antivirale. Des études précédentes ont démontré que l'IFN- λ possède un effet antiviral comparable à celui de l'IFN- α chez des souris humanisées (Giersch *et al.*, 2017). Chez les patients atteints d'hépatite B chronique, l'administration d'IFN- λ pégylé (PEG-IFN- λ) est associée à des résultats virologiques équivalents à ceux du PEG-IFN- α , mais avec une meilleure tolérance, ce qui en fait une option potentiellement intéressante pour le traitement de l'hépatite D chronique (Chan *et al.*, 2016).

Jusqu'à récemment, un essai clinique de phase 3 était en cours pour évaluer les effets d'un traitement à base de PEG-IFN- λ chez des patients atteints d'hépatite D chronique. Malheureusement, *Eiger BioPharmaceuticals* a annoncé le 12 septembre 2023 sa décision d'arrêter l'étude de phase 3 pour des raisons de sécurité. Cette décision se base sur les recommandations du DSMB (*data safety monitoring board*), après qu'un examen trimestriel ait révélé que quatre patients ont subi des événements hépatobiliaires ayant entraîné une décompensation du foie (Eiger BioPharmaceuticals, 2023).

4. Le lonafarnib

L'enzyme farnésyltransférase de l'hôte qui catalyse le processus de farnésylation de L-HDAG, crucial pour l'interaction de la RNP du HDV avec les protéines d'enveloppe du HBV (Glenn *et al.*, 1992), est la cible du lonafarnib. Cette molécule a été introduite comme médicament contre la leucémie, puis approuvée pour le syndrome de la progéria (revu dans (Brancaccio *et al.*, 2022).

Son utilisation dans l'infection chronique par le HDV a d'abord été évaluée *in vitro* et *in vivo* et a démontré que cette molécule abroge la sécrétion de particules du HDV (Bordier *et al.*, 2002, 2003). Par ailleurs, dans une étude pilote de phase 2A, l'administration orale de lonafarnib a réduit les taux sériques d'ARN du HDV de manière dose-dépendante, mais plusieurs effets secondaires gastro-intestinaux ont été reportés (Koh *et al.*, 2015). Dans des études ultérieures, le lonafarnib a été administré en association avec le ritonavir, un antirétroviral de la catégorie des inhibiteurs de protéases, pour permettre l'utilisation de doses plus faibles de lonafarnib, sans réduire son activité antivirale (Yurdaydin *et al.*, 2022). Un essai multicentrique de phase 3 est actuellement en cours, impliquant la répartition aléatoire de

400 patients dans quatre groupes pour évaluer la combinaison du lonafarnib avec le ritonavir et du PEG-IFN- α pendant 48 semaines (revu dans Brancaccio *et al.*, 2022).

En conclusion, le chemin vers une thérapie universelle pour les patients atteints d'hépatite D chronique est encore long. En effet, de nombreuses incertitudes persistent quant à la durée optimale du traitement, aux résultats obtenus après l'arrêt du traitement et à la nécessité d'un traitement de soutien sur le long terme. Les thérapies basées sur l'utilisation du bulevirtide ou du lonafarnib ont obtenu de meilleurs résultats en combinaison avec du PEG-IFN. De ce fait, de nombreux patients ne sont pas éligibles en raison d'une intolérance ou d'une contre-indication au PEG-IFN. En outre, aucun de ces médicaments n'a été testé en monothérapie dans les cas de cirrhose décompensée, pour lesquels la transplantation hépatique reste la seule option. Ainsi, il est indispensable de poursuivre les recherches afin de mieux caractériser les interactions entre les HDV et facteurs cellulaires pour le développement de nouveaux antiviraux ciblant l'hôte.

	Mode d'administration	Mécanisme d'action	Durée du traitement
PEG-IFN- α	Injection sous-cutanée hebdomadaire	Immuno-modulateur + induit l'expression d'ISG	48 semaines
PEG-IFN- λ	Injection sous-cutanée hebdomadaire	Immuno-modulateur + induit l'expression d'ISG	48 semaines
Bulevirtide	Injection sous-cutanée quotidienne	Inhibiteur de l'entrée virale	24-48 semaines
NAP	Injection intraveineuse quotidienne	Inhibiteur de la sécrétion des HBsAg ; inhibiteur de l'assemblage	24-48 semaines
Lonafarnib + ritonavir	Administration orale quotidienne	Inhibiteur de la prénylation	24-48 semaines

Tableau 2 : Principales caractéristiques des molécules actives contre le HDV. Mode d'administration, mécanisme d'action et durée du traitement à base de PEG-IFN- α/λ , bulevirtide, polymères d'acides nucléiques (NAP) et de lonafarnib en combinaison avec le ritanavir (figure inspirée de Brancaccio *et al.*, 2022)

Objectifs de la thèse

L'hépatite D est la forme la plus sévère et la plus agressive des hépatites virales chroniques. À l'heure actuelle, les traitements contre l'infection par le HDV, essentiellement basés sur l'utilisation de PEG-IFN, sont peu efficaces et ne permettent pas d'éliminer totalement le virus.

En raison de sa structure particulière, cibler le HDV reste un défi majeur et il est urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, les facteurs de l'hôte impliqués dans le cycle viral constituent des cibles prometteuses, à l'image du bulevirtide, un inhibiteur d'entrée du HBV et du HDV, qui a obtenu récemment une autorisation en clinique dans l'Union Européenne en tant que premier médicament spécifique du HDV. Néanmoins, les interactions moléculaires entre le virus et les hépatocytes sont encore peu documentées. Identifier de nouveaux facteurs cellulaires essentiels au cycle viral constitue donc une piste intéressante pour tenter d'éradiquer cette menace majeure de santé publique.

Le groupe du Dr. Eloi Verrier au sein duquel j'ai réalisé ma thèse développe un programme de caractérisation des facteurs hépatiques impliqués dans les hépatites B et D. Pour cela, une approche de criblage de génomique fonctionnelle par perte de fonction à haut débit a été utilisée au laboratoire. Grâce à de petits ARN interférents (siRNA) ciblant plus de 7500 gènes, le groupe a identifié de nouveaux facteurs cellulaires impliqués dans le cycle de multiplication du HDV, dont l'enzyme trifonctionnelle CAD qui joue un rôle clé dans la biosynthèse des pyrimidines. Le PALA ou acide sparfosique, un inhibiteur spécifique de l'enzyme CAD, possède des propriétés antivirales puissantes contre le HDV et est à ce jour un candidat aux études précliniques (Verrier *et al.*, 2020).

Le projet de ma thèse s'est inscrit dans le cadre de ce large programme de recherche visant à définir les interactions moléculaires entre le HDV et les hépatocytes, avec pour objectif la caractérisation d'un autre candidat issu du criblage primaire, à savoir la kinase JAK1.

Cette kinase constitue une cible d'intérêt pour l'unité puisque les résultats du criblage ont montré qu'une diminution de l'expression de *JAK1* est associée à une baisse de l'infection par le HDV dans les hépatocytes. Ceci suggère que JAK1 aurait un effet proviral dans le cadre d'une infection par le HDV et fournirait de premiers éléments expliquant l'absence d'efficacité thérapeutique des IFN dans le traitement de l'hépatite D.

Le but de ma thèse a ainsi été de caractériser le rôle de JAK1 dans l'infection par le HDV afin d'améliorer notre compréhension des interactions entre le virus et l'immunité innée. Cette caractérisation s'est faite en plusieurs étapes parmi lesquelles on retrouve :

(1) la validation des résultats du criblage primaire grâce à des expériences de perte de fonction additionnelles ;

(2) l'établissement et la caractérisation d'une lignée KO pour le gène *JAK1* ainsi que de mutants fonctionnels de la protéine pour l'étude du mécanisme d'action de JAK1 sur le HDV ;

(3) l'évaluation du potentiel de JAK1 comme cible antivirale grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JAK1 dans divers modèles d'étude *in vitro*, y compris dans des hépatocytes primaires humains.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Plasmides

Le plasmide LentiCRISPR v2 exprimant l'endonucléase Cas9 est un don de Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961 ; <http://n2t.net/addgene:52961> ; RRID:Addgene_52961) (Sanjana, Shalem and Zhang, 2014). Les plasmides VSV-g et HIV gag/pol ont été décrits précédemment (Bartosch, Dubuisson and Cosset, 2003). Le vecteur lentiviral VB210108-1113pme (Vector Builder) exprime une version sauvage de la protéine JAK1 (GeneBank : NM_001320923.2) qui possède des mutations silencieuses dans la séquence complémentaire à l'ARN guide utilisé pour produire la lignée Huh7-NTCP-JAK1-KO ainsi qu'un gène de résistance à la blasticidine (JAK1^{Res}). Le vecteur lentiviral VB210205-1107vfb (Vector Builder) exprime une version mutée de la protéine JAK1 possédant les mutations L633K et K622A dans le domaine pseudo-kinase de la protéine et qui n'est plus capable de lier l'ATP (JAK1^{Mut1}) (Raivola, Haikarainen and Silvennoinen, 2019). Le vecteur lentiviral VB210205-1107vfb (Vector Builder) exprime une autre version mutée de JAK1 qui possède les mutations P733L et P832S dans le domaine pseudo-kinase de la protéine (JAK1^{Mut2}), entraînant une baisse de la phosphorylation des STAT (Eletto *et al.*, 2016). Le vecteur lentiviral VB210205-1111uzx (Vector Builder) est caractérisé par la présence de la mutation G902E dans le domaine kinase de JAK1. Cette mutation a été retrouvée chez des patients atteints de HCC mais ne semble pas impacter les voies de signalisation JAK/STAT (Kan *et al.*, 2013). Le vecteur lentiviral vide VB190320-1155uyy a été utilisé comme contrôle négatif (V. ctrl) et exprime une version de JAK1 également résistante à l'ARN guide utilisé pour obtenir la lignée Huh7-NTCP-JAK1-KO. Le vecteur d'expression VB221003-1138wys (Vector Builder) exprime la forme courte de l'antigène delta (S-HDAg) (GeneBank : M21012.1) et le vecteur d'expression VB230614-1248tvr (Vector Builder) exprime une version mutée de S-HDAg possédant la mutation S177A. Les séquences des différents vecteurs sont disponibles en ligne : (<https://en.vectorbuilder.com/design/retrieve.html>).

2. Réactifs

L'upadacitinib (ABT-494) et l'oclocitinib (PF-03394197) proviennent d'Interchim. Le filgotinib (GLPG0634), le fedratinib (TG101348) et le sofosbuvir (PSI-7977, GS-7977) proviennent de Selleckchem. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le polyéthylène glycol (PEG) 8000 proviennent de Merck (Sigma Aldrich). L'IL-6 humaine recombinante (200-06) provient de PeproTech et l'IFN- α -2a recombinant (SRP4594) de Merck. Les solutions de DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium gibco*®), PBS (*phosphate buffered saline gibco*®) BSA (*bovine serum albumin solution*) ainsi que le milieu William sont issus de ThermoFisher Scientific. Le paraformaldéhyde (PFA) provient d'Electron Microscopy Science et la solution de TBS-Tween de Genaxxon Bioscience. Le réactif de transfection *FuGENE*®*HD* provient de

Promega (#E2312). Le kit de transfection *CalPhos Mammalian Transfection Kit* provient de Takara (#631312). Enfin, le peptide synthétique PreS1 est synthétisé par Bachem (Bubendorf, CH).

3. Lignées cellulaires et cellules primaires

Les cellules HEK293T (Lupberger *et al.*, 2011), HepaRG (Gripon *et al.*, 2002 ; Alfaiate *et al.*, 2016), Huh7.5.1. (Lupberger *et al.*, 2011), Huh7-NTCP (Bach *et al.*, 2023) et HepG2-NTCP (Eller *et al.*, 2020) sont cultivées et différenciées comment décrit précédemment. La lignée de cellules HepaRG KO pour *MDA5* (Lucifora *et al.*, 2023) ainsi que la lignée Huh7-NTCP-YBX1-KO (Verrier *et al.*, 2022) ont été décrites précédemment.

Les hépatocytes primaires humains (PHH) proviennent de tissus hépatiques de patients ayant subi une résection du foie pour des métastases hépatiques aux Hôpitaux de Strasbourg avec un consentement éclairé. Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique local des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (CPP) et le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France (DC 2016). Les PHH sont isolés et cultivés comme décrit précédemment (Lupberger *et al.*, 2011). La lignée Huh7-2C8D (Bach *et al.*, 2023) permettant la production de particules du HDV ainsi que la lignée HepAD38 (Ladner *et al.*, 1997 ; Eller *et al.*, 2020) produisant du HBV ont été décrites précédemment. Les cellules rapportrices U2OS-ACE2 GFP1-10 et GFP-11 (S-Fuse) proviennent du Professeur Olivier Schwartz (Institut Pasteur, Paris, France) et sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/l de glucose (Gibco no. 61965) complété par 1 % de sodium pyruvate, 10 % de sérum fœtal bovin et 10 µg/ml de puromycine.

4. Production du HDV, HBV, HCV et SARS-CoV-2

Les particules infectieuses du HDV sont purifiées à partir du surnageant des cellules Huh7-2C8D qui expriment de manière stable les antigènes de surface du HBV et le génome du HDV (génotype 1) comme décrit précédemment (Bach *et al.*, 2023). La production de particules du HBV et du HCV a été décrite précédemment (Ladner *et al.*, 1997 ; Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Zona, *et al.*, 2016). Les particules de SARS-CoV-2 (souche delta) sont produites à partir de celles VeroE6-TMPRSS2 (fournies généreusement par le Professeur Stefan Pöhlmann) comme décrit précédemment (Hoffmann *et al.*, 2020) et titrées à l'aide des cellules S-Fuse. La souche delta a été obtenue par BEI Resources, NIAID, NIH (SARS-Related Coronavirus 2, Isolate hCoV-19/USA/PHC658/2021 (Lineage B.1.617.2 ; Delta Variant), NR-55611).

5. Caractérisation des particules produites par les Huh7-2C8D

Pour caractériser les particules virales produites, le surnageant des cellules Huh7-2C8 et Huh7-2C8D a été concentré avec un coussin de sucrose à 30 % et purifié à travers un gradient de densité de 10-45 % d'iodixanol en utilisant le milieu de gradient de densité *Optiprep* (Merck, D1556) selon les instructions du fabricant après une ultracentrifugation à 40000 rpm pendant seize heures à 4°C. Dix fractions ont été collectées. 200 µl de chaque fraction ont été pondérés pour évaluer la densité. Les niveaux d'HBsAg dans chaque fraction ont été évalués par CLIA (*chemiluminescent immunoassay*). Les niveaux d'ARN du HDV dans chaque fraction ont été quantifiés par RT-qPCR comme décrit ci-dessous. Ces expériences ont été réalisées par des ingénieurs du laboratoire.

6. Co-immunoprécipitation MOV10/HDAg

Les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées selon les recommandations du fabricant grâce au kit *Pierce™ Crosslink Magnetic IP/Co-IP* (Thermo Fisher Scientific). Le lysat cellulaire préparé à partir de cellules Huh7-2C8D est incubé avec 2 µg d'anticorps anti-HDAg (Verrier *et al.*, 2020) purifié préalablement à partir du sérum d'un patient co-infecté par le HBV et le HDV à l'aide du kit *MABtrap®* selon les recommandations du fabricant ou avec 2 µg d'une IgG humaine contrôle utilisée comme contrôle négatif. Les billes sont ensuite lavées abondamment et les protéines liées sont éluées dans un tampon d'éluion à faible pH conformément aux instructions du fabricant. Les différents échantillons élués sont finalement séparés par électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide (SDS) et analysés par *Western blot* à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-MOV10 (ab176687, Abcam) ou de l'anticorps dérivé du patient (Verrier *et al.*, 2020).

7. Baisse de l'expression de *JAK1* en utilisant de petits ARN interférents

Des cellules Huh7-NTCP ou HepG2-NTCP sont transfectées avec quatre petits ARN interférents (siRNA) ciblant spécifiquement l'ARNm de *JAK1* (ONTARGET+, Horizon Discovery, J-003145-09-0005, J-003145-10-0005, J-003145-11-0005, J-003145-12-0005) de manière individuelle (siJAK1-1, 2, 3 ou 4) ou combinée (siJAK1-Pool), ou avec un siRNA contrôle (Horizon Discovery, D-001810-10-20) qui ne cible aucune séquence humaine (siCTRL) avec une concentration finale en siRNA de 100 nM et en utilisant une solution de *Lipofectamin RNAiMAX* selon les recommandations du fabricant (10601435, Invitrogen). Soixante-douze heures après la transfection, l'efficacité de baisse de l'expression de *JAK1* est contrôlée par *Western blot* ou RT-qPCR. Les cellules restantes sont infectées avec le HDV. Après huit jours d'infection, la viabilité cellulaire est contrôlée et l'infection quantifiée par RT-

qPCR ou immunofluorescence. Alternativement, les cellules Huh7-NTCP sont d'abord infectées avec le HDV puis transfectées avec le siCTRL, un siRNA ciblant l'expression de *SLC10A1* (siNTCP, ONTARGET+, Horizon Discovery, L-007376-00) ou avec le siJAK1-Pool. Enfin, les PHH sont transfectés avec le siCTRL ou le siJAK1-Pool pendant trois jours puis infectés avec le HDV comme décrit ci-dessus.

8. Baisse de l'expression de *STAT3* en utilisant de petits ARN interférents

Des cellules Huh7-NTCP sont transfectées avec une combinaison de quatre siRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de *STAT3* (siSTAT3-Pool) (ONTARGET+, Horizon Discovery, J-003544-07, J-003544-08, J-003544-09, J-003544-10), avec le siJAK1-Pool ou avec le siCTRL comme décrit ci-dessus. Après 72 heures, l'efficacité de diminution de l'expression de *JAK1* et *STAT3* est contrôlée par RT-qPCR et les cellules restantes sont infectées avec le HDV. Après huit jours d'infection, la viabilité cellulaire est contrôlée et l'infection quantifiée par RT-qPCR ou immunofluorescence.

9. Établissement d'une lignée KO pour *JAK1* et de différentes lignées dérivées

La production de cellules KO (*knock-out*) pour *JAK1* est réalisée par transduction de cellules Huh7-NTCP avec un plasmide codant pour l'endonucléase Cas9 et un ARN guide unique ciblant spécifiquement *JAK1* (sgRNA) comme décrit précédemment (Verrier *et al.*, 2022). Les amorces suivantes ont été utilisées pour concevoir l'ARN guide ciblant *JAK1* (sgJAK1) qui a été cloné dans le plasmide Lenti-CRISPR-v2 :

- Amorçe sens : 5'-CACCGATGACGAGAACACCAAGCTC-3'
- Amorçe antisens : 5'-AAACGAGCTTGGTGTTCCTCGTCATC-3'.

Les particules lentivirales sont générées en co-transfectant des cellules HEK293T avec le plasmide Lenti-CRISPR-v2 exprimant le sgJAK1, le plasmide HIV gag/pol et le plasmide VSV-g en utilisant le kit de transfection *CalPhos Mammalian Transfection Kit*. Les cellules sont ensuite cultivées sous sélection avec de la puromycine et des clones individuels JAK1-KO ont été isolés en utilisant le trieur de cellules SH800 (Sony). Le clone #2 a été sélectionné pour les différentes expériences. La lignée Huh7-NTCP-Cas9 exprimant l'endonucléase Cas9 a été produite en parallèle en guise de contrôle. Les deux lignées cellulaires sont cultivées en présence de puromycine (1 µg/ml). La restauration de l'expression de *JAK1* a été obtenue en transduisant les cellules Huh7-NTCP-JAK1-KO avec des particules lentivirales exprimant une version sauvage de la protéine JAK1 possédant des mutations silencieuses dans la région

ciblée par le sgJAK1 (JAK1^{Res}). Trois autres lignées ont également été produites en transduisant les cellules Huh7-NTCP-JAK1-KO avec des particules lentivirales codant pour une version mutée de JAK1 avec soit des mutations dans le domaine pseudo-kinase (JAK1^{Mut1} et JAK1^{Mut2}), soit des mutations dans le domaine kinase (JAK1^{Mut3}). Un vecteur vide (v. ctrl) a été utilisé comme contrôle. Ces différentes lignées cellulaires sont cultivées en présence de blasticidine (10 µg/ml).

10. Contrôle de l'expression de gènes par RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules lysées en utilisant le kit *ReliaPrepTM RNA cell Miniprep System* (Promega) ou le kit *Viral RNA and DNA isolation kit* (Macherey-Nagel) puis rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant. L'expression des différents gènes est ensuite quantifiée par qPCR en utilisant le thermocycleur *QuantStudio 3* (ThermoFisher Scientific). Les amorces et sondes TaqMan® pour la quantification de l'ARNm de *JAK1* (Hs01026983_m1), *RSAD2* (Hs00369813_m1), *SLC10A1* (Hs00914888_m1) et *STAT3* (Hs00374280_m1) proviennent de ThermoFisher Scientific (*TaqMan® Gene expression Assay*, Applied Biosystems). Toutes les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH* en utilisant les amorces et la sonde *Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control* (VICTM/MGB probe, primer limited, Applied BiosystemsTM, 432631E).

11. Infection avec le HDV

Les cellules Huh7-NTCP ou HepG2-NTCP sontensemencées dans des plaques 96 puits avec une concentration de $1 \cdot 10^4$ ou $2 \cdot 10^4$ cellules par puit, respectivement. Les PHH sontensemencés dans des plaques 48 puits avec une concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules par puit. Le lendemain, les cellules sont infectées avec l'inoculum infectieux contenant des particules de HDV recombinantes (100 GEq (*genome equivalent*)/cellule) supplémenté avec une solution de PEG 8000 4 %. L'inoculation du virus est définie comme étant le J0 dans les légendes des figures. Seize heures après l'inoculation (J1), les cellules sont lavées du PBS et cultivées dans du milieu de culture pour hépatocytes primaires complémenté avec du DMSO 2 % comme précédemment décrit (Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Zona, *et al.*, 2016; Verrier *et al.*, 2020). Les inhibiteurs de JAK, l'IFN- α -2a ou l'IL-6 sont ajoutés au milieu de culture aux concentrations indiquées à cette étape (J1), sauf indication contraire. La durée du traitement est indiquée dans les légendes des figures. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours avec du milieu frais contenant les différents composés. Après huit jours, l'infection est quantifiée par immunofluorescence ou par RT-qPCR comme décrit ci-dessus. Les cellules HepaRG sont différenciées pendant un mois puis infectées comme décrit précédemment

(Alfaiate *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2022 ; Lucifora *et al.*, 2023). L'infection est quantifiée par immunofluorescence comme décrit précédemment (Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Weiss, *et al.*, 2016; Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Zona, *et al.*, 2016; Verrier *et al.*, 2020). Brièvement, les cellules infectées avec le HDV sont lavées avec du PBS puis fixées avec une solution de PFA 2 %. Les sites de liaison non spécifiques sont ensuite saturés avec du PBS contenant 0.05 % de saponine et 0.5 % de BSA. Les cellules sont alors incubées avec un anticorps anti-HDAg produit chez le lapin (Eurogentec) et un anticorps secondaire marqué au fluorochrome Alexa Fluor 647 ciblant les IgG de lapin (Jackson Immuno Research, 111-605-144) ou marqué au fluorochrome Alexa Fluor 488 ciblant les IgG de lapin (Jackson Immuno Research, 711-545-152). L'anticorps anti-HDAg provient d'Eurogentec avec la permission de Janssen Pharmaceutica (Belgique) et a été décrit précédemment (Bach *et al.*, 2023). Les noyaux des cellules sont marqués avec du 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Enfin, les images sont obtenues à l'aide du microscope inversé *Axio Observer Z1* et travaillées avec le logiciel *ZEN* (Carl Zeiss, Allemagne). Alternativement, les cellules infectées avec le HDV sont lysées et les ARN totaux extraits en utilisant le kit *ReliaPrep™ RNA cell Miniprep System* (Promega) ou le kit *Viral RNA and DNA isolation kit* (Macherey-Nagel). L'étape de rétrotranscription est réalisée à l'aide du kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant. La quantification des ARN génomique et antigénomique du HDV est réalisée comme précédemment décrit (Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Weiss, *et al.*, 2016 ; Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Zona, *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2020) en utilisant les primers et la sonde TaqMan® suivants :

- HDV-835-852 amorce sens : 5'-TGGACGTGCGTCCTCCT-3'
- HDV-905-889 amorce anti-sens : 5'-TCTTCGGGTCCGGCATGG-3'.
- HDV-Pr-856-870 sonde : 5'-[FAM]-ATGCCAGGTCGGAC-[BHQ1]-3'

Toutes les valeurs sont normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH* en utilisant les amorces et la sonde *Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control* (VIC™/MGB probe, primer limited, Applied Biosystems™, 432631E).

12. Infection avec le HBV, le HCV ou le SARS-CoV-2

Les cellules HepG2-NTCP sont infectées avec des particules de HBV recombinantes produites à partir de cellules HepAD38 (500 GEq/cellule) comme décrit précédemment (Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Weiss, *et al.*, 2016 ; Eller *et al.*, 2020 ; Verrier *et al.*, 2022). L'infection est ensuite évaluée en quantifiant les ARN pré-génomique et pré-core (pg/pcRNA) du HBV par RT-qPCR en utilisant les primers et la sonde TaqMan® suivantes :

- HBV pg/pcRNA amorce sens : 5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT-3'
- HBV pg/pcRNA amorce anti-sens : 5'-CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT-3'
- HBV-Pr-pg/pcRNA sonde : 5'-[FAM]-TCTCAATCGCCGCGTC-[BHQ1]-3'.

Alternativement, l'infection est étudiée par détection des antigènes de surface du HBV (HBsAg) dans les cellules infectées onze jours après l'inoculation du virus comme décrit précédemment (Verrier *et al.*, 2018, 2022 ; Eller *et al.*, 2020). Des cellules Huh7.5.1 sont ensemencées dans des plaques 96 puits avec une concentration de 1.10^4 cellules par puit. Le lendemain, les cellules sont infectées avec des particules de HCV comme décrit précédemment (Krieger *et al.*, 2010; Lupberger *et al.*, 2011) pendant quatre heures puis traitées pendant trois jours avec 5 μ M de sofosbuvir ou 1 μ M d'upadacitinib. L'infection par le HCV est ensuite quantifiée en mesurant l'activité de la luciférase (Krieger *et al.*, 2010; Lupberger *et al.*, 2011) à l'aide d'un spectrophotomètre à lecteur de plaque (*Berthold Mithras LB 940*®). Des cellules S-Fuse sont ensemencées dans une plaque 96 puits (*Greiner bio one, #655090*) avec une concentration de $1,5.10^4$ cellules par puit. 10 μ g/ml d'un anticorps anti-SARS-CoV-2 (CR3022 Antibody ZooMab® Human Monoclonal, Merck) ou 1 μ M d'upadacitinib sont mélangés avec 100 PFU (*plaque-forming unit*) de virus. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules pendant 24 heures à 37°C. Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS et observées à l'aide d'un cytomètre (*Celigo imaging cytometer*, Nexcelcom) afin de quantifier les plaques vertes grâce à un algorithme de comptage de plaques.

13. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été contrôlée grâce à l'ajout directement dans le milieu de culture d'une solution de *PrestoBlue Cell Viability Reagent 10 X* (Invitrogen) non toxique pendant 45 minutes à 37°C selon les recommandations du fabricant. La viabilité des cellules est ensuite quantifiée en mesurant l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à lecteur de plaque (*Berthold Mithras LB 940*®).

14. Détection de l'expression des protéines par *Western blot*

Les cellules sont lavées avec du PBS froid puis lysées à l'aide du tampon de lyse *Glo Lysis Buffer* (Promega) auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéases (Thermo Fisher), le cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 3 (P0044, Sigma Aldrich) et le cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 2 (P5726, Sigma Aldrich). L'expression des protéines est ensuite évaluée par *Western blot* comme décrit précédemment (Verrier, Colpitts, Bach, Heydmann, Weiss, *et al.*, 2016). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : un anticorps monoclonal de souris anti-Cas9 (4G10, Diagenode), un anticorps monoclonal de lapin anti-YBX1 (EP2708Y)

(Abcam, ab76149), un anticorps monoclonal de lapin anti-JAK1 (#3344, Cell Signaling), un anticorps polyclonal de lapin anti-STAT1 (#9172, Cell Signaling), un anticorps monoclonal de lapin anti-phospho-STAT1 (#9167, Cell Signaling), un anticorps monoclonal de lapin anti-STAT3 (#4904, Cell Signaling), un anticorps monoclonal de lapin anti-phospho-STAT3 (#9145), l'anticorps polyclonal de lapin anti-HDAg décrit précédemment (Eurogentec), un anticorps monoclonal de lapin anti-ERK1/2 (#4695), un anticorps monoclonal de lapin anti-phospho-ERK1/2 (#4370, Cell Signaling), un anticorps polyclonal de lapin anti-P53 (#9282, Cell Signaling), un anticorps polyclonal de lapin anti- β -tubuline (GTX101279, Gentex) et un anticorps monoclonal de souris anti- β -actine (A5441, Sigma). Les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (*horseradish peroxidase*) suivants ont été utilisés : un anticorps anti-IgG (H+L) de lapin produit chez la chèvre (115-035-144, Jackson ImmunoResearch) et un anticorps anti-IgG (H+L) de souris produit chez la chèvre (115-035-146, Jackson ImmunoResearch). L'expression des différentes protéines est détectée à l'aide d'un imageur numérique (*ChemiDocTM Imaging System*, BioRad). Le marqueur de taille *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (#1610374, BioRad) a été utilisée. Le marqueur de taille (M) ainsi que la taille des bandes de référence (kDa, pour kilodalton) sont indiqués dans les différentes figures.

15. Impact du KO de *JAK1* sur l'entrée du virus dans la cellule

Les cellules Huh7-NTCP-Cas9 et JAK1-KO sontensemencées dans des plaques 24 puits avec une concentration de $2 \cdot 10^4$ cellules par puit. Après trois jours, le milieu de culture est remplacé par du milieu de différenciation contenant du DMSO 2 %. Après une semaine de différenciation, une partie des cellules est lysée et l'expression de la protéine JAK1 contrôlée par *Western blot*. En parallèle, le reste des cellules est détaché etensemencé dans des plaques 96 puits avec une concentration de $1 \cdot 10^4$ cellules par puit. Le lendemain, les cellules sont prétraitées ou non pendant une heure à 37°C avec 200 nM du peptide Prés1 puis infectées avec des particules du HBV recombinantes (1000 GEq/cellule) ou avec des particules du HDV recombinantes (100 GEq/cellule). Seize heures après l'inoculation du virus, les cellules sont lavées avec du PBS et cultivées dans du milieu de culture pour hépatocytes primaires complémenté avec du DMSO 2 % (pour les cellules infectées avec le HDV) ou du DMSO 3,5 % (pour les cellules infectées avec le HBV) pendant onze jours. L'infection par le HDV est quantifiée par RT-qPCR ou immunofluorescence comme décrit ci-dessus. L'infection par le HBV est quantifiée par RT-qPCR ou par immunodétection des HBsAg en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-HBsAg (clone 1044/329, Bio-Techne, USA) et un anticorps secondaire marqué au fluorochrome Alexa Fluor 647 ciblant les IgG de souris (Jackson Research). Les noyaux des cellules sont marqués avec du DAPI. Enfin, les images sont

obtenues à l'aide du microscope inversé *Axio Observer Z1* et travaillées avec le logiciel *ZEN* (Carl Zeiss, Allemagne).

16. Traitements combinant IFN- α -2a et inhibiteurs de JAK1

Des cellules Huh7-NTCP sont infectées avec le HDV (100 GEq/cellule) comme décrit ci-dessus. Le lendemain, les cellules sont traitées avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a, 100 nM d'inhibiteurs de JAK1 ou un mélange associant 1000 UI/ml d'IFN- α -2a avec 100 nM de filgotinib ou d'upadacitinib, ou un mélange combinant 50 nM de filgotinib avec 50 nM d'upadacitinib. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours avec du milieu frais contenant les différents composés. Après huit jours, l'infection par le HDV est évaluée par RT-qPCR ou immunofluorescence comme décrit ci-dessus. Alternativement, des cellules HepG2-NTCP sont ensemencées dans des plaques 96 puits avec une concentration de $1,5 \cdot 10^4$ cellules par puit. Le lendemain, les cellules sont infectées avec l'inoculum infectieux contenant des particules de HDV (100 GEq/cellule) et des particules de HBV (500 GEq/cellule) complété avec du PEG 8000 4%. Le lendemain, les cellules sont traitées avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a, 100 nM d'inhibiteurs de JAK1 ou un mélange associant 1000 UI/ml d'IFN- α -2a avec 100 nM de filgotinib ou d'upadacitinib, ou un mélange combinant 50 nM de filgotinib avec 50 nM d'upadacitinib. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours avec du milieu frais contenant les différents composés. Après onze jours, l'infection par le HDV et le HBV est évaluée par RT-qPCR ou immunofluorescence comme décrit ci-dessus.

17. Inhibition de JAK1 et interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II

L'interaction entre l'ARN polymérase II et l'ARN du HDV est étudiée grâce à des expériences d'immunoprécipitation de l'ARN (RIP, pour *RNA immunoprecipitation assay*). Brièvement, les cellules Huh7-NTCP sont infectées avec le HDV (100 GEq/cellule) et traitées ou non avec une dose sous-optimale de 10 nM d'upadacitinib. Après huit jours d'infection, les cellules sont réticulées à l'aide d'une solution de formaldéhyde 0.2 %. L'expérience de RIP est réalisée comme décrit précédemment (Michelet *et al.*, 2022 ; Lucifora *et al.*, 2023) en utilisant des billes magnétiques (*magnetic protein G beads 10004D, Invitrogen*) couplées avec une IgG contrôle de souris (ChiP grade, ab18413, Abcam) ou un anticorps monoclonal de souris anti-RNA-polymérase-II (C15200004, Diagenode) ou avec l'anticorps anti-HDAg décrit précédemment (Eurogentec). L'ARN est extrait des cellules à l'aide du kit *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Lucigene) selon les instructions du fabricant et quantifié par qPCR comme décrit ci-dessus. L'expression protéique dans chaque échantillon est analysée par *Western blot* en utilisant un anticorps anti-HDAg ou un anticorps anti-ARN-

polymérase-II et une solution de VeriBlot for IP Detection Reagent (HRP) (ab131366) ou un anti-IgG (H+L) de souris produit chez la chèvre (115-035-146, Jackson Research).

18. Impact de l'activité kinase de JAK1 et de l'infection par le HDV sur la phosphorylation de STAT1 et STAT3

Les différentes lignées dérivées des cellules Huh7-NTCP sont traitées pendant 30 minutes avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a ou 100 ng/ml d'IL-6. Les cellules sont ensuite lysées et les niveaux de phosphorylation de STAT1 (pSTAT1) et STAT3 (pSTAT3) analysés par *Western blot* comme décrit ci-dessus. Alternativement, les cellules Huh7-NTCP ainsi que les différentes lignées dérivées ou les PHH sont traités avec de l'upadacitinib, du filgotinib ou du fedratinib aux concentrations indiquées pendant six heures puis stimulés avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a ou 100 ng/ml d'IL-6 pendant 30 minutes. L'expression de pSTAT1 et pSTAT3 est évalué par *Western blot* comme décrit précédemment. Par ailleurs, les cellules Huh7-NTCP et les cellules HepaRG différenciées sauvages ou KO pour *MDA5* sont infectées avec le HDV pendant huit à neuf jours et l'expression de pSTAT1 et pSTAT3 est étudiée par *Western blot*.

19. Analyse de la phosphorylation de l'antigène delta

Les cellules JAK1-KO ou transfectées avec le siJAK1-Pool sont transfectées avec le plasmide d'expression VB221003-1138wys exprimant S-HDAg ou le plasmide d'expression VB230614-1248tvr exprimant une version mutée de S-HDAg (S1771A). La phosphorylation de l'antigène delta est étudiée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide du kit *PierceTM Crosslink Magnetic IP/Co-IP* (Thermo Fisher Scientific) en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-phospho-sérine (clone 4A4, Millipore) selon les instructions du fabricant. La détection des antigènes phosphorylés pour les différents éluats est effectuée par *Western blot* en utilisant l'anticorps anti-phospho-sérine et une solution de *VeryBlot for IP Detection Reagent* (HRP) (ab131366, Abcam).

20. Activité kinase de JAK1 sur la phosphorylation de MAPK

Des cellules Huh7-NTCP-Cas9 ou JAK1-KO sont traitées avec 100 ng/ml d'IL-6 pendant trente minutes. Les cellules sont ensuite lysées et l'état de phosphorylation de 37 kinases est étudiée à l'aide du kit *Human Phospho-Kinase Array Kit* (ARY003C, Proteome Profiler Array) selon les instructions du fabricant. En guise de validation, la même expérience est réalisée et la phosphorylation de ERK1/2 étudiée par *Western blot* comme décrit précédemment. Finalement, des cellules Huh7-NTCP ou des PHH sont traités avec 1 μ M d'upadacitinib, de filgotinib ou de fedratinib pendant six heures et l'expression de pERK1/2 est analysée par *Western blot* comme décrit ci-dessus.

21. Analyse et présentation des données

Les expériences sont répétées au moins trois fois de manière indépendante. Chaque expérience est réalisée en utilisant deux ou trois répliques biologiques. Le nombre d'expériences indépendantes est indiqué dans chaque légende de figure. Les données quantitatives sont exprimées comme la moyenne +/- l'écart type (SD, pour *standard deviation*) relative à la condition contrôle fixée à 100 % sauf mention contraire dans les légendes des figures. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney. Les p-valeurs significatives suivantes sont indiquées avec des astérisques dans les figures individuelles ainsi que dans les légendes qui leur sont associées : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***). Pour les *Western blot* et les images d'immunofluorescence, une expérience représentative est montrée. Tous les graphiques et les schémas du manuscrit sont réalisés à l'aide des logiciels *GraphPad Prism 9* et *Biorender.com*.

RÉSULTATS

Production de particules du HDV recombinantes

1. Objectifs

La première étape de mon projet de thèse a consisté à produire le virus nécessaire aux différentes expériences. Dans ce contexte, j'ai participé à un projet visant à développer une nouvelle lignée hépatocytaire permettant la production de particules recombinantes du HDV, l'étude de l'assemblage du virus et la validation de molécules à activité antivirale. Ainsi, j'ai pris part à la caractérisation de cette nouvelle lignée cellulaire, ce qui m'a permis de contribuer à la publication d'un article dans le journal *Antiviral Research* en 2023 (voir **Annexe 1** (Bach *et al.*, 2023)).

2. Génération de la lignée cellulaire Huh7-2C8D

Cette nouvelle lignée cellulaire stable, nommée Huh7-2C8D, a été développée au laboratoire en transduisant des cellules Huh7 avec un vecteur lentiviral pLX304-HB2.7 permettant l'expression des HBsAg. À partir du groupe de cellules Huh7.HB2.7 obtenues, le clone Huh7-2C8 a été isolé et amplifié, générant ainsi la lignée Huh7-2C8. Les cellules Huh7-2C8 ont ensuite été transfectées avec le plasmide pSVLD3-neo, permettant l'expression du génome du HDV et conduisant à la production de la lignée cellulaire Huh7-2C8D, capable de libérer dans le surnageant des particules du HDV recombinantes.

3. Caractérisation de la lignée cellulaire Huh7-2C8D

Pour s'assurer que les particules produites par les cellules Huh7-2C8D contiennent à la fois à la fois les HBsAg et le génome du HDV, des expériences d'ultracentrifugation sur gradient de densité à base d'iodixanol ont été réalisées. Les cellules Huh7-2C8 qui expriment les HBsAg mais pas le génome du HDV ont servi de contrôle négatif. La densité des fractions individuelles pour les deux lignées cellulaires a aussi été analysée et s'est révélée comparable entre les deux lignées Huh7-2C8 et Huh7-2C8D, confirmant la validité de l'expérience.

Comme indiqué dans la **Figure 16**, les résultats obtenus pour les surnageants des cellules Huh7-2C8D ont démontré que l'ARN du HDV est détecté dans les mêmes fractions que celles contenant les HBsAg. Ceci suggère que les cellules Huh7-2C8D produisent et sécrètent de manière stable l'HDV et les HBsAg, faisant de cette lignée cellulaire un modèle approprié pour l'étude de la réplication et de l'assemblage du HDV.

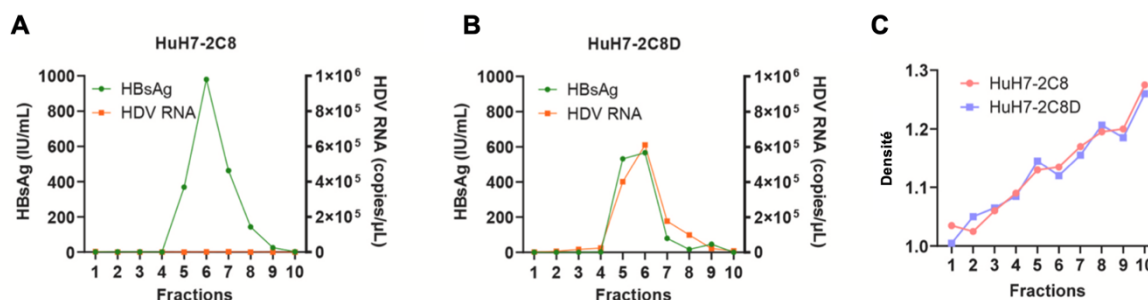


Figure 16 : Caractérisation de la lignée Huh7-2C8D. (A-B) Gradient de densité à base d'iodixanol. Le surnageant des cellules Huh7-2C8 (A) et Huh7-2C8D (B) a été concentré avec un coussin de sucrose à 30 % et purifié à l'aide d'un gradient de densité de 10 à 45 % d'iodixanol. Dix fractions ont été collectées. Les niveaux d'expression des HBsAg dans chaque fraction ont été évalués par CLIA. Alternativement, l'ARN total a été extrait et les niveaux d'expression de l'ARN du HDV dans chaque fraction ont été quantifiés par RT-qPCR. Par ailleurs, 200 μ l de chaque fraction ont été utilisés pour évaluer la densité (C). Ces expériences ont été réalisées par des ingénieurs du laboratoire (résultats publiés dans Bach et al., 2023).

Nous avons ensuite voulu tester l'infectivité des particules recombinantes du HDV produites dans les cellules Huh7-2C8D. Pour cela, les cellules Huh7-2C8D ont été cultivées dans du milieu de production puis leurs surnageants ont été récoltés et titrés. Des cellules Huh7-NTCP ont ensuite étéensemencées puis infectées avec l'inoculum contenant des concentrations croissantes en particules du HDV. Pour valider la spécificité de l'infection, les cellules Huh7-NTCP ont été préalablement traitées avec un peptide PréS1 synthétique qui inhibe l'entrée virale.

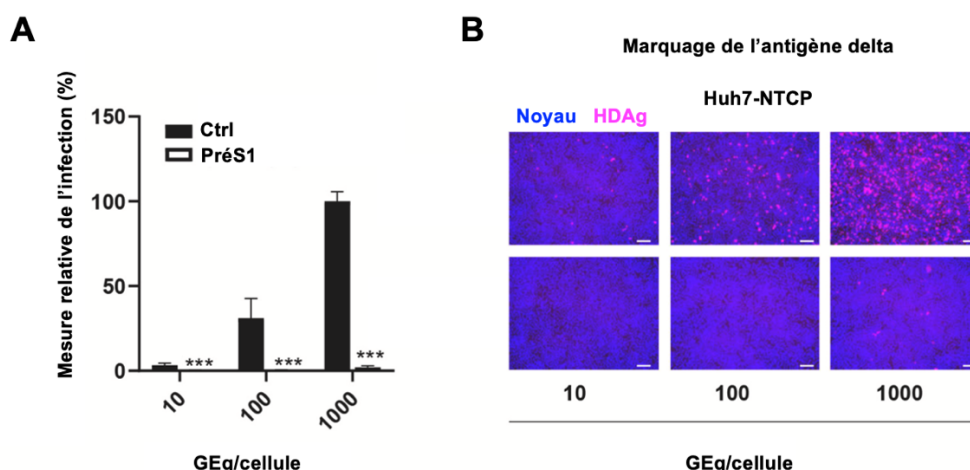


Figure 17 : Infection de cellules Huh7-NTCP avec le surnageant des cellules Huh7-2C8D. Des cellules Huh7-NTCP ont été infectées avec différentes concentrations en virus pendant sept jours à la suite d'un traitement ou non avec le peptide PréS1 qui inhibe l'entrée virale. L'infection par le HDV a ensuite été évaluée par RT-qPCR (A) ou par quantification du nombre de cellules HDAg-positives (B). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules infectées avec une MOI (multiplicity of infection) de 1000 GEq/cellule (100 %) à partir de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante a été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***). Des images d'immunofluorescence représentatives pour chaque condition sont présentées (Barre d'échelle : 100 μ m). Ces expériences ont été réalisées par des ingénieurs du laboratoire (résultats publiés dans Bach et al., 2023).

L'infection par le HDV a été évaluée par immunodétection de l'HDAg et quantification de l'ARN du HDV par RT-qPCR. Comme indiqué dans la **Figure 17**, nos résultats ont démontré que les particules recombinantes du HDV sécrétées par les cellules Huh7-2C8D infectent efficacement les cellules Huh7-NTCP sensibles, et ceci de manière spécifique puisque l'infection par le HDV a été fortement inhibée par le traitement avec le peptide Prés1. De ce fait, les cellules Huh7-2C8D peuvent servir à produire des stocks importants de virus recombinants.

Enfin, nous avons voulu savoir si les cellules Huh7-2C8D pouvaient être utilisées pour l'étude des interactions entre le HDV et son hôte. Dans ce contexte, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à partir de cellules Huh7-2C8D et à l'aide d'un anticorps anti-HDAg. Les résultats obtenus et présentés dans la **Figure 18** ont confirmé les données d'une précédente étude révélant une interaction intracellulaire entre l'HDAg et l'hélicase cellulaire MOV10 (Haussecker *et al.*, 2008). Ceci suggère que les cellules Huh7-2C8D constituent un nouvel outil pour la réalisation de criblages afin d'identifier de nouveaux facteurs de l'hôte impliqués dans l'infection par le HDV.

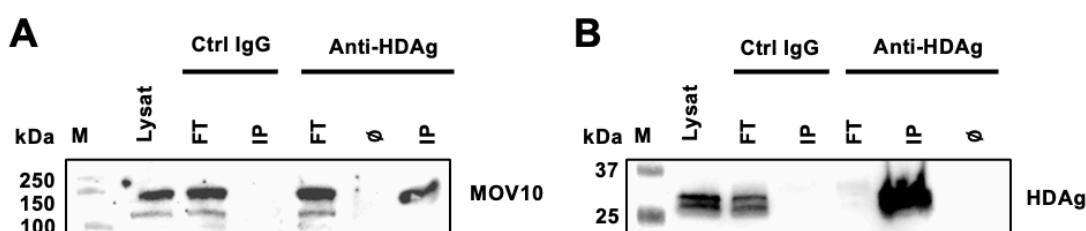


Figure 18 : L'antigène delta interagit avec MOV10 dans les cellules Huh7-2C8D. (A-B) Des cellules Huh7-2C8D ont été lysées puis utilisées pour des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-HDAg purifié à partir de patients co-infectés par le HBV et le HDV. L'expression de MOV10 (A) et de HDAg (B) a été examinée en parallèle par Western blot. Une expérience représentative est montrée. FT : flow through ; Ø : panel vide (résultats publiés dans Bach *et al.*, 2023).

En conclusion, nous avons établi une nouvelle lignée cellulaire stable permettant la production de grandes quantités de virus pour des études à haut débit dans différents modèles d'infection. Avant l'obtention de cette lignée, la production de particules recombinantes du HDV reposait sur la transfection conjointe de cellules avec un plasmide codant pour les HBsAg et le HDV (Sureau, Guerra and Lee, 1994). Ainsi, la lignée Huh7-2C8D constitue un modèle rapide et pratique de production de virus, qui permet de surmonter les problèmes de coût et de temps liés aux méthodes de transfection transitoire. En outre, en tant que lignée cellulaire immortalisée, les cellules Huh7-2C8D devraient se prêter dans le futur à des criblages de génétique et de petites molécules à haut débit pour la caractérisation de nouveaux facteurs de l'hôte impliqués dans la réplication, l'assemblage et la libération du HDV.

Caractérisation de JAK1 comme facteur d'hôte du HDV et cible antivirale

1. Objectifs

Dans le contexte d'une interaction complexe entre le HDV et les facteurs de l'immunité innée ainsi que de la nécessité de trouver de nouvelles cibles antivirales, un criblage de génomique fonctionnelle par perte de fonction ciblant plus de 7500 gènes a précédemment été réalisé en utilisant pour chaque gène une combinaison de quatre petits ARN interférents (siRNA) (Verrier *et al.*, 2020). Ce criblage a permis l'identification de 191 candidats potentiellement important pour le cycle du HDV. Parmi les principaux candidats figuraient des membres clés de la voie de biosynthèse des pyrimidines mais aussi, de manière surprenante, la kinase JAK1.

Bien que JAK1 joue un rôle clé dans la réponse immunitaire innée contre les infections virales (Roca Suarez *et al.*, 2018), les résultats du criblage ont révélé une activité provirale inattendue de cette kinase dans les cellules infectées par le HDV. L'objectif de mes recherches a ainsi consisté à valider JAK1 comme facteur d'hôte pour l'infection par le HDV et d'en évaluer le potentiel comme cible antivirale pour le développement de thérapies innovantes contre l'hépatite D.

2. Validation des résultats du criblage primaire

2.1 Expériences de perte de fonction dans les cellules Huh7-NTCP

Afin de confirmer le rôle proviral de JAK1 dans l'infection par le HDV, j'ai tout d'abord réalisé des expériences de perte de fonction dans des cellules Huh7-NTCP, le type cellulaire utilisé lors du criblage primaire, en effectuant la déconvolution des siRNA utilisés pour éliminer les effets non spécifiques sur le HDV.

Pour cela, des cellules Huh7-NTCP ont été transfectées avec les quatre siRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de *JAK1* de manière individuelle (siJAK1-1, -2, -3 ou -4) ou combinée (siJAK1-Pool), ou avec un siRNA contrôle ne ciblant aucune séquence humaine (siCTRL). Après 72 heures, l'efficacité de diminution de l'expression de *JAK1* a été évaluée par *Western blot* (**Figure 19B**).

Les cellules ont ensuite été infectées avec le HDV. Huit jours après l'inoculation du virus, la viabilité cellulaire a été contrôlée et l'infection virale quantifiée par RT-qPCR ou immunofluorescence (**Figure 19C-E**). Les résultats obtenus ont démontré que plus la baisse

de l'expression de *JAK1* induite par les différents siRNA est importante, plus l'infection par le HDV est inhibée, confirmant ainsi les observations du criblage primaire.

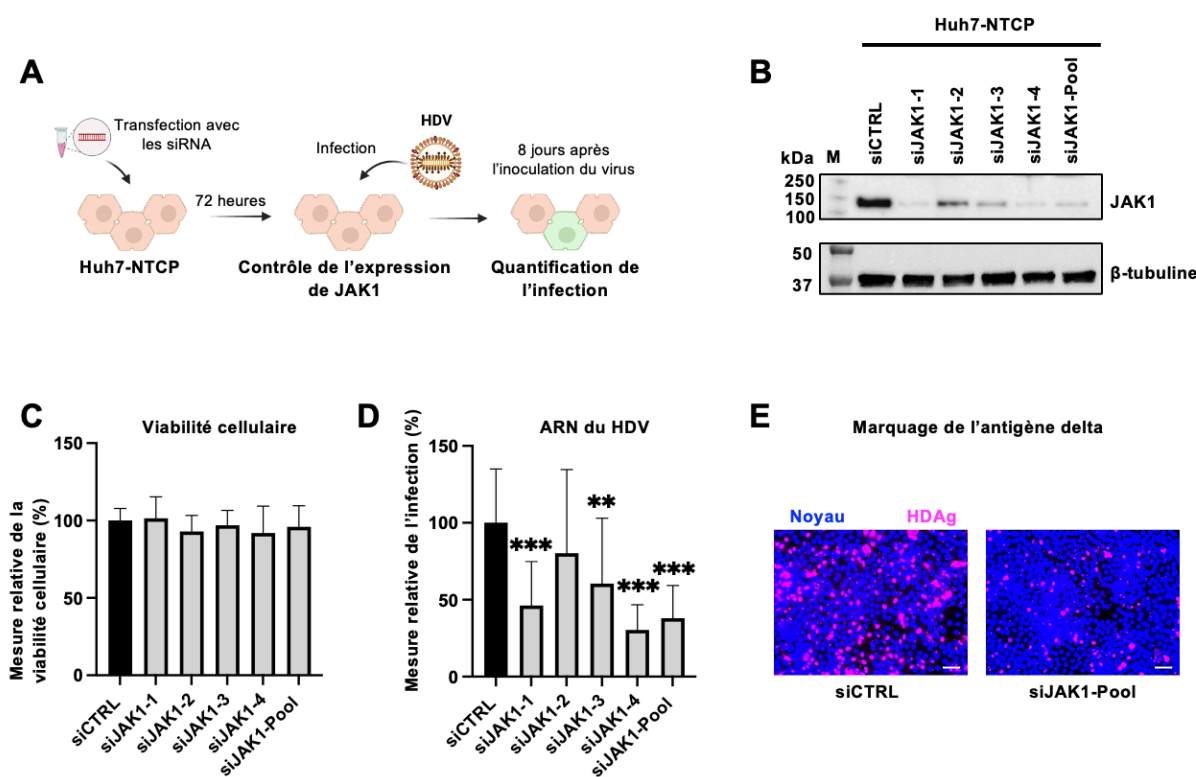


Figure 19 : La diminution de l'expression de *JAK1* est associée à une baisse de l'infection par le HDV. (A) Stratégie expérimentale. (B) Diminution de l'expression de *JAK1* dans les cellules Huh7-NTCP. L'expression de *JAK1* a été contrôlée par Western blot 72 heures après la transfection avec les différents siRNA. Les résultats d'une expérience représentative sont présentés. (C-E) Les cellules ont ensuite été infectées avec le HDV pendant huit jours. La viabilité cellulaire a été contrôlée (C) et l'infection quantifiée par RT-qPCR à partir de six expériences indépendantes (D). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules transfectées avec le siCTRL (100 %). Alternativement, l'infection par le HDV a été évaluée par immunofluorescence (E) (Barre d'échelle : 100 μ m). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ () et $p < 0,001$ (***).**

J'ai ensuite voulu vérifier si la baisse de l'expression de *JAK1* affecte l'entrée du HDV dans les cellules. Pour cela, j'ai transfecté des cellules Huh7-NTCP avec le siJAK1-Pool après l'inoculation du virus. Un siRNA ciblant le récepteur d'entrée NTCP (siNTCP) a été utilisé en guise de contrôle négatif. Les résultats obtenus ont révélé que la transfection des cellules avec le siJAK1-Pool après l'infection est également associée à une diminution de l'infection par le HDV, ce qui suggère un rôle pour *JAK1* dans la réplication virale et non dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte (**Figure 20**).

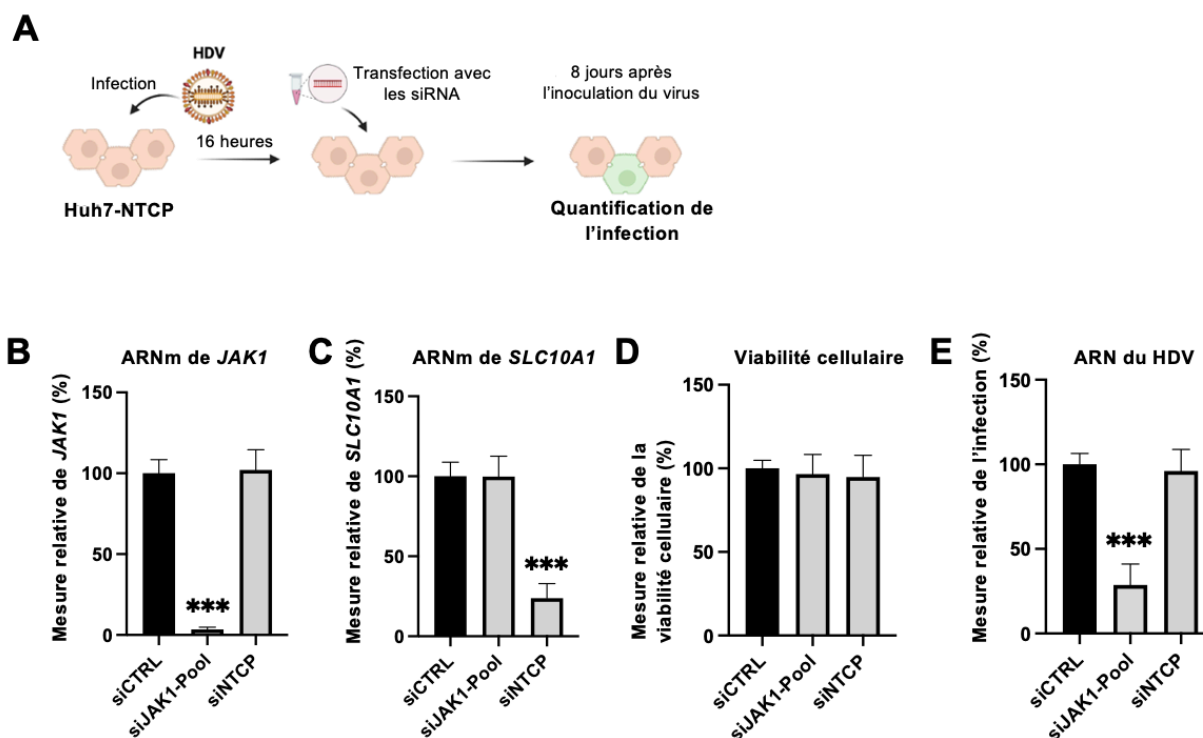


Figure 20 : La diminution de l'expression de JAK1 affecte l'infection du HDV après l'entrée virale. (A) Les cellules Huh7-NTCP ont été infectées avec le HDV puis transfectées avec le siCTRL, le siJAK1-Pool ou avec un siRNA ciblant l'ARNm de SLC10A1 (NTCP). (B-E) Après huit jours d'infection, l'expression de JAK1 (B), l'expression de SLC10A1 (C) et les niveaux d'ARN du HDV (E) ont été quantifiés par RT-qPCR. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules transfectées avec le siCTRL (100 %). La viabilité cellulaire a également été contrôlée (D). Les résultats de trois expériences indépendantes sont présentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante ont été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***).

2.2 Expériences de perte de fonction dans les PHH

Après l'obtention de ces données, j'ai évalué les effets d'une diminution de l'expression de *JAK1* dans un modèle plus pertinent pour l'étude de l'infection par le HDV, à savoir dans des hépatocytes primaires humains (PHH).

Pour cela, des PHH ont été transfectés avec le siJAK1-Pool ou le siCTRL comme décrit précédemment puis infectés avec le HDV pendant huit jours. L'expression de *JAK1*, la viabilité cellulaire ainsi que les niveaux d'infection par le HDV ont ensuite été évalués. Les résultats obtenus ont révélé que la baisse de l'expression de *JAK1* est également associée à une inhibition significative de l'infection dans les PHH, validant ainsi le rôle proviral de *JAK1* dans l'infection par le HDV dans le modèle de culture cellulaire le plus physiologique d'un point de vue clinique (Figure 21).

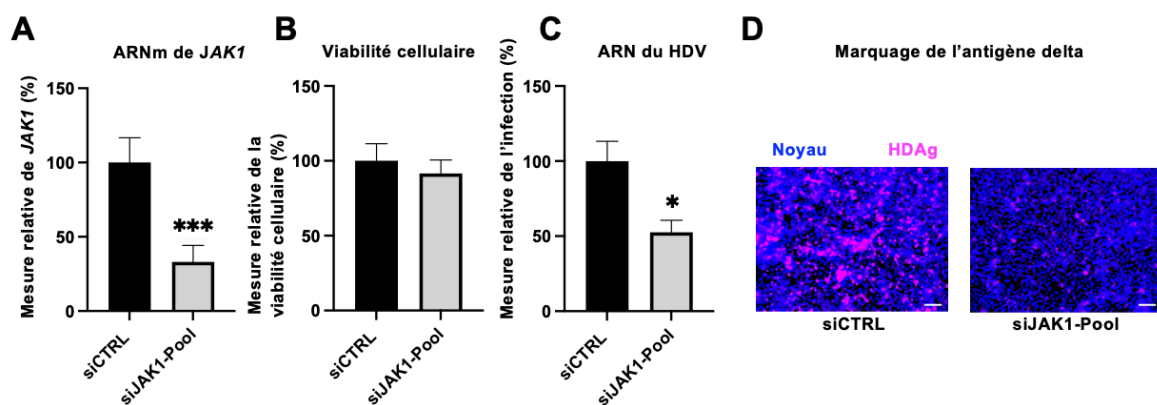


Figure 21 : La baisse d'expression de JAK1 inhibe l'infection par le HDV dans les PHH. Des PHH ont été transfectés avec le siJAK1-Pool ou le siCTRL puis infectés avec le HDV pendant huit jours. L'expression de JAK1 a été évaluée par RT-qPCR (A). La viabilité cellulaire (B) ainsi que l'infection par le HDV ont été évaluées (C) à partir de quatre expériences indépendantes. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules transfectées avec le siCTRL (100 %). Alternativement, l'infection a été analysée par immunofluorescence (D) (Barre d'échelle : 100 μ m). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,05$ (*) et $p < 0,001$ (***)

3. Étude des interactions entre le HDV et JAK1

3.1 Production d'une lignée cellulaire KO pour JAK1

Afin de valider définitivement l'activité provirale de JAK1 dans l'infection par le HDV, j'ai produit une lignée *knock-out* (KO) pour le gène *JAK1* nommée Huh7-NTCP-JAK1-KO à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. Pour cela, des cellules Huh7-NTCP ont été transduites avec un plasmide contenant l'endonucléase Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) et un ARN guide ciblant spécifiquement *JAK1*.

Par ailleurs, une lignée codant pour l'endonucléase Cas9 nommée Huh7-NTCP-Cas9 ainsi qu'une lignée KO pour le gène *YBX1* (*Y-Box Binding Protein 1*) (Huh7-NTCP-YBX1-KO), un facteur cellulaire identifié comme interagissant avec l'HDAG dans des études de protéomique mais qui n'est pas un candidat du criblage primaire, ont été générées. Comme indiqué dans la **Figure 22**, la perte de l'expression de la protéine YBX1 n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire ainsi que sur les niveaux d'infection par le HDV par rapport aux cellules Huh7-NTCP contrôles. En outre, les niveaux d'infection par le HDV sont comparables entre les cellules Huh7-NTCP-Cas9 et les cellules contrôles. Ces données suggèrent que les cellules Huh7-NTCP-Cas9 et YBX1-KO constituent de bons contrôles négatifs pour l'étude des effets du KO de *JAK1* sur l'infection par le HDV. L'obtention de ces résultats m'a permis de contribuer à la publication d'un article dans la revue *Gut* en 2022 (Voir **Annexe 2** (Verrier *et al.*, 2022)).

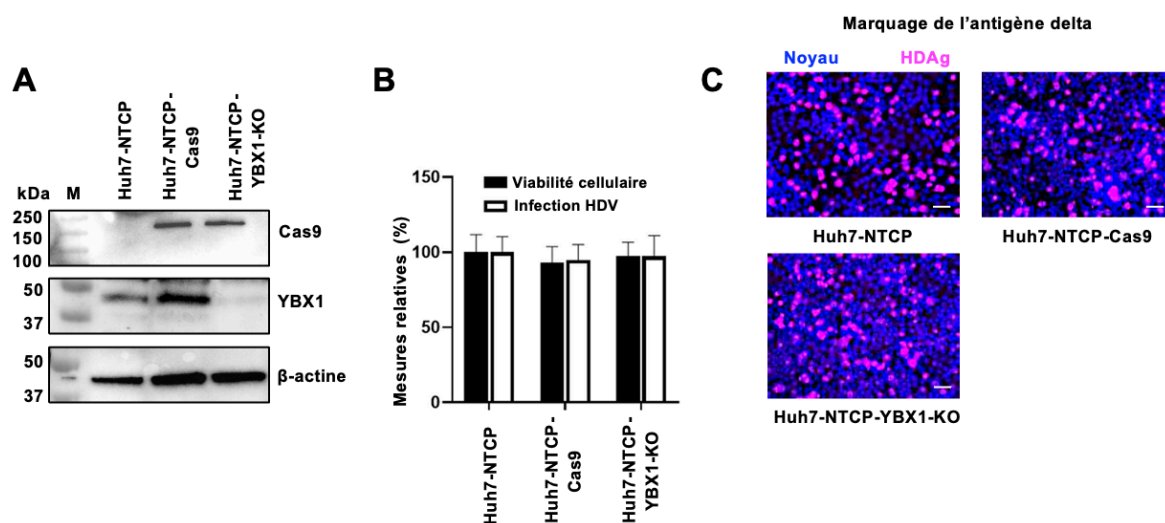


Figure 22 : Étude des effets du KO de YBX1 sur l'infection par le HDV dans les cellules Huh7-NTCP. (A) L'expression des protéines YBX1 et Cas9 a été contrôlée par Western blot. Les résultats d'une expérience significative sont présentés. (B-C) L'extinction de l'expression du gène YBX1 n'affecte pas l'infection par le HDV. Les cellules Huh7-NTCP, Huh7-NTCP-Cas9 et Huh7-NTCP-YBX1-KO ont été infectées avec le HDV. Huit jours après l'inoculation du virus, la viabilité cellulaire ainsi que l'infection ont été quantifiées par RT-qPCR (B). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules Huh7-NTCP contrôles (100 %). (C) Alternativement, l'infection par le HDV a été évaluée par immunofluorescence (Barre d'échelle : 100 μ m) (résultats publiés dans Verrier et al., 2022).

Pour m'assurer ensuite que la population cellulaire utilisée pour les expériences est bien KO pour le gène *JAK1* et limiter la réapparition de l'expression de la protéine au cours des passages cellulaires, une sélection clonale a été réalisée. Ces expériences ont permis de générer quatre clones différents (nommés clone #1-4) qui n'expriment plus la protéine *JAK1* (Figure 23A).

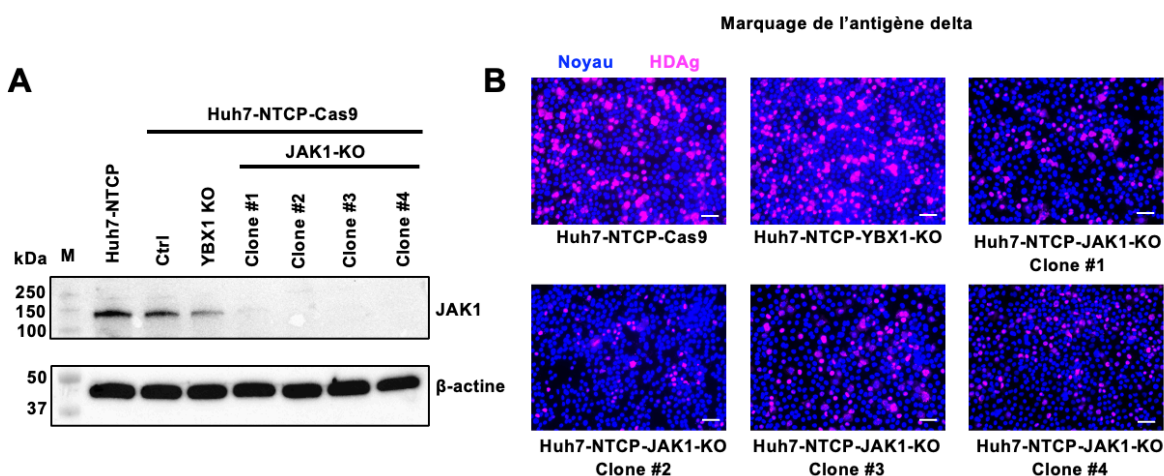


Figure 23 : Génération de clones Huh7-NTCP-JAK1-KO. (A) Contrôle de l'expression de la protéine *JAK1* dans les différents clones par Western blot. (B) Évaluation de l'infection par le HDV par immunofluorescence huit jours après l'inoculation du virus (Barre d'échelle : 100 μ m).

Les différents clones ont ensuite été infectés avec le HDV pour évaluer les effets de l'extinction de l'expression du gène *JAK1* sur les niveaux d'infection par le HDV. Huit jours après l'inoculation du virus, l'infection a été évaluée par immunofluorescence (**Figure 23B**). Les résultats obtenus ont révélé que l'inhibition de l'expression de la protéine JAK1 est associée à une baisse marquée de l'infection par le HDV par rapport aux cellules contrôles Huh7-NTCP-Cas9 et Huh7-NTCP-YBX1-KO, confirmant l'importance de JAK1 pour l'infection par le HDV. Le clone #2 présentait l'effet le plus marqué sur l'infection et a ainsi été sélectionné pour la suite des expériences.

3.2 Restauration de l'expression de JAK1 dans les cellules KO et surexpression de mutants fonctionnels de JAK1

Afin de confirmer l'activité provirale de JAK1 dans l'infection par le HDV et d'identifier les domaines fonctionnels de la protéine importants pour les interactions avec le virus, les cellules Huh7-NTCP-JAK1-KO ont été à leur tour transduites pour générer quatre autres lignées cellulaires :

- Une lignée Huh7-NTCP-JAK1^{Res} permettant de restaurer l'expression d'une version sauvage de la protéine JAK1 résistante à l'ARN guide utilisé pour produire les cellules KO pour *JAK1* ;
- Une lignée Huh7-NTCP-JAK1^{Mut1} exprimant une version mutée de JAK1 comportant les mutations L633K et K622A dans le domaine pseudo-kinase de la protéine. Cette mutation a pour effet de mimer l'activité des inhibiteurs de JAK1 utilisés en clinique en inhibant la liaison de l'ATP sur son site de fixation (Raivola, Haikarainen and Silvennoinen, 2019) ;
- Une lignée Huh7-NTCP-JAK1^{Mut2} qui possède la double substitution P733L et P832S dans le domaine pseudo-kinase et qui est associée à une baisse de la phosphorylation des protéines STAT (Eletto *et al.*, 2016) ;
- Une lignée Huh7-NTCP-JAK1^{Mut3} caractérisée par la présence de la mutation G902E dans le domaine kinase de la protéine. Cette mutation a été retrouvée chez des patients atteints d'un HCC mais ne semble pas impacter les voies de signalisation JAK/STAT (Kan *et al.*, 2013).

Pour étudier l'activité kinase de ces différentes lignées, les cellules ont été traitées avec de l'IFN- α -2a pendant 30 minutes pour activer les voies de signalisation JAK/STAT, puis lysées afin d'évaluer les niveaux de phosphorylation des protéines STAT1 et STAT3 par *Western blot* (**Figure 24A**).

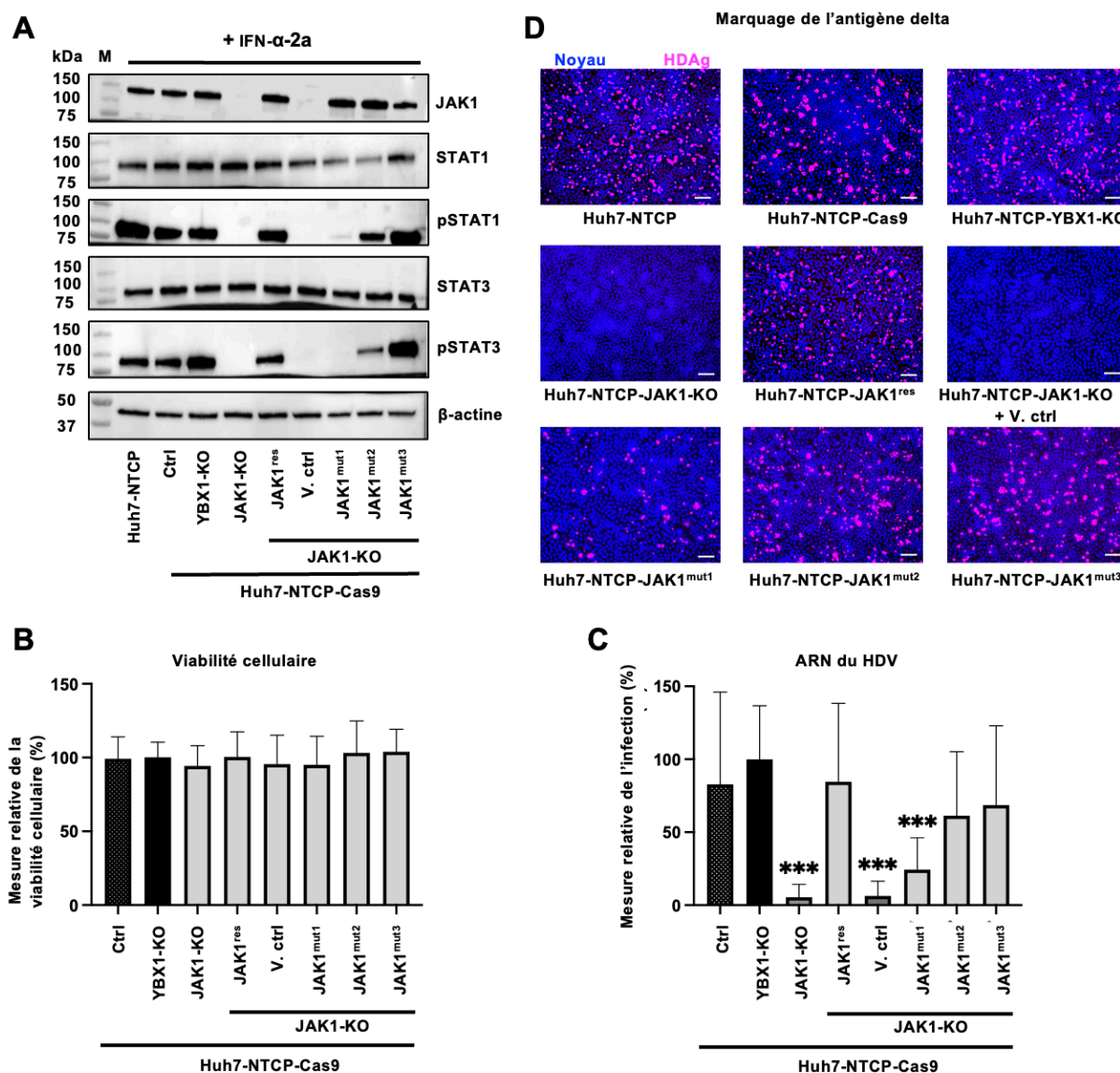


Figure 24 : JAK1 est un facteur d'hôte du HDV. (A) Les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a. L'expression des protéines STAT1, STAT3 et de leurs formes phosphorylées (pSTAT1 et pSTAT3) a été examinée par Western blot. Les résultats d'une expérience représentative sont montrés (B-C) L'activité kinase de JAK1 est cruciale pour l'infection par le HDV. Les cellules ont été infectées avec le HDV. Huit jours après l'inoculation du virus, la viabilité cellulaire a été contrôlée (B) et l'infection par le HDV quantifiée par RT-qPCR (C). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules Huh7-NTCP-YBX1-KO infectées avec le HDV (100 %) pour quatre expériences indépendantes. Alternativement, l'infection par le HDV a été évaluée par immunofluorescence (Barre d'échelle : 100 μ m) (D). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante a été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***)

Les résultats obtenus ont démontré que les cellules KO pour JAK1 mais aussi les cellules JAK1^{Mut1} sont fortement affectées dans leur capacité à phosphoryler les protéines STAT à la suite d'une stimulation avec de l'IFN- α -2a. Les cellules JAK1^{Mut2} et JAK1^{Mut3} semblent, quant à elles, toujours capables de phosphoryler les protéines STAT1 et STAT3, bien qu'une bande de

plus faible intensité pour pSTAT1 et pSTAT3 soit observée pour les cellules $JAK1^{Mut2}$ par rapport aux cellules contrôles.

Pour valider le rôle de JAK1 dans l'infection par le HDV, les différentes lignées ont ensuite été infectées avec le HDV. Le niveau d'infection ainsi que la viabilité cellulaire ont été évalués huit jours après l'inoculation du virus (**Figure 24B-D**). Les résultats ont révélé que le KO de *JAK1* inhibe fortement l'infection par le HDV tandis que le rétablissement de l'expression de *JAK1* est associé à une restauration du phénotype infectieux, confirmant ainsi l'importance de JAK1 pour l'infection par le HDV.

Par ailleurs, aucune restauration des niveaux d'infection du HDV n'a été observée dans les cellules $JAK1^{Mut1}$, tandis que les cellules $JAK1^{Mut2}$ et $JAK1^{Mut3}$ n'ont pas affecté de manière significative l'infection par le HDV. L'ensemble de ces données suggèrent que l'activité kinase de JAK1, qui est bloquée dans les cellules $JAK1^{Mut1}$, joue un rôle clé dans le cycle de multiplication du HDV.

3.3 Effets du KO de *JAK1* sur la sensibilité à l'infection par le HDV

Dans le but d'analyser les effets de la sélection clonale sur la susceptibilité des cellules JAK1-KO à l'infection par le HDV et sachant que le HBV et le HDV utilisent le même mécanisme d'entrée dans la cellule hôte, j'ai différencié des cellules Huh7-NTCP-Cas9 ainsi que des cellules Huh7-NTCP-JAK1-KO pendant une semaine dans du milieu de culture contenant du DMSO afin d'induire une susceptibilité à l'infection par le HBV (Zhou *et al.*, 2017).

J'ai tout d'abord vérifié par *Western blot* que la différenciation des cellules n'a pas eu d'impact sur les niveaux d'expression de la protéine JAK1 (**Figure 25B**). Les cellules Huh7-NTCP-Cas9 et Huh7-NTCP-JAK1-KO différenciées ont ensuite été infectées avec soit des particules de HDV, soit des particules de HBV. En guise de contrôle négatif et pour vérifier la spécificité de l'infection, un pré-traitement avec un peptide PrÉS1 inhibant l'entrée virale a été réalisé. Après onze jours d'infection, j'ai observé une réduction importante de l'infection par le HDV dans les cellules KO pour *JAK1* par rapport aux cellules contrôles (**Figure 25C-D**). Cependant, les niveaux d'infection par le HBV étaient comparables entre les deux lignées. Ces données suggèrent donc une susceptibilité comparable pour l'entrée du HBV et du HDV entre les cellules KO pour *JAK1* et les cellules contrôles et indiquent que la sélection clonale n'a pas modifié la sensibilité des cellules à l'infection virale (**Figure 25E-F**). En conclusion, l'ensemble de ces résultats démontrent que JAK1 est un facteur d'hôte du HDV important pour la réplication virale et non pour l'entrée du virus dans sa cellule cible.

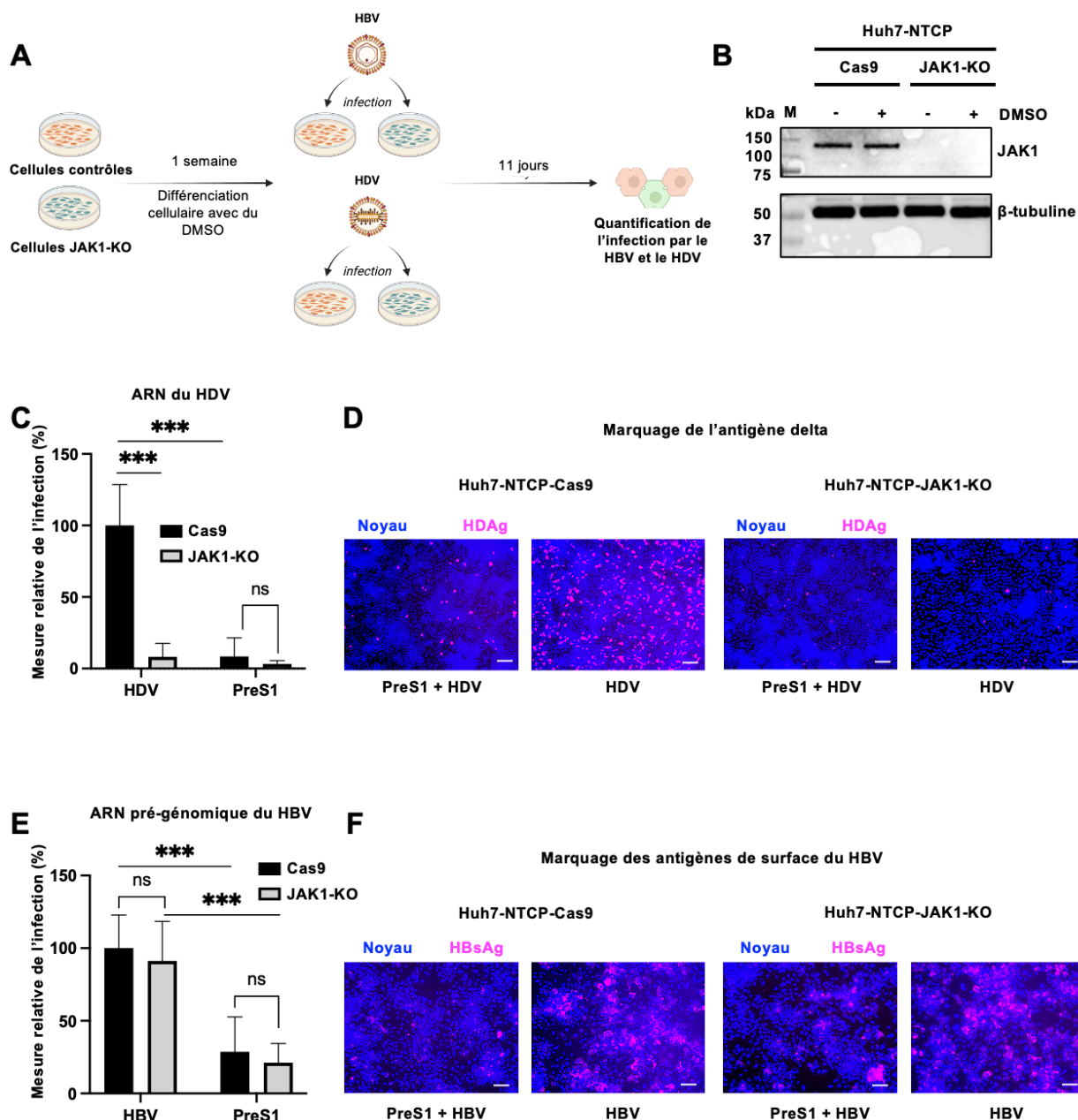


Figure 25 : Le KO de JAK1 n'affecte pas l'entrée virale. (A) Stratégie expérimentale. (B) Contrôle de l'expression de JAK1 dans les cellules Huh7-NTCP-Cas9 et Huh7-NTCP-JAK1-KO par Western blot après une semaine de culture en présence (+) ou non (-) de DMSO pour induire une susceptibilité à l'infection par le HBV. Les résultats d'une expérience représentative sont montrés. Les cellules ont ensuite été infectées avec le HDV ou le HBV pendant onze jours. Un pré-traitement avec 200 nM du peptide PréS1 a été réalisé en guise de contrôle négatif. (C-D) L'infection par le HDV a été quantifiée par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (C) ou analysée par immunofluorescence (D) (Barre d'échelle : 100 μm). (E-F) L'infection par le HBV a été quantifiée par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (E) ou évaluée par immunofluorescence (F) (Barre d'échelle : 100 μm). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules Huh7-NTCP-Cas9 infectées avec le HDV ou le HBV (100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante a été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***)

4. Caractérisation du potentiel de JAK1 comme cible antivirale

Pour étudier le potentiel de JAK1 comme cible antivirale, j'ai utilisé de l'upadacitinib, un inhibiteur sélectif pour JAK1 approuvé par la FDA notamment pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde chez l'adulte (Serhal and Edwards, 2019) et l'ai comparé à un inhibiteur spécifique de JAK2, le fedratinib, une autre molécule également approuvée par la FDA pour le traitement de la myélofibrose (Waksal, Tremblay and Mascarenhas, 2021).

4.1 Effets des inhibiteurs de JAK sur l'infection par le HDV

4.1.1 Utilisation des inhibiteurs dans les cellules Huh7-NTCP

Tout d'abord, afin de valider l'activité de ces différents inhibiteurs, j'ai traité des cellules Huh7-NTCP pendant huit heures avec différentes concentrations en upadacitinib ou fedratinib puis j'ai stimulé les cellules pendant 30 minutes avec de l'IFN- α -2a pour activer les voies de signalisation JAK/STAT. J'ai ensuite évalué la phosphorylation des protéines STAT1 et STAT3 à la fin du traitement par *Western blot* (Figure 26A).

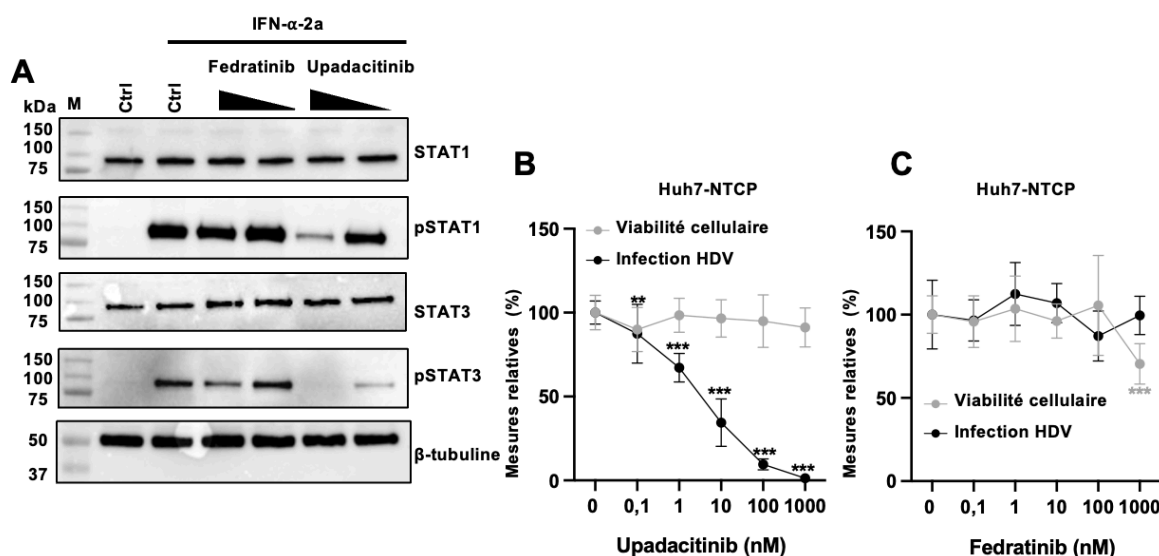


Figure 26 : L'upadacitinib inhibe l'infection par le HDV. (A) Validation de l'activité des inhibiteurs. Contrôle de l'expression des protéines pSTAT1 et pSTAT3 par Western blot après une stimulation avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a et à la suite d'un traitement avec 100 nM ou 1 μ M d'inhibiteur. (B-C) Activité antivirale des inhibiteurs. La viabilité cellulaire ainsi que l'infection par le HDV ont été évaluées dans des cellules Huh7-NTCP infectées avec le HDV et prétraitées pendant 24 heures avec des doses croissantes d'upadacitinib (B) ou de fedratinib (C) (durée du traitement J(-1)-8). Les données obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules non traitées infectées avec le HDV (100 %). Les résultats de quatre expériences indépendantes sont présentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

Les résultats obtenus ont démontré que seul le traitement des cellules avec l'upadacitinib a entraîné une inhibition dose-dépendante de la phosphorylation des protéines STAT à la suite d'une stimulation avec de l'IFN- α -2a, suggérant ainsi que le fedratinib n'a pas d'effet sur JAK1 pour les concentrations testées. J'ai ensuite évalué les effets d'un traitement avec les inhibiteurs de JAK1 ou JAK2 sur l'infection par le HDV. Pour cela, j'ai prétraité des cellules Huh7-NTCP 24 heures avant l'inoculation du virus puis pendant huit jours avec différentes concentrations d'upadacitinib ou de fedratinib (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM et 1 μ M). Les résultats obtenus ont révélé que le traitement des cellules Huh7-NTCP avec l'upadacitinib est associé à une inhibition dose-dépendante de l'infection par le HDV. En revanche, le traitement des cellules avec l'inhibiteur spécifique de JAK2 n'a pas entraîné de baisse de l'infection (**Figure 26B-C**), ce qui suggère que l'effet proviral observé est spécifique de JAK1.

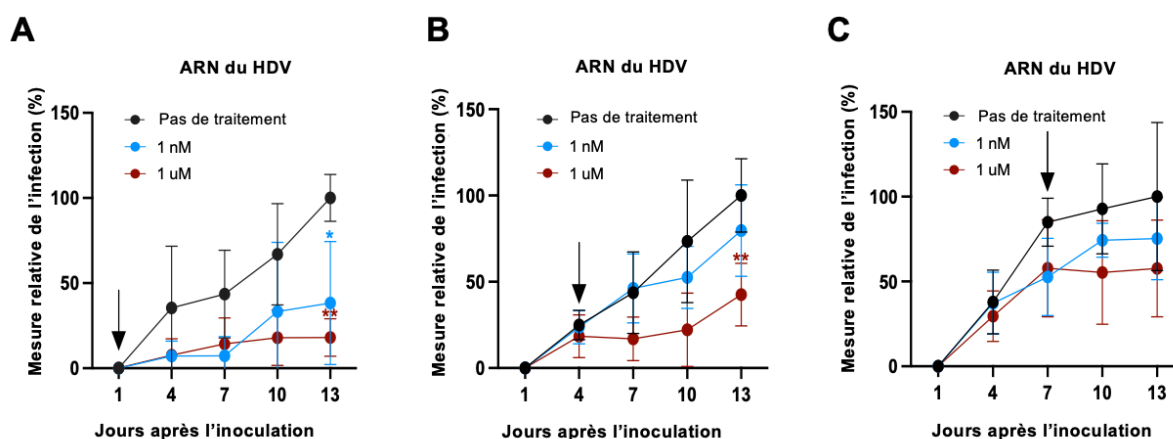


Figure 27 : Activité antivirale de l'upadacitinib. Des cellules Huh7-NTCP ont été infectées avec le HDV pendant 13 jours et traitées avec 1 nM ou 1 μ M d'upadacitinib selon trois stratégies différentes. **(A)** Durée du traitement : d1-13. **(B)** Durée du traitement : d4-13. **(C)** Durée du traitement : d7-d13. L'infection a été quantifiée par RT-qPCR et les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules infectées par le HDV à J13 et qui n'ont pas été traitées (100 %). Les résultats de trois expériences indépendantes sont représentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : p < 0,05 (*) et p < 0,01 (**).

J'ai ensuite infecté des cellules Huh7-NTCP avec le HDV et évalué l'activité antivirale de l'upadacitinib lorsque l'inhibiteur est ajouté à différents temps après l'inoculation du virus. De manière intéressante, les résultats ont démontré que l'upadacitinib inhibe également de manière dose-dépendante les niveaux d'infection par le HDV lorsqu'il est ajouté après l'entrée du virus dans les cellules (**Figure 27**). Ceci s'illustre notamment par l'inhibition marquée de l'infection par le HDV à la suite de l'administration de 1 μ M d'upadacitinib au premier ou au quatrième jour après l'inoculation du virus (**Figure 27A-B**). Ces résultats suggèrent ainsi un effet de l'upadacitinib sur la réplication du HDV, même après son initiation. L'ajout de l'inhibiteur sept jours après l'inoculation n'a cependant pas entraîné de réduction significative de

l'infection (**Figure 27C**), bien que les résultats obtenus confirment une tendance selon laquelle la réplication du HDV est inhibée après l'administration d'upadacitinib à 1 μ M. Il faut néanmoins rappeler que le modèle utilisé ici ne permet d'étudier qu'un seul cycle d'infection avec un temps de réplication du virus limité. Ainsi, plus l'inhibiteur est ajouté tardivement, plus l'ARN du HDV peut s'accumuler avant le début du traitement, ce qui restera quantifiable pendant quelques jours.

Par ailleurs, j'ai également comparé l'activité antivirale de l'upadacitinib à celle de deux autres inhibiteurs spécifiques de JAK1, le filgotinib et l'oclacitinib. Pour cela, des cellules Huh7-NTCP ont été infectées avec le HDV puis traitées avec 1 μ M d'upadacitinib, de fedratinib (inhibiteur spécifique de JAK2), d'oclacitinib ou de filgotinib. De manière intéressante, le traitement des cellules avec le filgotinib et l'oclacitinib est également associé à une baisse significative de l'infection par le HDV, confirmant le potentiel de JAK1 comme cible antivirale pour l'infection par le HDV (**Figure 28**).

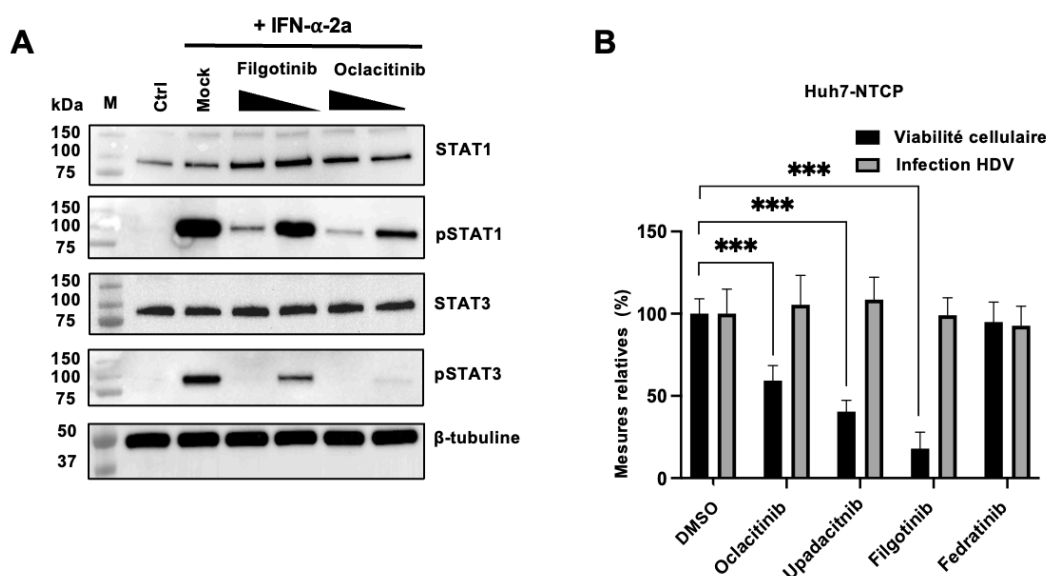


Figure 28 : Le filgotinib et l'oclacitinib inhibent également la réplication du HDV. (A) Validation de l'activité des inhibiteurs. Contrôle de l'expression des protéines pSTAT1 et pSTAT3 par Western blot après une stimulation avec 1000 UI/ml d'IFN- α -2a et à la suite d'un traitement avec 100 nM ou 1 μ M d'inhibiteur. (B) Comparaison de l'activité antivirale des différents inhibiteurs de JAK. La viabilité cellulaire ainsi que l'infection par le HDV ont été évaluées dans des cellules Huh7-NTCP infectées avec le HDV puis traitées avec 1 μ M d'oclacitinib, d'upadacitinib, de filgotinib ou de fedratinib (durée du traitement J1-8). Les données obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules non traitées infectées avec le HDV (100 %). Les résultats de quatre expériences indépendantes sont présentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante a été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***).

4.1.2 Étude de la spécificité de l'activité antivirale de l'upadacitinib

Pour éliminer tout effet non spécifique dans l'activité antivirale observée pour l'upadacitinib, j'ai infecté des cellules Huh7-NTCP-Cas9, JAK1-KO et JAK1^{Res} avec le HDV et traité les cellules avec des doses croissantes d'upadacitinib pendant huit jours. Les résultats obtenus ont révélé que le traitement avec l'upadacitinib inhibe de manière dose-dépendante l'infection dans les cellules contrôles et dans les cellules JAK1^{Res}. En revanche, le traitement avec l'upadacitinib n'a eu aucun effet sur les niveaux relatifs d'infection par le HDV dans les cellules KO pour JAK1, ce qui confirme que l'effet antiviral observé est bien spécifique de JAK1 (Figure 29).

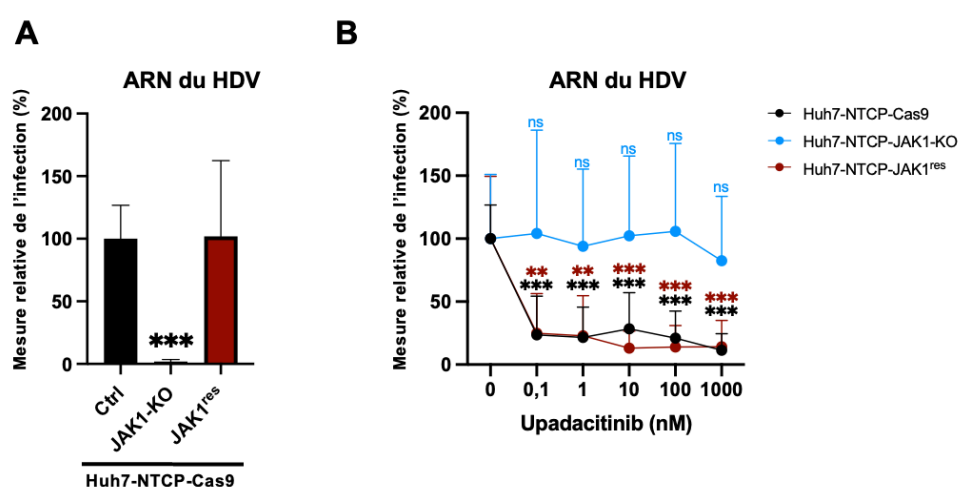


Figure 29 : Absence d'effet antiviral additif de l'upadacitinib dans les cellules KO pour JAK1. Durée du traitement J(-1)-8. L'infection par le HDV a été quantifiée par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes. Le panneau (A) montre les niveaux d'infection des cellules non traitées infectées par le HDV, avec une normalisation des valeurs par rapport aux cellules Huh7-NTCP-Cas9 contrôles (100 %). Dans le panneau (B), les niveaux d'infection des trois lignées cellulaires non traitées ont été fixés à 100 %. Les résultats de trois expériences indépendantes sont représentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

4.1.3 Validation de l'activité antivirale des inhibiteurs de JAK1 dans les PHH

Enfin, j'ai cherché à valider ces résultats dans les PHH. Pour cela, les cellules ont été infectées avec le HDV puis traitées avec 1 μ M d'inhibiteur ou 1000 UI/ml d'IFN- α -2a en guise de contrôle négatif pendant huit jours. Le traitement des PHH avec les différents inhibiteurs spécifiques de JAK1, mais pas avec l'inhibiteur spécifique de JAK2, a également entraîné une baisse significative de l'infection par le HDV sans affecter la viabilité cellulaire, confirmant ainsi l'effet antiviral des inhibiteurs de JAK1 dans le modèle *in vitro* le plus pertinent pour l'étude de l'infection par le HDV (Figure 30).

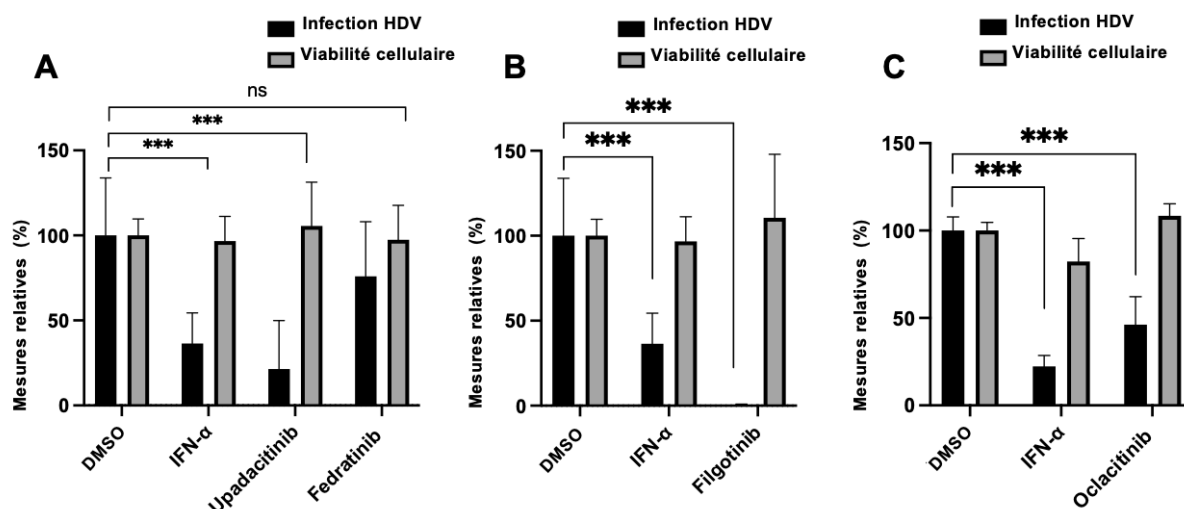


Figure 30 : Activité antivirale des inhibiteurs de JAK1 dans les PHH. (A-C) Les cellules ont été infectées avec le HDV et traitées avec 1 μ M d'inhibiteur ou 1000 UI/ml d'IFN- α -2a en guise de contrôle négatif. Durée du traitement : J1-8. L'infection par le HDV a été quantifiée par RT-qPCR pour quatre expériences indépendantes (upadacitinib, fedratinib, filgotinib) ou trois expériences indépendantes (oclacitinib). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules non traitées infectées avec le HDV (100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et la p-valeur suivante a été considérée comme significative : $p < 0,001$ (***)

4.2 Effets de l'upadacitinib dans d'autres modèles infectieux

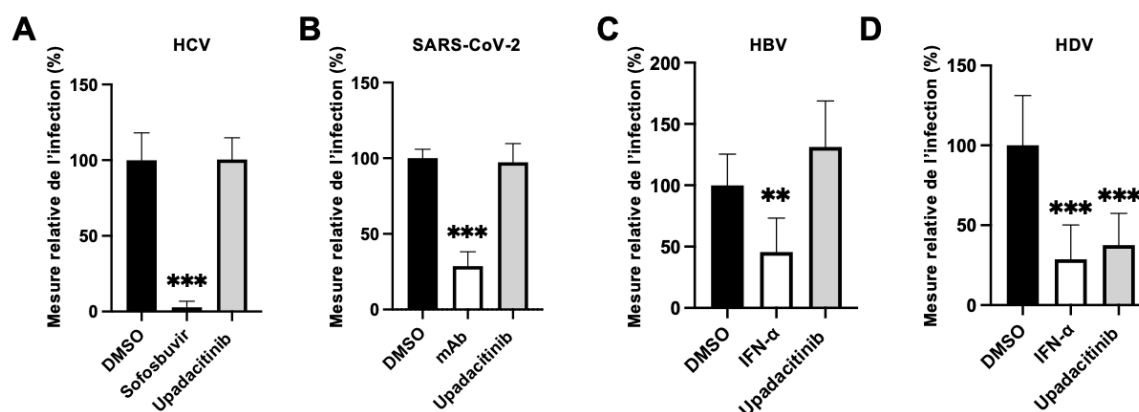


Figure 31 : Spécificité de l'activité antivirale de l'upadacitinib. (A) Des cellules Huh7.5.1. ont été infectées avec du HCV chimérique Luc-Jc1 (génotype 2a) (HCVcc Luc-Jc1) et traitées avec 1 μ M d'upadacitinib ou 5 μ M de sofosbuvir. L'infection par le HCV a été quantifiée après 72 heures en mesurant l'activité luciférase à partir de quatre expériences indépendantes. (B) Des cellules S-Fuse ont été infectées avec du SARS-CoV-2 marqué avec de la GFP (souche delta) en présence ou non d'un anticorps anti-SARS-CoV-2 (mAb) ou d'upadacitinib (1 μ M). Après 24 heures, l'infection a été quantifiée sur la base de l'expression de la GFP à partir de trois expériences indépendantes. (C-D) Des cellules HepG2-NTCP ont été infectées avec soit du HBV (C) soit du HDV (D) et traitées avec de l'IFN- α -2a ou 1 μ M d'upadacitinib. Après onze jours d'infection, les niveaux d'infection ont été quantifiés par RT-qPCR pour trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

Finalement, sachant que les voies de signalisation JAK/STAT peuvent être modulées par plusieurs virus (revu dans Roca Suarez *et al.*, 2018 ; Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021), j'ai évalué l'impact de l'inhibition de JAK1 dans d'autres modèles infectieux. Pour se faire, les effets d'un traitement avec de l'upadacitinib sur d'autres virus hépatiques, tels que le HBV ou le HCV, ainsi que sur le SARS-CoV-2 ont été évalués (**Figure 31**). De manière intéressante, les résultats ont révélé que contrairement à son effet sur le HDV, l'upadacitinib n'exerce aucune activité antivirale significative contre le HBV, le HCV ou le SARS-CoV-2. Ces données suggèrent donc une interaction spécifique entre le HDV et la kinase JAK1.

En conclusion, l'ensemble des résultats soulignent le potentiel antiviral spécifique des inhibiteurs de JAK1 dans le cadre d'une infection par le HDV.

5. Étude du mécanisme d'action de JAK1 sur le HDV

5.1 Activité provirale de JAK1 et STAT3

Pour expliquer l'activité provirale de JAK1 observée lors d'une infection par le HDV, nous avons tout d'abord émis l'hypothèse que cette dernière pouvait être associée à l'activation du facteur de transcription STAT3, un autre candidat identifié lors du criblage primaire (Verrier *et al.*, 2020). Par ailleurs, une précédente étude a démontré que L-HDAg pouvait activer STAT3 via le stress oxydatif (Williams *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, j'ai d'abord voulu valider les résultats du criblage primaire en transfectant des cellules Huh7-NTCP avec un ensemble de quatre petits siRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de *STAT3* (siSTAT3-Pool). Les cellules ont également été transfectées avec le siCTRL et le siJAK1-Pool en guise de contrôles. Trois jours après la transfection, la diminution de l'expression de *STAT3* et *JAK1* a été contrôlée par RT-qPCR (**Figure 32A-B**). Les cellules restantes ont ensuite été infectées avec le HDV. Après huit jours d'infection, la viabilité cellulaire a été évaluée (**Figure 32C**) et l'infection a été quantifiée par RT-qPCR ou immunofluorescence (**Figure 32D-E**).

De façon intéressante, les résultats obtenus ont confirmé que la baisse de l'expression de *STAT3* est également associée à une diminution de l'infection par le HDV dans les cellules Huh7-NTCP. À noter que l'inhibition de l'infection observée pour les cellules transfectées avec le siSTAT3-Pool est un peu moins importante que celle pour les cellules transfectées avec le siJAK1-Pool. Néanmoins, ces premiers résultats suggèrent que l'activité provirale de JAK1 pourrait bien être associée à la voie de signalisation impliquant JAK1 et STAT3.

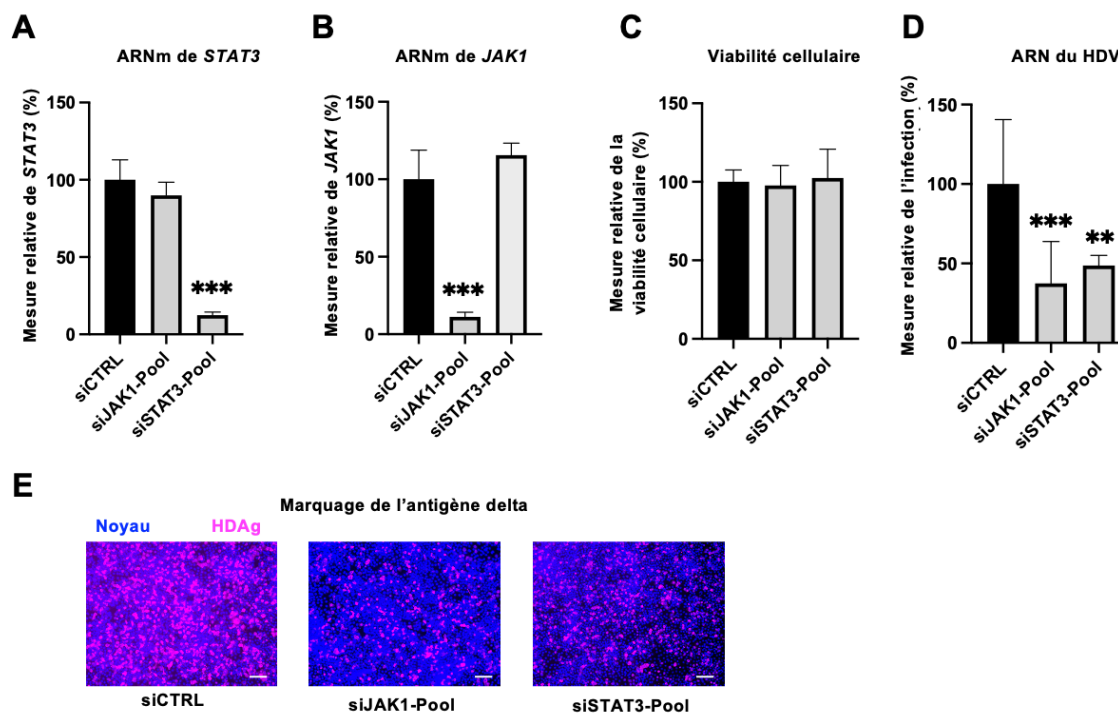


Figure 32 : La baisse de l'expression de STAT3 affecte également l'infection par le HDV. La diminution de l'expression de STAT3 a été réalisée par transfection de la même manière que décrit précédemment. L'expression de STAT3 (A), de JAK1 (B), la viabilité cellulaire (C) ainsi que l'infection ont été quantifiées par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (D) ou par immunofluorescence (E) (Barre d'échelle : 100 μ m). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

Pour poursuivre la caractérisation du mécanisme d'action de JAK1 sur le HDV, j'ai ensuite vérifié s'il était possible de restaurer les niveaux de phosphorylation de STAT3 dans les cellules KO pour *JAK1* en traitant les cellules avec de l'IL-6, une cytokine connue pour induire la phosphorylation de STAT3 en passant par l'activation de JAK1 ou JAK2 (Shien *et al.*, 2017).

Ainsi, des cellules YBX1-KO, JAK1-KO, JAK1^{Res} et JAK1^{Mut1} ont été traitées pendant 30 minutes avec 100 ng/ml d'IL-6, puis les effets du traitement sur la phosphorylation de STAT3 ont été étudiés par *Western blot* (Figure 33A).

Les résultats ont révélé qu'en l'absence de stimulation, STAT3 est phosphorylé dans les cellules YBX1-KO et JAK1^{Res}, qui expriment une version sauvage de JAK1. À l'inverse, aucune activation de STAT3 n'a été observée pour les cellules JAK1-KO et les cellules exprimant une version mutée de JAK1 incapable de lier l'ATP. Par ailleurs, le traitement des cellules JAK1-KO et JAK1^{Mut1} avec de l'IL-6 a permis de restaurer la phosphorylation de STAT3 à des niveaux similaires à ceux observés dans les lignées contrôles en absence de stimulation (Figure 33A).

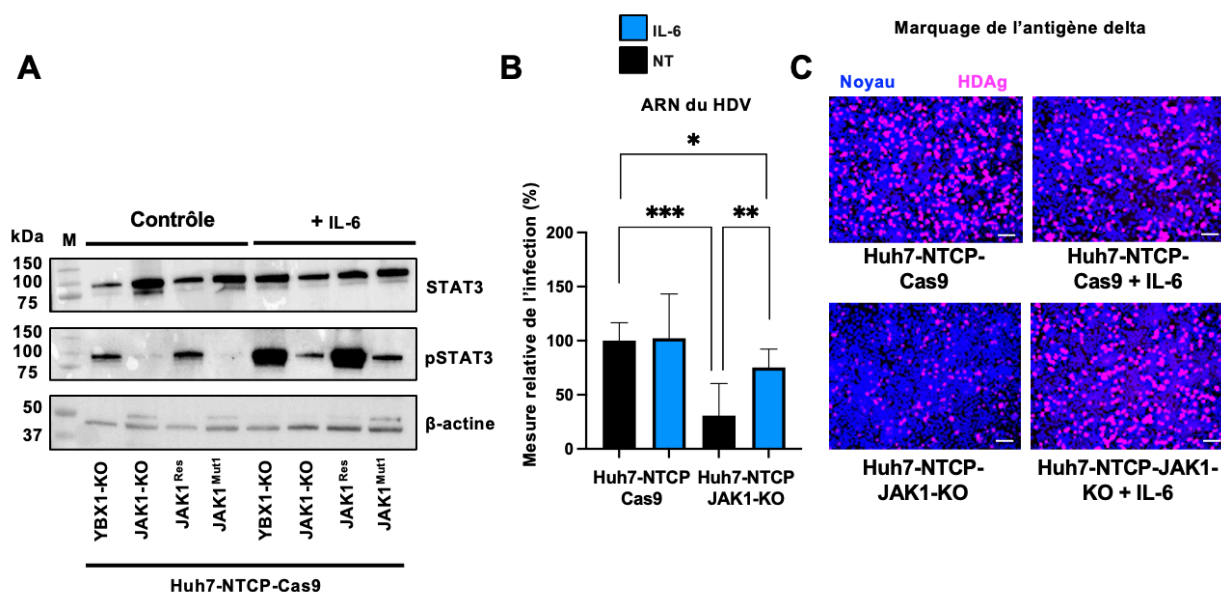


Figure 33 : Traitement des cellules KO pour JAK1 avec de l'IL-6. (A) Les différentes lignées ont été stimulées pendant 30 minutes avec 100 ng/ml d'IL-6. L'expression de STAT3 et pSTAT3 a ensuite été évaluée par Western blot. Une expérience représentative est présentée. (B-C) Le traitement avec de l'IL-6 restaure le phénotype infectieux dans les cellules JAK1-KO. Les cellules ont été infectées avec le HDV et cultivées pendant huit jours en présence ou non (NT) d'IL-6 (100 ng/ml). L'infection a ensuite été quantifiée par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (B) ou par immunofluorescence (C) (Barre d'échelle : 100 μm). Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules Huh7-NTCP-Cas9 infectées et non traitées (100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

J'ai ensuite étudié les effets du traitement avec de l'IL-6 sur l'infection par le HDV. Pour cela, j'ai infecté des cellules Huh7-NTCP-Cas9 ou Huh7-NTCP-JAK1-KO avec le HDV puis traité les cellules ou non pendant huit jours avec 100 ng/ml d'IL-6. Comme indiqué dans la **Figure 33B-C**, l'infection par le HDV a été fortement réduite dans les cellules JAK1-KO par rapport aux cellules contrôles. De manière intéressante, le traitement des cellules avec l'IL-6 a permis de restaurer le phénotype infectieux dans les cellules KO pour JAK1. Ces résultats suggèrent donc que STAT3 serait important pour l'infection par le HDV et que, par conséquent, l'activité provirale de JAK1 serait liée à la réponse immunitaire de l'hôte induite lors de l'infection par le HDV.

5.1 Activité provirale de JAK1 et réponse immunitaire induite par le HDV

Le HDV est un virus qui active fortement la voie des IFN de type I et III suite à la reconnaissance de l'ARN viral par MDA5. Dans ce contexte, j'ai vérifié si l'activation de STAT3 par le virus est bien responsable du phénotype observé. Pour cela, des cellules Huh7-NTCP

et HepG2-NTCP ont été infectées avec le HDV pendant huit jours et les niveaux de phosphorylation de STAT3 ont été étudiés par *Western blot* (**Figure 34**).

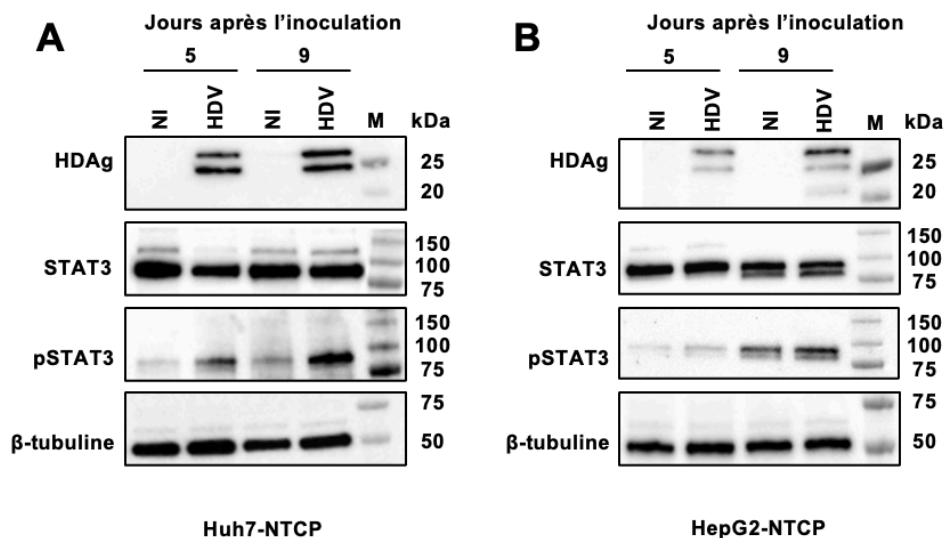


Figure 34 : Analyse de l'expression de STAT3 et pSTAT3 à la suite d'une infection par le HDV (A) L'expression des protéines STAT3 et pSTAT3 a été analysée par Western blot dans des cellules Huh7-NTCP infectées (HDV) ou non (NI) avec le HDV au cinquième et neuvième jour après l'inoculation du virus. **(B)** L'expression des protéines STAT3 et pSTAT3 a été analysée par Western blot dans des cellules HepG2-NTCP infectées ou non avec le HDV au cinquième et neuvième jour après l'inoculation du virus. Une expérience représentative est montrée à chaque fois. Ces expériences ont été réalisées par une ingénieure du laboratoire.

Les résultats obtenus ont révélé que l'infection par le HDV est bien associée à une activation de STAT3 dans les cellules Huh7-NTCP. Par ailleurs, une activation moins importante de STAT3 a également été observée dans les cellules HepG2-NTCP infectées.

Pour ensuite vérifier que l'effet proviral de JAK1 est bien associé à son activation en réponse à l'infection par le HDV, j'ai étudié la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection dans les cellules Huh7-NTCP mais aussi dans des cellules HepG2-NTCP, ces dernières étant connues pour exprimer des ISG à la suite d'une infection par le HDV (Zhang *et al.*, 2018). L'expression de *RSAD2* a été choisie pour l'analyse, puisqu'il s'agit de l'ISG le plus exprimé à la suite d'une infection par le HDV.

Comme indiqué dans la **Figure 35B-C**, aucune induction de l'expression de *RSAD2* n'a été observée dans les cellules Huh7-NTCP, contrairement aux cellules HepG2-NTCP. Ces résultats confirment ainsi ceux d'une étude précédente suggérant l'absence de réponse IFN de type I dans les cellules Huh7-NTCP à la suite d'une infection par le HDV (Zhang *et al.*, 2018).

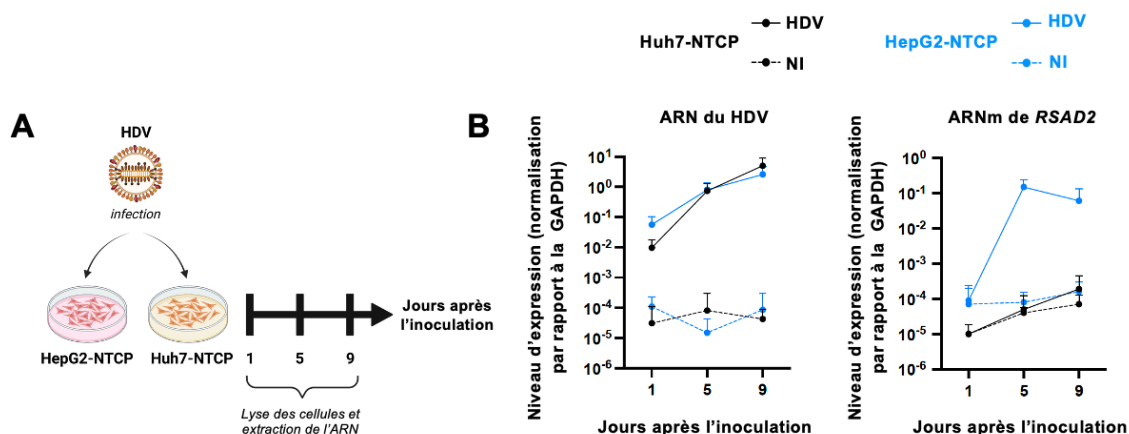


Figure 35 : Expression d'ISG dans des cellules infectées par le HDV. (A) Stratégie expérimentale. (B) Des cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été infectées par le HDV. L'expression de RSAD2 ainsi que l'infection ont été quantifiées par RT-qPCR aux différents temps indiqués. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH à partir de trois expériences indépendantes.

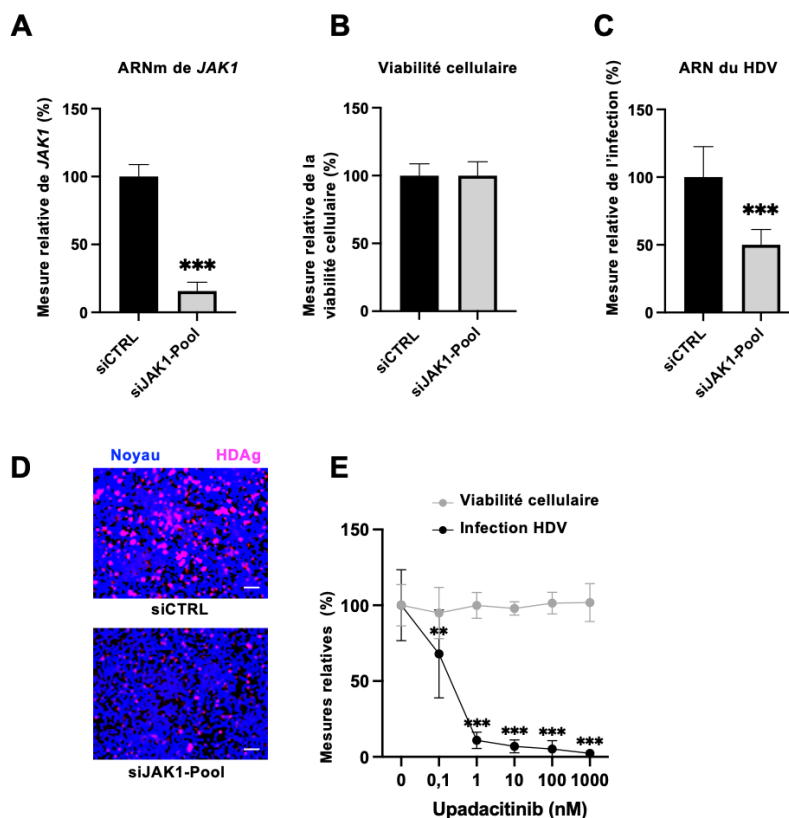


Figure 36 : La baisse de l'expression de JAK1 inhibe l'infection par le HDV dans les cellules HepG2-NTCP. La transfection des cellules HepG2-NTCP avec le siJAK1-Pool a été réalisée de la même manière que pour les cellules Huh7-NTCP. L'expression de JAK1 (A), la viabilité cellulaire (B) ainsi que l'infection ont été quantifiées par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (C) ou par immunofluorescence (D) (Barre d'échelle : 100 μ m). (E) L'upadacitinib inhibe l'infection par le HDV dans les HepG2-NTCP. La viabilité cellulaire et l'infection ont été analysées à partir de trois expériences indépendantes. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules infectées non traitées (100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0.01$ () et $p < 0,001$ (***).**

Par conséquent, j'ai voulu vérifier si la baisse de l'expression de *JAK1* affecte également l'infection par le HDV dans les cellules HepG2-NTCP. Pour cela, j'ai transfecté les cellules HepG2-NTCP avec le siJAK1-Pool ou le siCTRL. Après 72 heures, l'expression de *JAK1* a été contrôlée (**Figure 36A**) et les cellules restantes ont été infectées avec le HDV. Après huit jours d'infection, la viabilité cellulaire (**Figure 36B**) ainsi que les niveaux d'infection par le HDV ont été analysés (**Figure 36C-D**). De manière intéressante, la réduction de l'expression de *JAK1* a aussi été associée à une baisse de l'infection par le HDV dans les cellules HepG2-NTCP, ceci malgré une activation des voies de l'immunité innée différente par rapport aux cellules Huh7-NTCP.

Dans ce contexte, j'ai également étudié les effets d'un traitement avec de l'upadacitinib dans des cellules HepG2-NTCP infectées avec le HDV. Les résultats obtenus ont révélé une inhibition dose-dépendante de l'infection, avec une IC_{50} (*half maximal inhibitory concentration*) comparable à celle observée dans les cellules Huh7-NTCP, comprise entre 0,1 et 1 nM (**Figures 26B et 36E**). L'ensemble de ces données suggère donc que l'activité provirale de *JAK1* est au moins partiellement indépendante de la réponse immunitaire induite par le HDV.

Enfin, pour valider ces observations dans un modèle plus pertinent pour l'étude des voies de l'immunité innée, j'ai utilisé des cellules HepaRG différenciées (dHepaRG) KO pour le gène *IFIH1* (qui code pour MDA5) (Lucifora *et al.*, 2023).

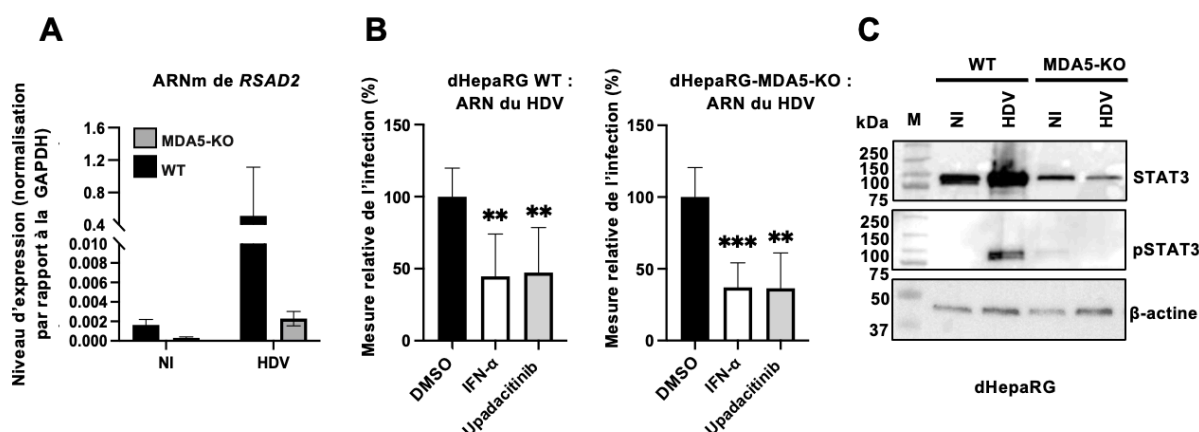


Figure 37 : L'activité provirale de *JAK1* n'est pas associée à la réponse immunitaire innée induite par le HDV. (A-C) L'upadacitinib inhibe l'infection par le HDV dans les cellules dHepaRT-WT et MDA5-KO. Les cellules infectées par le HDV ont été traitées avec 1 µM d'upadacitinib ou 1000 UI/ml d'IFN-α. Durée du traitement : J1-8. L'expression de RSAD2 (A) ainsi que l'infection par le HDV (B) ont été quantifiées pour chaque lignée cellulaire par RT-qPCR à partir de quatre expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ () et $p < 0,001$ (***). Par ailleurs, l'expression des protéines STAT3 et pSTAT3 après huit jours d'infection a été évaluée par Western blot (C). Une expérience représentative est montrée.**

Tout d'abord, j'ai confirmé l'importance de MDA5 pour l'expression d'ISG à la suite d'une infection par le HDV (**Figure 37A**). De manière intéressante, le traitement des cellules HepaRG différenciées sauvages (dHepaRG WT) et des cellules HepaRG différenciées KO pour *MDA5* (dHepaRG-MDA5-KO) avec l'upadacitinib a révélé une activité antivirale de cet inhibiteur comparable entre les deux lignées (**Figure 37B**), ce qui renforce l'hypothèse d'une indépendance entre l'activité provirale de JAK1 et la réponse immunitaire innée induite par le virus et qui est médiée par MDA5. Finalement, j'ai analysé l'expression de STAT3 et pSTAT3 au cours d'une infection par le HDV dans les cellules dHepaRG-WT ou MDA5-KO infectées ou non avec le HDV. Comme indiqué dans la **Figure 37C**, aucune activation de STAT3 n'a été observée dans les cellules dHepaRG-MDA5-KO infectées, suggérant que l'activation de STAT3 indépendante de la réponse IFN induite par le HDV est spécifique au fond génétique des cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP.

En conclusion, comme l'upadacitinib présente une activité antivirale en l'absence de l'expression d'ISG et de l'activation de STAT3, l'ensemble de ces données suggèrent que l'activité provirale de JAK1 est indépendante de la réponse immunitaire innée et de l'activation de facteurs pro-inflammatoires à la suite d'une infection par le HDV.

5.2 Activité provirale de JAK1 et modulation de la phosphorylation de l'antigène delta

JAK1 étant une kinase majeure impliquée dans de nombreux processus cellulaires, nous avons finalement émis l'hypothèse que l'activité provirale de JAK1 pouvait être associée à une modulation de la phosphorylation de l'HDAG, et plus particulièrement de celle de S-HDAG au niveau du résidu sérine 177 (Ser177), connu pour être cruciale pour la réplication du HDV (Hong and Chen, 2010).

5.2.1 Effet de l'inhibition de JAK1 sur la phosphorylation de S-HDAG

Dans ce contexte, j'ai étudié l'impact de l'inhibition de JAK1 sur la phosphorylation de l'HDAG. Pour cela, j'ai transfecté des cellules Huh7-NTCP présentant une expression altérée de JAK1 avec un plasmide permettant la surexpression de S-HDAG afin de limiter les effets de JAK1 sur la réplication du HDV en contexte infectieux, ce qui affecterait les niveaux d'expression de l'HDAG. La phosphorylation de l'HDAG a ensuite été étudiée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation (**Figure 38**). L'expression de STAT3 (contrôle positif) et P53 (contrôle négatif) a été également analysée pour chaque échantillon. Les résultats obtenus ont démontré que l'inhibition de JAK1 est associée à une baisse des niveaux de phosphorylation de S-HDAG, à la fois dans les cellules JAK1-KO (**Figure 37A**) mais aussi dans

les cellules transfectées avec le siJAK1-Pool (**Figure 37B**). Par ailleurs, des résultats similaires ont été observés lorsque les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées avec un anticorps anti-HDAg (**Figure 37C-D**). En guise de contrôle technique, aucune phosphorylation de S-HDAg n'a été détectée pour les cellules qui surexpriment une version mutée de S-HDAg, avec la substitution S177A (**Figure 38**), ce qui suggère fortement que la phosphorylation du résidu sérine 177 est le site majeur de phosphorylation détecté avec cette approche.

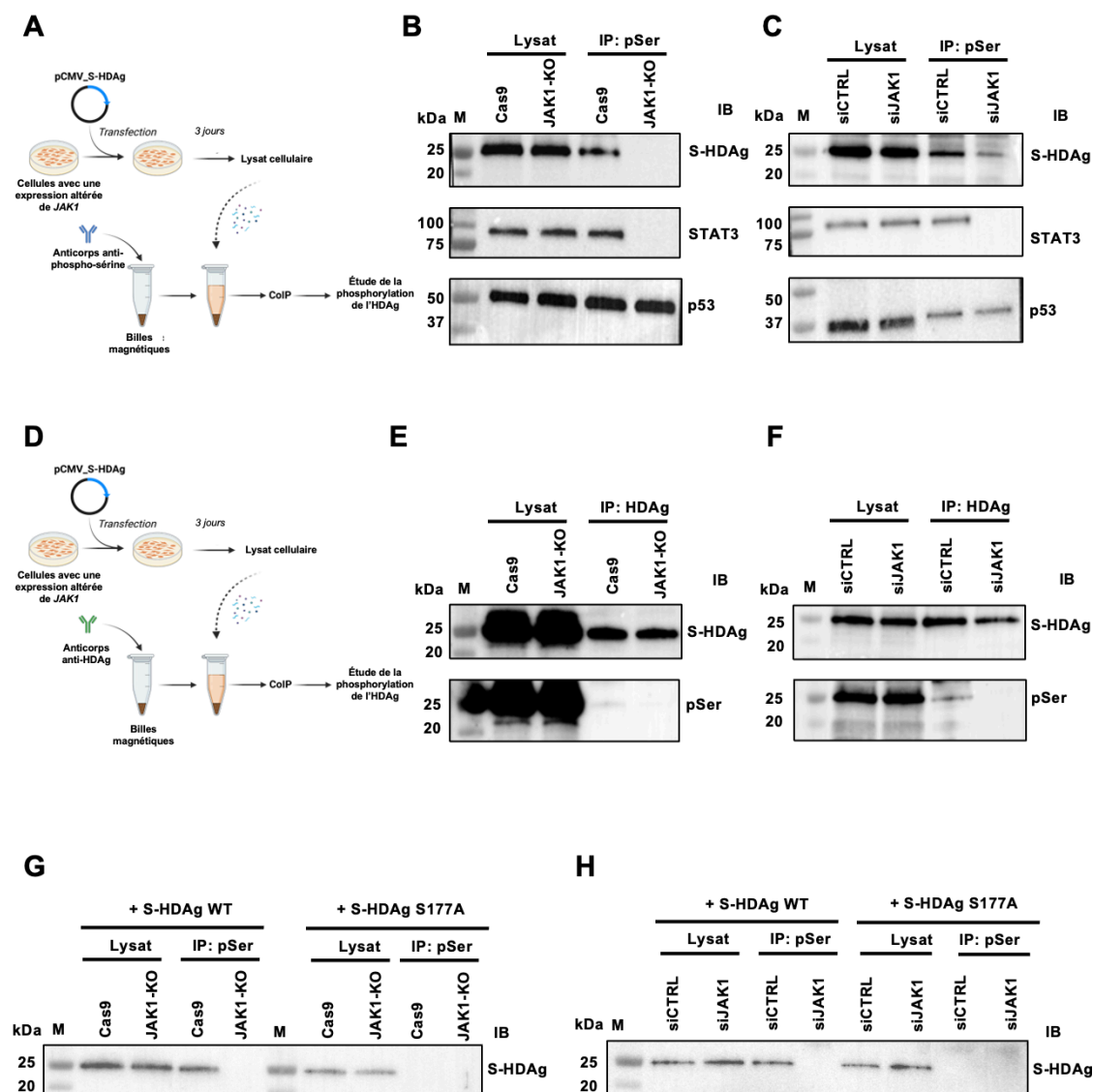


Figure 38 : L'activité provirale de JAK1 est associée à une modulation de la phosphorylation de S-HDAg. (A-C) La phosphorylation de l'HDAg dans des cellules surexprimant S-HDAg a été évaluée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-phospho-sérine. L'expression de S-HDAg dans le lysat cellulaire d'origine (lysat) ainsi que dans les éluats (IP) a été étudiée par Western blot. L'expression de STAT3 (contrôle positif) et P53 (contrôle négatif) a été également analysée pour chaque échantillon. (D-F) Des expériences similaires ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-HDAg. (G-H) Des expériences similaires ont été réalisées à partir de cellules surexprimant une version sauvage (S-HDAg WT) ou mutée (S-HDAg S177A) de S-HDAg et à l'aide d'un anticorps anti-phospho-sérine. IB : immunoblot.

5.2.2 Effet de l'inhibition de JAK1 sur l'activité d'autres kinases cellulaires

Après l'obtention de ces résultats, nous nous sommes demandé si JAK1 pouvait phosphoryler directement l'HDAG. Cependant, JAK1 est une tyrosine kinase et il n'y a aucun résidu tyrosine dans la séquence de l'HDAG. Ceci suggère donc l'implication d'une kinase intermédiaire qui serait responsable de la phosphorylation de l'HDAG et qui dépendrait de JAK1 pour son activation. C'est pourquoi, afin d'étudier l'impact de l'inhibition de JAK1 sur l'activité d'autres kinases cellulaires, j'ai réalisé un *phospho-kinase array* à partir de cellules contrôles ou de cellules KO pour *JAK1*. Nous nous sommes particulièrement intéressé aux kinases ERK1/2 et p38 α , puisque ces dernières ont été décrites préalablement comme étant des kinases majeures impliquées dans la phosphorylation de S-HDAG au niveau du résidu S177 (Chen *et al.*, 2008).

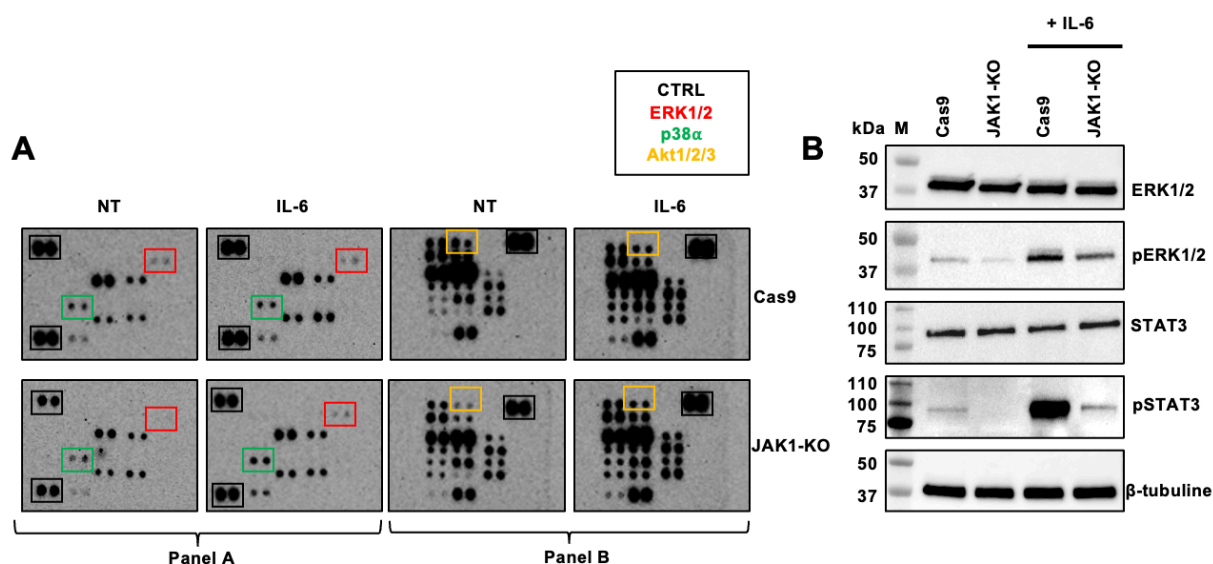


Figure 39 : Effet de l'inhibition de JAK1 sur l'activité d'autres kinases cellulaires. (A) Phospho-kinase array réalisé dans des cellules contrôles ou JAK1-KO traitées ou non (NT) pendant trente minutes avec 100 ng/ml d'IL-6. (B) Validation de la modulation de la phosphorylation de ERK1/2 par Western blot dans les échantillons utilisés pour le phospho-kinase array.

Comme indiqué dans la **Figure 39A**, parmi les kinases analysées, aucune phosphorylation de ERK1/2 (pERK1/2) n'a été détectée pour les cellules KO pour *JAK1* contrairement aux cellules contrôles, tandis qu'une légère baisse dans les niveaux de phosphorylation de p38 α a été observée. Aucune autre variation majeure entre les cellules contrôles et les cellules JAK1-KO n'a été observée pour les kinases testées, à l'exception d'AKT1/2/3 dans le panel B. Je me suis ensuite focalisée sur la phosphorylation de ERK1/2 pour la suite des analyses.

Pour faire le lien entre l'activité de ERK1/2 et l'infection par le HDV dans un contexte KO pour *JAK1*, j'ai d'abord testé si une stimulation avec de l'IL-6 pouvait restaurer les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules *JAK1*-KO, puisque l'IL-6 est également connu pour être un activateur de la voie des MAP kinases (Hirano, Nakajima and Hibi, 1997). Les résultats ont révélé que le traitement avec de l'IL-6 a permis de restaurer les niveaux de pERK1/2 dans les cellules KO pour *JAK1* (**Figure 39A**), un résultat confirmé par *Western blot* (**Figure 39B**). L'ensemble de ces données suggère donc une régulation de la phosphorylation de ERK1/2 par *JAK1*.

5.2.3 Validation de l'importance de *JAK1* pour la phosphorylation de ERK1/2

J'ai ensuite voulu confirmer l'importance de *JAK1* pour la phosphorylation de ERK1/2. Lors d'expériences réalisées avec de nouveaux échantillons, j'ai à nouveau observé que le KO de *JAK1* est associé à une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 et que le traitement des cellules *JAK1*-KO avec de l'IL-6 permet de restaurer les niveaux de pERK1/2 (**Figure 40A**).

Puis, j'ai cherché à valider ces observations en utilisant des inhibiteurs de *JAK1* ou *JAK2* dans des cellules Huh7-NTCP et dans des PHH. Comme indiqué dans la **Figure 40B-C**, le traitement des cellules avec les inhibiteurs de *JAK1* a également induit une perte de la phosphorylation de ERK1/2, à la fois dans les cellules Huh7-NTCP et dans les PHH. À l'inverse, le traitement des cellules avec le fedratinib n'a pas eu d'impact sur les niveaux de phosphorylation de ERK1/2.

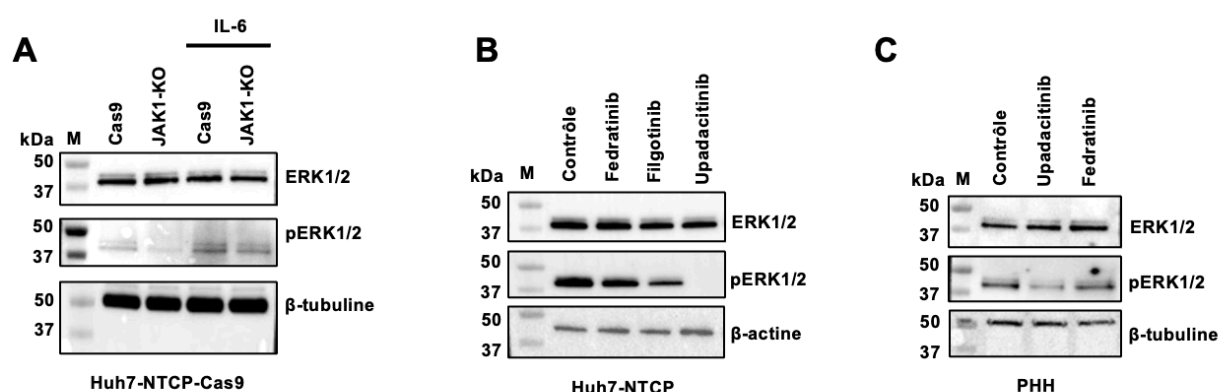


Figure 40 : *JAK1* est impliquée dans la phosphorylation de ERK1/2. (A) Analyse de la phosphorylation de ERK1/2 dans des cellules Huh7-NTCP-Cas9 ou *JAK1*-KO traitées ou non avec de l'IL-6 par Western blot. (B-C) Évaluation des effets d'un traitement avec des inhibiteurs de *JAK1* ou *JAK2* (1 μ M) sur la phosphorylation de ERK1/2 dans des cellules Huh7-NTCP (B) ou dans des PHH (C) par Western blot.

De manière plus importante, la restauration des niveaux de pERK1/2 dans les cellules KO pour *JAK1* à la suite d'un traitement avec de l'IL-6 semble associé à une restauration du phénotype infectieux (**Figure 33**), ce qui suggère une association dépendante de *JAK1* entre pERK1/2 et la réplication du HDV.

5.3 Inhibition de *JAK1* et interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II

En lien avec les résultats d'une précédente étude reliant la phosphorylation du résidu S177 de S-HDAg par ERK1/2 à l'interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II (Chen *et al.*, 2008), j'ai finalement étudié les effets de l'inhibition de *JAK1* sur l'association entre l'ARN viral et l'ARN polymérase II grâce à des expériences de RIP (*RNA immunoprecipitation assay*).

Pour cela, j'ai traité ou non des cellules Huh7-NTCP infectées avec le HDV avec une dose sous-optimale d'upadacitinib (10 nM) afin d'éviter une baisse trop prononcée des niveaux d'ARN du HDV. Les résultats obtenus pour trois expériences indépendantes ont révélé que l'inhibition de *JAK1* est associée à une légère baisse des interactions entre l'ARN viral et l'ARN polymérase II (**Figure 42**).

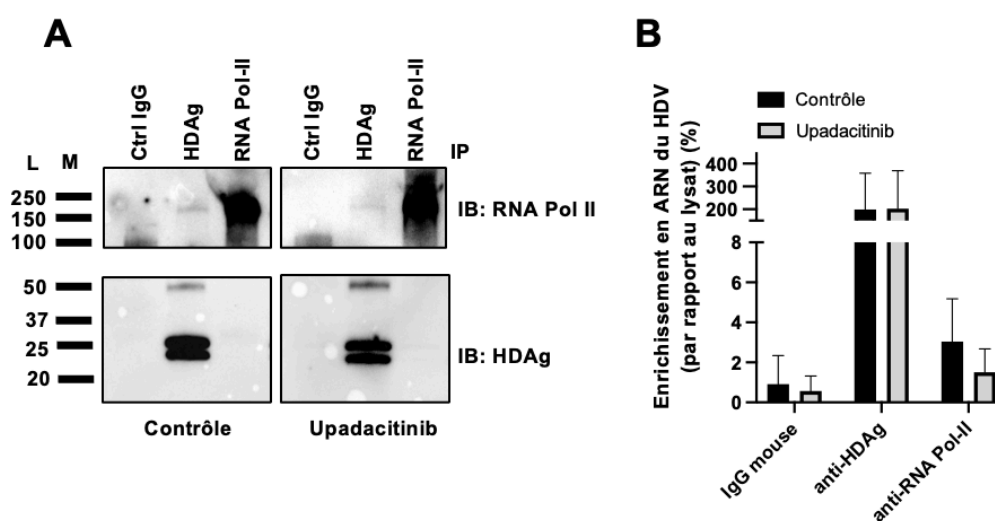


Figure 41 : La déplétion de *JAK1* inhibe l'interaction entre l'ARN du HDV et l'ARN polymérase II. (A-B) Des cellules Huh7-NTCP infectées avec le HDV ont été traitées ou non avec 10 nm d'upadacitinib pendant huit jours. Les expériences de RIP ont été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-HDAg (contrôle positif), un anticorps anti-ARN-polymérase II et une IgG contrôle (contrôle négatif). L'efficacité d'immunoprécipitation a été contrôlée par Western blot (A). Les ARN viraux immunoprécipités ont été quantifiés par RT-qPCR à partir de trois expériences indépendantes (B).

En conclusion, mes travaux de thèse ont démontré que *JAK1* est un facteur clé pour l'infection par le HDV et une cible thérapeutique potentielle. En effet, les résultats obtenus ont révélé que l'activité kinase de *JAK1* est associée à une modulation de la phosphorylation de

ERK1/2 et S-HDAg, cruciale pour la réplication du virus et l'interaction entre l'ARN polymérase II et le génome viral. Cette caractérisation des interactions entre JAK1 et le HDV ouvre la voie à une meilleure compréhension du cycle de multiplication du HDV et au développement de nouvelles thérapies antivirales.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'un article accepté et publié dans la revue *Journal of Hepatology* en novembre 2023 et que je signe en qualité de premier auteur (voir **Annexe 3** (Heuschkel *et al.*, 2023)).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le HDV, un petit virus hépatotrope satellite du HBV, est responsable de la forme la plus sévère et la plus agressive des hépatites virales chroniques. À l'heure actuelle, aucun traitement curatif pour les patients infectés par le HDV et le HBV permettant d'éliminer efficacement les deux virus n'est disponible. En raison de sa structure particulière, cibler directement le HDV reste difficile et il est urgent de développer de nouvelles solutions thérapeutiques pour tenter d'éradiquer cette menace majeure de santé publique.

Dans ce contexte, les molécules ciblant l'hôte ont démontré au cours des dernières années leur fort potentiel antiviral pour la mise au point de thérapies innovantes contre le HDV. Cette approche nécessite cependant une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre le virus et son hôte.

Précédemment, grâce à un criblage de génomique fonctionnelle à haut débit, plusieurs candidats potentiellement importants pour le cycle de multiplication du HDV ont été identifiés (Verrier *et al.*, 2020). Mes travaux de thèse ont permis de confirmer l'importance de l'un de ces candidats, à savoir la kinase JAK1, pour l'infection des cellules par le HDV. J'ai notamment démontré que :

(1) l'inhibition de l'expression de *JAK1* est associée à une diminution marquée de l'infection par le HDV dans divers modèles d'étude *in vitro*, incluant des PHH ;

(2) l'activité kinase de JAK1 est cruciale pour la réplication du HDV et est associée à une modulation des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 et S-HDAg ;

(3) l'upadacitinib, un inhibiteur spécifique de JAK1 approuvé par la FDA notamment pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, présente une activité antivirale importante dans divers modèles d'étude *in vitro*, y compris dans des PHH infectés par le HDV.

JAK1 et les infections virales

JAK1 est une tyrosine kinase qui participe à la transduction de signaux via les voies de signalisation JAK/STAT, notamment en réponse aux IFN de type I, ce qui entraîne l'expression accrue d'ISG exerçant une activité antivirale. JAK1 est ainsi considérée comme étant un acteur clé de la réponse antivirale innée.

L'induction de la réponse antivirale par les IFN constitue un obstacle majeur pour la multiplication des virus. Ainsi, pour contrecarrer la réponse immunitaire innée de l'hôte, les virus semblent avoir développé une multitude de mécanismes ciblant les voies signalisation JAK/STAT (Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021). En effet, plusieurs virus comme le virus de la Dengue (DENV) (Ashour *et al.*, 2009) ou le virus Zika (ZIKV) (Grant *et al.*, 2016)

codent pour des protéines qui ciblent différentes étapes de la voie de signalisation IFN/JAK/STAT, allant de l'interférence de la signalisation IFN en amont de la voie JAK/STAT au blocage de la cascade de phosphorylation médiée par les JAK et impliquant les STAT et les IRF (Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021). D'autres virus comme le HCV font appel à des mécanismes de dégradation protéasomique et de déphosphorylation pour surmonter les effets de la signalisation JAK/STAT (Joyce *et al.*, 2019), en ciblant notamment les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Par ailleurs, le blocage transcriptionnel de l'expression du gène cible est fortement favorisé par la plupart des virus qui inhibent la translocation nucléaire et la formation du complexe de transcription ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*), tels que le virus Ebola (Reid *et al.*, 2006). En outre, certains virus comme l'EBV peuvent induire l'expression des SOCS, des régulateurs négatifs cruciaux de la signalisation des cytokines, qui empêchent la phosphorylation des protéines STAT (Babon *et al.*, 2014 ; Morris, Kershaw and Babon, 2018).

Au cours de ma thèse, j'ai démontré que l'inhibition de l'expression de *JAK1* est associée à une baisse significative de l'infection, à la fois dans différentes lignées cellulaires transfectées avec de petits ARN interférents ciblant spécifiquement l'ARNm de *JAK1* (**Figures 19, 20, 21 et 36**) mais aussi dans des cellules KO pour *JAK1* (**Figure 24**), confirmant ainsi les observations du criblage primaire suggérant que *JAK1* exerce de manière surprenante une activité provirale dans le cadre d'une infection par le HDV.

Précédemment, une activité provirale pour *JAK1* a également été rapportée dans le contexte d'une infection par le HIV, en utilisant un siRNA spécifique de *JAK1* dans des lignées cellulaires dérivées de cellules HeLa (Brass *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Cependant, au cours de l'infection par le HIV, le rôle proviral de *JAK1* semble plutôt associé à l'activation des protéines STAT1 et STAT3 afin de promouvoir l'inflammation et la réplication virale.

Les résultats de ma thèse démontrent donc pour la toute première fois le détournement par un virus d'une kinase cellulaire, normalement impliquée dans la réponse antivirale, pour activer une protéine virale et ainsi stimuler la réplication du virus.

JAK1 et la réplication du HDV

Les deux isoformes de l'HDAg jouent un rôle clé dans le cycle de multiplication du HDV. Plusieurs protéines de l'hôte ont été identifiées comme participant aux processus de modifications post-traductionnelles, de localisation subcellulaire, de synthèse de l'ARN et de régulation des gènes interagissant avec les HDAg (Greco-Stewart and Pelchat, 2010). Parmi les protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles des HDAg, on peut citer

les kinases ERK1/2 qui phosphorylent S-HDAg au niveau du résidu sérine-177, jouant un rôle essentiel pour l'interaction entre S-HDAg et l'ARN polymérase II lors de réplication du virus (Chen *et al.*, 2008). Une autre kinase, la caséine kinase II (CKII), phosphoryle S-HDAg au niveau de la position conservée sérine-2. Cette modification est nécessaire pour l'activité de S-HDAg lors de la réplication du HDV (Yeh *et al.*, 1996). La protéine kinase R (PKR), qui est activée par l'ARN double brin, phosphoryle également les résidus sérine aux positions 177 et 180, ainsi qu'une thréonine à la position 182 de S-HDAg (Chen *et al.*, 2002). Par ailleurs, d'autres protéines ont également été identifiées comme modifiant S-HDAg de manière post-traductionnelle, notamment la protéine farnésyltransférase (FTase), la protéine arginine méthyltransférase 1 (PRMT1), l'acétyltransférase cellulaire p300 et la protéine SUMO1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) (Greco-Stewart and Pelchat, 2010). En outre, des expériences de co-immunoprécipitation ont rapporté que S-HDAg est capable d'interagir avec plus d'une centaine de protéines de l'hôte, parmi lesquelles on retrouve des sous-unités de l'ARN polymérase II, de nombreuses autres hélicases et kinases, des protéines liées à la transcription, des protéines de liaison à l'ARN, des protéines impliquées dans l'épissage, dans la formation de la chromatine ainsi que d'autres protéines qui jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Goodrum and Pelchat, 2018).

En raison de leur structure génomique spécifique, les *Deltavirus* sont à ce jour les seuls virus documentés capable de détourner l'ARN polymérase II pour synthétiser de l'ARN à partir d'une matrice ARN. Par ailleurs, des études récentes ont indiqué que le HDV modifie le processus d'autophagie pour favoriser la réplication de son génome. Les deux isoformes de l'HDAg peuvent promouvoir efficacement l'accumulation d'autophagosomes en bloquant le flux autophagique. Ainsi, il a été démontré que la protéine ATG5 (*autophagy related 5*) est un facteur proviral clé pour la réplication non canonique du génome du HDV (Khabir *et al.*, 2020). Il a également été démontré que S-HDAg participe à la formation d'un complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) et interagit *in vivo* et *in vitro* avec des complexes de remodelage de la chromatine, en particulier avec la protéine régulatrice à bromodomaine BAZ2B (*bromodomain-associated to zinc finger protein 2B*) pour recruter l'ARN polymérase II sur l'ARN du HDV (revu dans Abeywickrama-Samarakoon *et al.*, 2018). Néanmoins, le mécanisme impliquant l'HDAg et les facteurs cellulaires pour la réplication du HDV n'est pas encore complètement élucidé.

Les résultats obtenus lors de ma thèse ont ainsi permis de mettre en évidence l'implication d'un nouveau facteur cellulaire, la kinase JAK1, dans ce processus. En effet, une expression altérée de *JAK1* dans les cellules est associée à une baisse des niveaux de phosphorylation de la protéine S-HDAg, particulièrement au niveau du résidu S177 (**Figure 38**). Par ailleurs, il

est intéressant de noter que le traitement des cellules avec l'inhibiteur spécifique de JAK1 upadacitinib a affecté la capacité de l'ARN polymérase II à se lier à l'ARN du HDV (**Figure 41**), confirmant ainsi l'importance de la phosphorylation de l'HDAg dans le recrutement de la polymérase pour la réplication du virus.

Des recherches plus approfondies sont néanmoins nécessaires pour déterminer si cette observation est due à une moindre efficacité de l'immunoprécipitation et/ou une moindre expression de l'HDAg lorsque les cellules sont traitées avec de l'upadacitinib, ou si l'état de phosphorylation de l'HDAg est également important pour son interaction avec les ARN génomiques et antigénomiques du HDV. Plus généralement, des études supplémentaires devraient être réalisées pour déterminer si JAK1 est directement responsable de la phosphorylation de ERK1/2, ou si d'autres kinases intermédiaires dont l'activation peut être modulée par JAK1, telles que P38- α ou Akt1/2/3 (**Figure 39**), sont impliquées dans la phosphorylation de S-HDAg.

Dans ce contexte, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à partir de cellules Huh7-2C8D exprimant de manière constitutive l'HDAg en utilisant un anticorps anti-HDAg ou anti-ERK1/2. Les résultats préliminaires obtenus ont permis de valider l'existence d'une interaction entre l'HDAg et ERK1/2 dans notre modèle. Cependant, je n'ai détecté aucune interaction spécifique entre JAK1 et ERK1/2 avec cette technique, suggérant qu'une autre kinase activée par JAK1 est probablement responsable de la phosphorylation de ERK1/2. Ces expériences nécessitent toutefois d'être répétées. Par ailleurs, des expériences de co-immunoprécipitation associées à des analyses de spectrométrie de masse pourraient être envisagées afin de définir plus précisément les acteurs de la voie de signalisation impliquée dans l'activité provirale de JAK1 observée lors d'une infection par le HDV.

Infection par le HDV et traitement avec de l'IFN- α

En tant que kinase majeure de la réponse immunitaire innée agissant comme première ligne de défense en cas d'infection virale, JAK1 peut être activée par plusieurs cytokines, notamment par les IFN de type I (Iwasaki and Pillai, 2014 ; Schoggins *et al.*, 2014). Dans le cadre d'une infection par le HDV, les traitements à base d'IFN affectent modérément les premières étapes du cycle de multiplication du HDV mais suppriment l'amplification de l'ARN viral lors de la prolifération des hépatocytes. Néanmoins, l'IFN impacte très faiblement la réplication intra-nucléaire du HDV dans les cellules au repos, soulignant ainsi l'existence d'une interaction complexe entre le HDV et la réponse immunitaire innée (Zhang and Urban, 2020).

Jusqu'à présent, seuls des ISG exerçant une activité provirale, tels que l'hélicase MOV10, ont été décrits pour le HDV (Haussecker *et al.*, 2008). Les résultats de mes recherches mettent en lumière l'implication d'un autre acteur de la réponse immunitaire innée facilitant la réplication virale. Cette découverte pourrait au moins en partie expliquer la faible efficacité du traitement IFN chez les patients ainsi que la capacité antivirale relative de l'IFN endogène et exogène *in vitro*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les données obtenues suggèrent qu'aucune activation de JAK1 n'est nécessaire pour entraîner la phosphorylation de l'HDAG (**Figure 38**), supposant l'existence d'une activité basale de JAK1 en l'absence de toute stimulation par des cytokines.

Potentiel des inhibiteurs de JAK1 contre les infections virales

Bien que l'activation des voies de signalisation JAK/STAT ait principalement pour effet de stimuler l'expression de gènes associés à la défense immunitaire contre les infections et le cancer, une immunité dérégulée ou des interféronopathies pourraient déclencher divers troubles immunitaires, allant de l'auto-immunité ou des maladies allergiques aux maladies auto-inflammatoires et au cancer (revu dans Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021).

Peu après leur découverte, les JAK ont rapidement été identifiées comme des cibles thérapeutiques. À l'heure actuelle, huit inhibiteurs de JAK ont été approuvés pour le traitement de maladies dermatologiques, rhumatologiques, hématologiques et gastro-intestinales (Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021). Parmi eux, le baricitinib a récemment été autorisé en urgence pour le traitement de l'infection par le SARS-CoV-2 pour sa capacité à bloquer la voie de signalisation JAK/STAT et la surproduction de cytokines qui s'ensuit dans les cas de maladie sévère, tout en affectant l'endocytose virale (Richardson *et al.*, 2020 ; Marconi *et al.*, 2021). Un effet inhibiteur sur l'entrée virale a également été suggéré pour le ruxolitinib et le fedratinib dans le cadre d'une infection par le SARS-CoV-2 (Stebbing *et al.*, 2020).

Par ailleurs, les inhibiteurs de JAK comme le ruxolitinib et le filgotinib ont été proposés comme agents antiviraux dans le cadre d'une infection par le HIV, indépendamment de leurs indications cliniques initiales (Gavegnano *et al.*, 2014, 2017 ; de Armas *et al.*, 2021). Leur potentiel en tant qu'inhibiteurs putatifs de la transcription du HIV, en réduisant la prolifération des cellules infectées et en bloquant la réactivation du virus grâce à la suppression des voies d'activation des lymphocytes T, a également été étudié (Yeh *et al.*, 2020). Une activité antivirale contre d'autres virus a aussi été décrite pour d'autres inhibiteurs de JAK. Notamment, le composé AT9283 évalué dans un essai de phase 2, a permis de réduire de 75 à 95 % l'infection par le HSV dans les neurones, bien qu'aucun mécanisme d'action n'ait été proposé

(D'Aiuto *et al.*, 2017). Un autre inhibiteur évalué en phase 2, le cerdulatinib, a également démontré une activité antivirale contre le virus T-lymphotrope humain (HTLV), un virus responsable de divers cancers comme des leucémies et des lymphomes (Ishikawa, Senba and Mori, 2018).

Les inhibiteurs de JAK sont connus pour être généralement sûrs et efficaces. Ainsi, l'utilisation dans le cadre d'une infection par le HDV d'inhibiteurs de JAK1 approuvés par la FDA, tels que l'upadacitinib, a démontré un potentiel antiviral élevé dans différents modèles d'étude *in vitro*, y compris dans les PHH. Les inhibiteurs de JAK1 apparaissent donc comme des candidats antiviraux intéressants pour des études précliniques dans le contexte d'une infection par le HDV, d'autant plus qu'à ce jour, aucune molécule ciblant la réplication du HDV n'est disponible. Cependant, l'interaction des inhibiteurs de JAK1 avec un éventuel co-traitement à base d'IFN doit être soigneusement analysée.

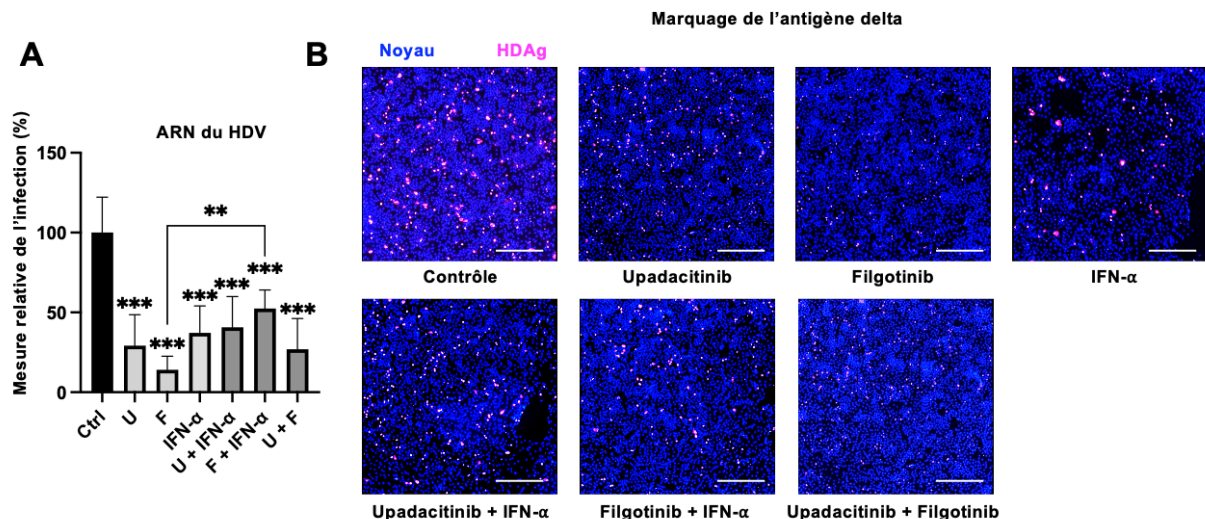


Figure 42 : Effets d'un traitement combinant de l'IFN-α et un inhibiteur de JAK1 sur l'infection par le HDV. Des cellules Huh7-NTCP ont été infectées avec le HDV puis traitées avec différentes combinaisons de molécules. Durée du traitement : J1-8. (A) L'infection par le HDV a été quantifiée par RT-qPCR à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules contrôles traitées avec du DMSO (Ctrl, 100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***). (B) Alternativement, l'infection a été évaluée par immunofluorescence (Barre d'échelle : 100 μm). U : upadacitinib ; F : filgotinib.

Dans ce contexte, j'ai cherché à évaluer les effets sur l'infection d'un traitement combinant de l'IFN- α -2a avec du filgotinib ou de l'upadacitinib dans des cellules Huh7-NTCP infectées avec le HDV. Les résultats préliminaires obtenus et présentés dans la **Figure 42** ont démontré que le traitement des cellules à base soit d'IFN- α -2a, soit de filgotinib, soit d'upadacitinib a bien inhibé l'infection par le HDV de manière significative par rapport aux cellules contrôles. La combinaison de deux molécules (IFN- α -2a avec filgotinib ou upadacitinib, ou upadacitinib

avec filgotinib) a également inhibé l'infection par le HDV, mais aucun effet antiviral additif n'a été observé par rapport à l'utilisation individuelle des différents composés. À l'inverse, la combinaison du filgotinib avec l'IFN- α semble inhiber moins efficacement l'infection par rapport à un traitement avec du filgotinib seul. Le filgotinib étant un inhibiteur compétitif pour la liaison de l'ATP sur son site de liaison dans la protéine JAK1, les résultats observés pourraient s'expliquer par le fait que la liaison des IFN- α -2a exogènes au niveau de leurs récepteurs induit un changement dans leur conformation (Thomas *et al.*, 2011), modifiant ainsi également la conformation des protéines JAK1 qui leur sont associées et rendant de ce fait le site de liaison de l'ATP de JAK1 moins accessible pour l'inhibiteur. Dans le futur, il serait nécessaire de valider ces observations en analysant les effets sur l'infection par le HDV de combinaisons entre plusieurs molécules au cours du temps et en utilisant des doses croissantes.

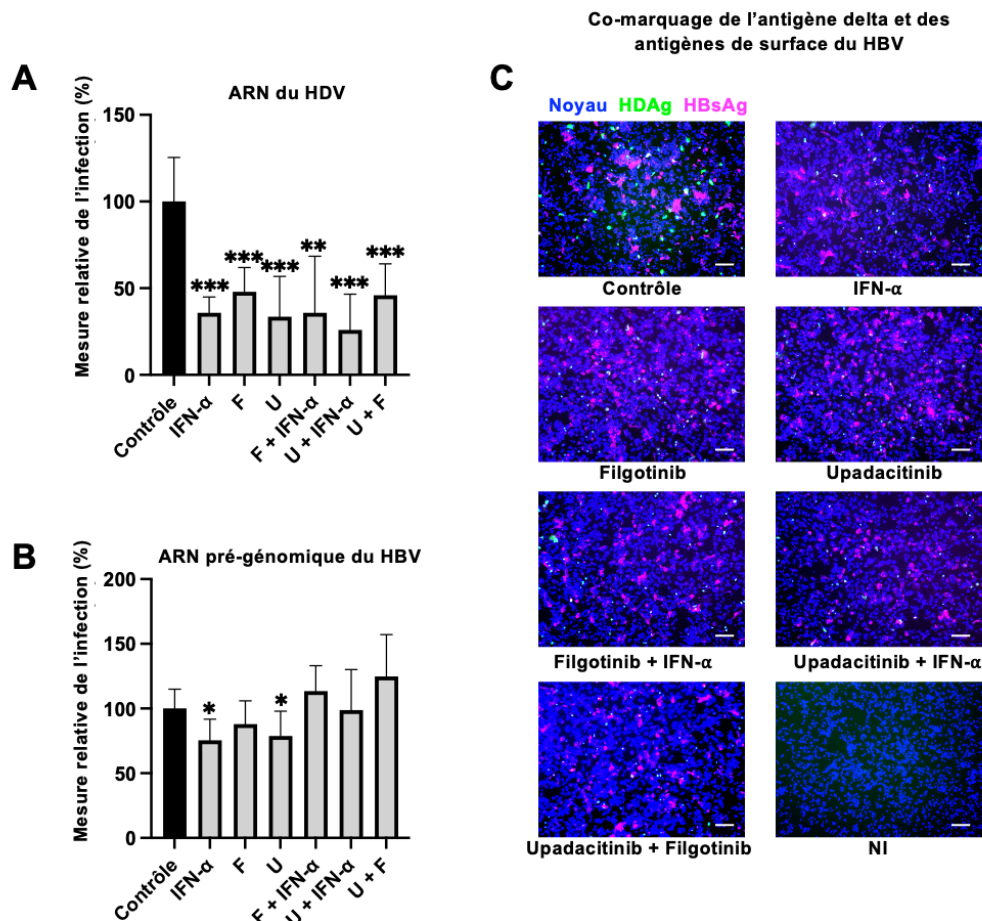


Figure 43 : Effets des inhibiteurs de JAK1 dans des cellules co-infectées avec le HBV et le HDV. Des cellules HepG2-NTCP co-infectées par le HDV et le HBV ont été traitées avec de l'IFN- α , de l'upadacitinib, du filgotinib ou diverses combinaisons de molécules pendant onze jours. (A-B) Les niveaux d'infection ont été quantifiés par RT-qPCR pour trois expériences indépendantes. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport aux cellules contrôles traitées avec du DMSO (100 %). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test U bilatéral de Mann-Whitney et les p-valeurs suivantes ont été considérées comme significatives : $p < 0,05$ (*) et $p < 0,001$ (***) (C) Alternativement, l'infection par le HDV et le HBV a été évaluée par immunofluorescence (Barre d'échelle : 100 μ m). U : upadacitinib ; F : filgotinib ; NI : non infecté.

Il convient également de noter qu'en raison de leurs propriétés immunosuppressives, les inhibiteurs de JAK1 peuvent être associés à un risque accru d'infections virales chez les patients. En effet, une augmentation de l'incidence de l'infection par le VZV (*varicella-zoster virus*) causée par la réactivation du virus latent a été rapportée dans plusieurs essais cliniques (Sunzini, McInnes and Siebert, 2020). Ceci a notamment été le cas lors de l'utilisation d'inhibiteurs de JAK tels que le tafacitinib, le baricitinib, l'upadacitinib, le filgotinib, le dedernotinib et le peficitinib, bien que les résultats étaient variables en fonction de la molécule et de la population étudiée (Ezeonwumelu, Garcia-Vidal and Ballana, 2021). D'autres infections virales, notamment l'infection par le CMV, ont été signalées dans des essais cliniques pendant le traitement avec le baricitinib et le tofacitinib (Winthrop *et al.*, 2016), ainsi que dans un rapport de cas d'un patient atteint de myélofibrose et traité avec le ruxolitinib (Eyal *et al.*, 2017).

Par conséquent, les effets antiviraux des inhibiteurs de JAK1 comme l'upadacitinib ou le filgotinib doivent être évalués de manière méticuleuse dans le contexte de la co-infection des hépatocytes par le HBV et le HDV. Ainsi, j'ai cherché à évaluer les effets d'un traitement à base d'IFN- α -2a, de filgotinib ou d'upadacitinib utilisés de manière individuelle ou combinée dans des cellules HepG2-NTCP infectées avec le HBV et le HDV. Les données préliminaires obtenues et présentées dans la **Figure 43** ont démontré que les inhibiteurs de JAK1 ont bien un effet antiviral contre le HDV, même en présence du HBV. La combinaison de deux inhibiteurs de JAK1 ou d'un inhibiteur de JAK1 avec de l'IFN- α n'a cependant pas montré d'effet antiviral additif contre l'infection par le HDV par rapport à l'utilisation des différents composés de manière individuelle. Malheureusement, dans ce modèle d'étude, l'interférence du HDV sur le HBV n'a pas non plus été observée puisque la baisse de l'infection par le HDV n'est pas associée à une augmentation des niveaux d'infection par le HBV. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que lors de ces expériences, peu de cellules aient été correctement co-infectées par les deux virus. En effet, les images d'immunofluorescence (**Figure 43C**) indiquent que peu de cellules sont marquées à la fois pour l'infection par le HBV et pour l'infection par le HDV. Des études plus approfondies devront donc être menées dans d'autres modèles comme dans des cellules HepaRG co-infectées ou dans des modèles de co-infection HBV/HDV pré-cliniques.

Enfin, étant donné l'existence de kinases intermédiaires impliquées dans l'activité provirale de JAK1, l'utilisation de composés inhibant les voies de signalisation en aval, tels que des inhibiteurs des MAPK, devrait être explorée pour limiter les effets secondaires putatifs associés à un traitement avec des inhibiteurs de JAK1. En effet, mes résultats de thèse ont démontré que l'inhibition de JAK1 est associée à une baisse de la phosphorylation des kinases ERK1/2

et que la restauration des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 à la suite d'un traitement avec de l'IL-6 dans les cellules KO pour *JAK1* permet de restaurer le phénotype infectieux (**Figures 39, 40 et 33**). Les kinases ERK1/2 apparaissent ainsi comme des cibles thérapeutiques potentielles contre l'infection par le HDV. Des molécules comme l'ASN007, un inhibiteur réversible et compétitif de l'ATP des kinases ERK1/2 présentant une IC_{50} de 2 nM contre ERK1/2 et qui a démontré une activité antiproliférative dans une variété de tumeurs (Portelinha *et al.*, 2021), pourraient être testées dans le futur dans des cellules infectées par le HDV.

Traitements futurs de l'hépatite D chronique

Le principal objectif du traitement de l'hépatite D consiste à prévenir le développement de complications associées à la maladie chronique, notamment la cirrhose, la décompensation hépatique et le HCC, permettant ainsi de réduire la mortalité globale chez les patients. Dans ce contexte, la guérison fonctionnelle d'une infection par le HBV, qui est associée à une disparition des HBsAg avec une séroconversion anti-HBsAg, devrait en théorie s'accompagner d'une clairance du HDV. Cependant, un critère d'évaluation plus pratique pour les thérapies anti-HDV est l'obtention d'un titre sérique ou plasmatique des ARN du HDV inférieur à la limite de détection par PCR, à la fois pendant et après le traitement (revu dans Asselah *et al.*, 2020).

La résistance du HDV aux traitements antiviraux conventionnels peut s'expliquer par sa structure et sa biologie singulières (Sureau and Negro, 2016). En effet, le génome du HDV ne code pas pour les protéines nécessaires à la réplication virale. Par conséquent, le virus exploite la machinerie répliquative de l'hôte, ne nécessitant de la part du HBV que les HBsAg pour entrer et sortir des cellules hépatiques, propageant ainsi l'infection. C'est pourquoi, le cycle de réplication du HDV n'est pas affecté par les médicaments qui ciblent directement les processus communs de réplication virale, tels que les inhibiteurs de la polymérase virale utilisés dans le traitement des infections par le HBV et le HCV (revu dans Asselah *et al.*, 2020 ; Rizzetto, Hamid and Negro, 2021). Ainsi, le traitement de l'hépatite D nécessite de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant à la fois les interactions du HDV avec les HBsAg, mais aussi les interactions du virus avec son hôte, afin de priver le virus de fonctions extrinsèques essentielles à son cycle de réplication. Dans ce contexte, il convient de poursuivre les investigations et d'évaluer les effets en clinique de traitements basés sur la combinaison d'antiviraux à action directe sur le cycle de multiplication du HDV, tels que le bulevirtide ou le lonafarnib (avec ritonavir), avec des médicaments qui inhibent spécifiquement la production des HBsAg, notamment les siRNA et les oligonucléotides antisens. Ces derniers ont en effet démontré leur innocuité et leur efficacité dans la diminution des taux d'HBsAg chez les patients atteints d'hépatite B chronique (Yuen *et al.*, 2020).

Conclusion générale

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur la caractérisation du rôle fonctionnel de la kinase JAK1 au cours de l'infection par le HDV. Bien que JAK1 joue un rôle clé dans la réponse immunitaire innée contre les infections virales, j'ai confirmé un effet proviral inattendu de cette kinase sur le HDV. Grâce à diverses analyses fonctionnelles, j'ai ensuite déterminé le mécanisme d'action de JAK1 sur le HDV.

Des expériences de validation dans différents systèmes *in vitro*, incluant les PHH, parallèlement à la quantification de l'expression de gènes stimulés par les IFN, ont permis de démontrer que l'activité provirale de JAK1 est indépendante de l'induction de la réponse immunitaire innée médiée par MDA5 lors de l'infection par le HDV. Des études d'extinction et de restauration de l'expression du gène *JAK1*, basées sur l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9, ont permis de confirmer l'importance de JAK1 dans le cycle de multiplication du HDV. Notamment, le rétablissement de l'expression de *JAK1* à l'aide d'une version mutante de la protéine incapable de lier l'ATP n'a pas restauré le phénotype infectieux dans les cellules JAK1-KO, démontrant ainsi le rôle clé de l'activité kinase de JAK1 pour l'infection par le HDV. De plus, grâce à des tests fonctionnels, j'ai démontré que l'inhibition de JAK1 est associée à une modulation des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 ainsi que d'une perte indirecte de la phosphorylation de S-HDAg, cruciale pour la réplication du HDV. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JAK1 comme l'upadacitinib, une molécule approuvée par la FDA, a présenté un effet antiviral dose-dépendant dans différentes lignées hépatocytaires surexprimant le récepteur NTCP, les PHH et les cellules HepaRG différenciées, confirmant ainsi la possibilité de cibler JAK1 pour les traitements anti-HDV.

En conclusion, en identifiant et en caractérisant JAK1 comme un nouveau facteur clé de l'infection par la HDV, mes résultats de thèse permettent d'améliorer notre compréhension du cycle de multiplication du HDV et de ses interactions avec la réponse immunitaire innée de l'hôte. Ces résultats ouvrent la voie au développement de stratégies thérapeutiques innovantes pour lutter contre l'hépatite D, une menace de santé publique mondiale.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, Z. *et al.* (2016) 'Co-treatment with pegylated interferon alfa-2a and entecavir for hepatitis D: A randomized trial', *World Journal of Hepatology*, 8(14), pp. 625–631.

Abbas, Z. and Afzal, R. (2013) 'Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review', *World Journal of Hepatology*, 5(12), pp. 666–675.

Abdel-Misih, S.R.Z. and Bloomston, M. (2010) 'Liver anatomy', *The Surgical Clinics of North America*, 90(4), pp. 643–653.

Abeywickrama-Samarakoon, N. *et al.* (2018) 'Réplication du génome du virus de l'hépatite delta : un rôle pour la petite protéine delta S-HDAg', *médecine/sciences*, 34(10), pp. 833–841.

Abraham, A. and Pelchat, M. (2008) 'Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis *delta* virus RNA genome', *Nucleic Acids Research*, 36(16), pp. 5201–5211.

Adkar-Purushothama, C.R. and Perreault, J.-P. (2020) 'Current overview on viroid-host interactions', *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 11(2), p. e1570.

Aguilera, A. *et al.* (2018) 'Prevalence and incidence of hepatitis delta in patients with chronic hepatitis B in Spain', *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 30(9), pp. 1060–1062.

Alberts, C.J. *et al.* (2022) 'Worldwide prevalence of hepatitis B virus and hepatitis C virus among patients with cirrhosis at country, region, and global levels: a systematic review', *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), pp. 724–735.

Alfaiate, D. *et al.* (2016) 'HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes', *Antiviral Research*, 136, pp. 19–31.

Amini, N. *et al.* (2013) 'Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: systematic review and meta analysis', *Hepatitis Monthly*, 13(1), p. e8210.

Andraos, R. *et al.* (2012) 'Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent', *Cancer Discovery*, 2(6), pp. 512–523.

Angelini, J. *et al.* (2020) 'JAK-Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Focus on the Present and an Outlook on the Future', *Biomolecules*, 10(7), p. 1002.

Anwer, M.S. (2014) 'Role of protein kinase C isoforms in bile formation and cholestasis',

Hepatology, 60(3), pp. 1090–1097.

Aragona, M. *et al.* (1987) 'Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D', *Lancet (London, England)*, 1(8531), pp. 478–480.

de Armas, L.R. *et al.* (2021) 'The Effect of JAK1/2 Inhibitors on HIV Reservoir Using Primary Lymphoid Cell Model of HIV Latency', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 720697.

Ashour, J. *et al.* (2009) 'NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation', *Journal of Virology*, 83(11), pp. 5408–5418.

Asselah, T. *et al.* (2020) 'Future treatments for hepatitis delta virus infection', *Liver International*, 40(S1), pp. 54–60.

Babon, J.J. *et al.* (2014) 'The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation', *The Biochemical Journal*, 462(1), pp. 1–13.

Bach, C. *et al.* (2023) 'A stable hepatitis D virus-producing cell line for host target and drug discovery', *Antiviral Research*, 209, p. 105477.

Bahoussi, A.N. *et al.* (2022) 'Global Distribution and Natural Recombination of Hepatitis D Virus: Implication of Kyrgyzstan Emerging HDVs in the Clinical Outcomes', *Viruses*, 14(7), p. 1467.

Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.-L. (2003) 'Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes', *Journal of Experimental Medicine*, 197(5), pp. 633–642.

Bazinet, M. *et al.* (2017) 'Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve 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', *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 2(12), pp. 877–889.

Bazinet, M. *et al.* (2021) 'Persistent Control of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus Infection Following REP 2139-Ca and Pegylated Interferon Therapy in Chronic Hepatitis B Virus/Hepatitis Delta Virus Coinfection', *Hepatology Communications*, 5(2), pp. 189–202.

Beeharry, Y. *et al.* (2018) 'The Hepatitis Delta Virus accumulation requires paraspeckle components and affects NEAT1 level and PSP1 localization', *Scientific Reports*, 8(1), p. 6031.

Belloni, L. *et al.* (2012) 'IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and

in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome', *The Journal of Clinical Investigation*, 122(2), pp. 529–537.

Bernal, W. and Wendon, J. (2013) 'Acute liver failure', *The New England Journal of Medicine*, 369(26), pp. 2525–2534.

Bichko, V.V. and Taylor, J.M. (1996) 'Redistribution of the delta antigens in cells replicating the genome of hepatitis delta virus', *Journal of Virology*, 70(11), pp. 8064–8070.

Blair, H.A. (2019) 'Fedratinib: First Approval', *Drugs*, 79(15), pp. 1719–1725.

Blanchet, M. *et al.* (2019) 'Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15 cells', *Antiviral Research*, 164, pp. 97–105.

Blank, A. *et al.* (2016) 'First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B', *Journal of Hepatology*, 65(3), pp. 483–489.

Blauvelt, A. *et al.* (2021) 'Efficacy and Safety of Upadacitinib vs Dupilumab in Adults With Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial', *JAMA dermatology*, 157(9), pp. 1047–1055.

Bogomolov, P. *et al.* (2016) 'Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study', *Journal of Hepatology*, 65(3), pp. 490–498.

Bordier, B.B. *et al.* (2002) 'A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles', *Journal of Virology*, 76(20), pp. 10465–10472.

Bordier, B.B. *et al.* (2003) 'In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), pp. 407–414.

Brancaccio, G. *et al.* (2022) 'Recent breakthroughs in the treatment of chronic hepatitis Delta', *Le Infezioni in Medicina*, 30(2), pp. 204–210.

Brass, A.L. *et al.* (2008) 'Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen', *Science*, 319(5865), pp. 921–926.

Bruce, M.G. *et al.* (2016) 'Antibody Levels and Protection After Hepatitis B Vaccine: Results of a 30-Year Follow-up Study and Response to a Booster Dose', *The Journal of Infectious Diseases*, 214(1), pp. 16–22.

Buchert, M., Burns, C.J. and Ernst, M. (2016) 'Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges', *Oncogene*, 35(8), pp. 939–951.

Burke, J.R. *et al.* (2019) 'Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain', *Science Translational Medicine*, 11(502), p. eaaw1736.

Buti, M. *et al.* (1986) 'Serological diagnosis of acute delta hepatitis', *Journal of Medical Virology*, 18(1), pp. 81–85.

Butler, E.K. *et al.* (2018) 'High prevalence of hepatitis delta virus in Cameroon', *Scientific Reports*, 8(1), p. 11617.

Cao, D. *et al.* (2009) 'Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication', *RNA (New York, N.Y.)*, 15(11), pp. 1971–1979.

Cappy, P. *et al.* (2021) 'No Evidence of Hepatitis C Virus (HCV)-Assisted Hepatitis D Virus Propagation in a Large Cohort of HCV-Positive Blood Donors', *The Journal of Infectious Diseases*, 223(8), pp. 1376–1380.

Cariani, E. *et al.* (1992) 'Evaluation of hepatitis delta virus RNA levels during interferon therapy by analysis of polymerase chain reaction products with a nonradioisotopic hybridization assay', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 15(4), pp. 685–689.

Casimiro-Garcia, A. *et al.* (2018) 'Identification of Cyanamide-Based Janus Kinase 3 (JAK3) Covalent Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(23), pp. 10665–10699.

Castaneda, D. *et al.* (2021) 'From hepatitis A to E: A critical review of viral hepatitis', *World Journal of Gastroenterology*, 27(16), pp. 1691–1715.

Caviglia, G.P., Ciancio, A. and Rizzetto, M. (2022) 'A Review of HDV Infection', *Viruses*, 14(8), p. 1749.

Chan, H.L.Y. *et al.* (2016) 'Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized phase 2b study (LIRA-B)', *Journal of Hepatology*, 64(5), pp. 1011–1019.

Chang, F.L. *et al.* (1991) 'The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), pp. 8490–8494.

Chao, M., Hsieh, S.Y. and Taylor, J. (1990) 'Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication', *Journal of Virology*, 64(10), pp. 5066–5069.

Chemin, I. *et al.* (2021) 'Preliminary Evidence for Hepatitis Delta Virus Exposure in Patients Who Are Apparently Not Infected With Hepatitis B Virus', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 73(2), pp. 861–864.

Chen, C.-W. *et al.* (2002) 'The Double-stranded RNA-activated Kinase, PKR, Can Phosphorylate Hepatitis D Virus Small Delta Antigen at Functional Serine and Threonine Residues', *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 33058–33067.

Chen, H.-Y. *et al.* (2019) 'Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis', *Gut*, 68(3), pp. 512–521.

Chen, M. *et al.* (2000) 'Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains', *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), pp. 947–956.

Chen, P.J. *et al.* (1986) 'Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), pp. 8774–8778.

Chen, X. *et al.* (2017) 'A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66(6), pp. 1739–1749.

Chen, Y.-S. *et al.* (2008) 'ERK1/2-Mediated Phosphorylation of Small Hepatitis Delta Antigen at Serine 177 Enhances Hepatitis Delta Virus Antigenomic RNA Replication', *Journal of Virology*, 82(19), pp. 9345–9358.

Choi, S.-H., Park, K.-J. and Hwang, S.B. (2002) 'Large hepatitis delta antigen is phosphorylated at multiple sites and phosphorylation is associated with protein conformational change', *Intervirology*, 45(3), pp. 142–149.

Chung, R.T. *et al.* (2012) 'Pathogenesis of liver injury in acute liver failure', *Gastroenterology*, 143(3), pp. e1–e7.

Ciceri, P. *et al.* (2014) 'Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology', *Nature Chemical Biology*, 10(4), pp. 305–312.

Collard, W.T. *et al.* (2014) 'The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(3), pp. 279–285.

Cong, M. *et al.* (2012) 'Cell Signals Influencing Hepatic Fibrosis', *International Journal of Hepatology*, 2012.

D'Aiuto, L. *et al.* (2017) 'Comparison of three cell-based drug screening platforms for HSV-1 infection', *Antiviral Research*, 142, pp. 136–140.

Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M. (1970) 'Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis', *Lancet (London, England)*, 1(7649), pp. 695–698.

Dastgerdi, E.S., Herbers, U. and Tacke, F. (2012) *World Journal of Virology*, 1(3), pp. 71–78.

Denniston, K.J. *et al.* (1986) 'Cloned fragment of the hepatitis delta virus RNA genome: sequence and diagnostic application', *Science (New York, N.Y.)*, 232(4752), pp. 873–875.

Dhillon, S. and Keam, S.J. (2020) 'Filgotinib: First Approval', *Drugs*, 80(18), pp. 1987–1997.

Ding, C. *et al.* (2016) 'A Cell-type-resolved Liver Proteome', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 15(10), pp. 3190–3202.

Dinolfo, L. *et al.* (1995) 'Detection of hepatitis D virus RNA in serum by a reverse transcription, polymerase chain reaction-based assay', *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 25(1), pp. 35–39.

Eiger BioPharmaceuticals (2023) 'Eiger to Discontinue Phase 3 LIMT-2 Trial of Peginterferon Lambda in Patients with Chronic Hepatitis Delta'.

Eletto, D. *et al.* (2016) 'Biallelic JAK1 mutations in immunodeficient patient with mycobacterial infection', *Nature Communications*, 7(1), p. 13992.

Eller, C. *et al.* (2020) 'A genome-wide gain-of-function screen identifies CDKN2C as a HBV host factor', *Nature Communications*, 11(1), p. 2707.

Engelke, M. *et al.* (2006) 'Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(4), pp. 750–760.

Eyal, O. *et al.* (2017) 'Varicella-zoster virus meningoencephalitis in a patient treated with ruxolitinib', *American Journal of Hematology*, 92(5), pp. E74–E75.

Ezeonwumelu, I.J., Garcia-Vidal, E. and Ballana, E. (2021) 'JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections', *Viruses*, 13(12), p. 2379.

Fattovich, G. *et al.* (2000) 'Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B', *Gut*, 46(3), pp. 420–426.

Feagan, B.G. *et al.* (2021) 'Filgotinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis (SELECTION): a phase 2b/3 double-blind, randomised, placebo-controlled trial', *Lancet (London, England)*, 397(10292), pp. 2372–2384.

Fernandez de la Mora, J. (2018) 'Mobility Analysis of Proteins by Charge Reduction in a Bipolar Electrospray Source', *Analytical Chemistry*, 90(20), pp. 12187–12190.

Flores, R., Owens, R.A. and Taylor, J. (2016) 'Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus', *Current Opinion in Virology*, 17, pp. 87–94.

Fonseca, J.C.F. da (2010) '[History of viral hepatitis]', *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 43(3), pp. 322–330.

Fox, A.H. and Lamond, A.I. (2010) 'Paraspeckles', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), p. a000687.

Funk, P.J. *et al.* (2022) 'Comparing available JAK inhibitors for treating patients with psoriasis', *Expert Review of Clinical Immunology*, 18(3), pp. 281–294.

Gao, B. *et al.* (2009) 'Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(2), pp. 424–433.

Garrido-Trigo, A. and Salas, A. (2020) 'Molecular Structure and Function of Janus Kinases: Implications for the Development of Inhibitors', *Journal of Crohn's & Colitis*, 14(Supplement_2), pp. S713–S724.

Gavegnano, C. *et al.* (2014) 'Ruxolitinib and tofacitinib are potent and selective inhibitors of HIV-1 replication and virus reactivation in vitro', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), pp. 1977–1986.

Gavegnano, C. *et al.* (2017) 'Novel mechanisms to inhibit HIV reservoir seeding using Jak inhibitors', *PLoS pathogens*, 13(12), p. e1006740.

Georgel, P. and Bahram, S. (2006) 'Immunité innée antivirale : Rôle des mécanismes Toll-dépendants et Toll-indépendants', *médecine/sciences*, 22(11), pp. 961–968.

Gheorghe, L. *et al.* (2015) 'Hepatitis Delta Virus Infection in Romania: Prevalence and Risk

Factors', *Journal of gastrointestinal and liver diseases: JGLD*, 24(4), pp. 413–421.

Ghoreschi, K., Laurence, A. and O'Shea, J.J. (2009) 'Janus kinases in immune cell signaling', *Immunological Reviews*, 228(1), pp. 273–287.

Giersch, K. *et al.* (2017) 'Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice', *Scientific Reports*, 7(1), p. 3757.

Gillich, N. *et al.* (2023) 'Effect of variants in LGP2 on MDA5-mediated activation of interferon response and suppression of hepatitis D virus replication', *Journal of Hepatology*, 78(1), pp. 78–89.

Gilman, C., Heller, T. and Koh, C. (2019) 'Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies', *World Journal of Gastroenterology*, 25(32), pp. 4580–4597.

Glenn, J.S. *et al.* (1992) 'Identification of a prenylation site in delta virus large antigen', *Science (New York, N.Y.)*, 256(5061), pp. 1331–1333.

Gonzales, A.J. *et al.* (2014) 'Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(4), pp. 317–324.

Goodrum, G. and Pelchat, M. (2018) 'Insight into the Contribution and Disruption of Host Processes during HDV Replication', *Viruses*, 11(1), p. 21.

Grant, A. *et al.* (2016) 'Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling', *Cell Host & Microbe*, 19(6), pp. 882–890.

Greco-Stewart, V. and Pelchat, M. (2010) 'Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus', *Viruses*, 2(1), pp. 189–212.

Greco-Stewart, V.S. *et al.* (2007) 'The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome', *Virology*, 357(1), pp. 68–78.

Greco-Stewart, V.S., Schissel, E. and Pelchat, M. (2009) 'The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III', *Virology*, 386(1), pp. 12–15.

Greco-Stewart, V.S., Thibault, C.S.-L. and Pelchat, M. (2006) 'Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA', *Virology*, 356(1–2), pp. 35–44.

Gripon, P. *et al.* (2002) 'Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus',

Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(24), pp. 15655–15660.

Groc, S. *et al.* (2019) 'High prevalence and diversity of hepatitis B and hepatitis delta virus in Gabon', *Journal of Viral Hepatitis*, 26(1), pp. 170–182.

Gudima, S. *et al.* (2000) 'Origin of hepatitis delta virus mRNA', *Journal of Virology*, 74(16), pp. 7204–7210.

Gunsar, F. *et al.* (2005) 'Two-year interferon therapy with or without ribavirin in chronic delta hepatitis', *Antiviral Therapy*, 10(6), pp. 721–726.

Hammarén, H.M. *et al.* (2019) 'The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease', *Cytokine*, 118, pp. 48–63.

Harris, C. and Cummings, J.R.F. (2021) 'JAK1 inhibition and inflammatory bowel disease', *Rheumatology (Oxford, England)*, 60(Supple 2), pp. ii45–ii51.

Hartwig, D. *et al.* (2004) 'Interferon- α stimulation of liver cells enhances hepatitis delta virus RNA editing in early infection', *Journal of Hepatology*, 41(4), pp. 667–672.

Hartwig, D. *et al.* (2006) 'The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells', *Journal of Viral Hepatitis*, 13(3), pp. 150–157.

Haugh, I.M., Watson, I.T. and Alan Menter, M. (2018) 'Successful treatment of atopic dermatitis with the JAK1 inhibitor oclacitinib', *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 31(4), pp. 524–525.

Haussecker, D. *et al.* (2008) 'Capped small RNAs and MOV10 in human hepatitis delta virus replication', *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), pp. 714–721.

Heidrich, B. *et al.* (2014) 'Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(1), pp. 87–97.

Heller, T. *et al.* (2014) 'Long-term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa', *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40(1), pp. 93–104.

Hercun, J., Koh, C. and Heller, T. (2020) 'Hepatitis Delta: Prevalence, Natural History, and Treatment Options', *Gastroenterology Clinics of North America*, 49(2), pp. 239–252.

Herrscher, C. *et al.* (2020) 'Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis', *Cellular Microbiology*, n/a(n/a), p. e13205.

Hirano, T., Nakajima, K. and Hibi, M. (1997) 'Signaling mechanisms through gp130: A model of the cytokine system', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8(4), pp. 241–252.

Hoffmann, M. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor', *Cell*, 181(2), pp. 271-280.e8.

Hong, S.-Y. and Chen, P.-J. (2010) 'Phosphorylation of Serine 177 of the Small Hepatitis Delta Antigen Regulates Viral Antigenomic RNA Replication by Interacting with the Processive RNA Polymerase II', *Journal of Virology*, 84(3), pp. 1430–1438.

Hu, Q. *et al.* (2020) 'E-cadherin Plays a Role in Hepatitis B Virus Entry Through Affecting Glycosylated Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Distribution', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, p. 74.

Hu, X. *et al.* (2021) 'The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), p. 402.

Huang, C. *et al.* (2009) 'Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus', *Journal of Virology*, 83(23), pp. 12314–12324.

Huang, H.-C. *et al.* (2016) 'Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAG-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus', *The Journal of Biological Chemistry*, 291(50), pp. 26226–26238.

Imam, H. *et al.* (2020) 'Interferon-stimulated gene 20 (ISG20) selectively degrades N6-methyladenosine modified Hepatitis B Virus transcripts', *PLoS pathogens*, 16(2), p. e1008338.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) 'Virus interference. I. The interferon', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 147(927), pp. 258–267.

Ishikawa, C., Senba, M. and Mori, N. (2018) 'Anti-adult T-cell leukemia/lymphoma activity of cerdulatinib, a dual SYK/JAK kinase inhibitor', *International Journal of Oncology*, 53(4), pp. 1681–1690.

Iwamoto, M. *et al.* (2019) 'Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17), pp. 8487–8492.

Iwasaki, A. and Pillai, P.S. (2014) 'Innate immunity to influenza virus infection', *Nature Reviews Immunology*, 14(5), pp. 315–328.

Joshi, S.S. and Coffin, C.S. (2018) 'Hepatitis B virus lymphotropism: emerging details and challenges', *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 34(1), pp. 139–151.

Joyce, M.A. *et al.* (2019) 'HCV and flaviviruses hijack cellular mechanisms for nuclear STAT2 degradation: Up-regulation of PDLIM2 suppresses the innate immune response', *PLoS pathogens*, 15(8), p. e1007949.

Jung, S., Altstetter, S.M. and Protzer, U. (2020) 'Innate immune recognition and modulation in hepatitis D virus infection', *World Journal of Gastroenterology*, 26(21), pp. 2781–2791.

Kalra, A. *et al.* (2023) 'Physiology, Liver', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Kamili, S. *et al.* (2017) 'Delta hepatitis: Toward improved diagnostics', *Hepatology*, 66(6), pp. 1716–1718.

Kan, Z. *et al.* (2013) 'Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma', *Genome Research*, 23(9), pp. 1422–1433.

Karimzadeh, H. *et al.* (2018) 'Amino Acid Substitutions within HLA-B*27-Restricted T Cell Epitopes Prevent Recognition by Hepatitis Delta Virus-Specific CD8+ T Cells', *Journal of Virology*, 92(13), pp. e01891-17.

Khabir, M. *et al.* (2020) 'Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process To Promote Its Genome Replication', *Journal of Virology*, 94(4), pp. e01936-19.

Khodarev, N.N., Roizman, B. and Weichselbaum, R.R. (2012) 'Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth', *Clinical Cancer Research*.

Koh, C. *et al.* (2015) 'Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial', *The Lancet. Infectious Diseases*, 15(10), pp. 1167–1174.

Kouwaki, T. *et al.* (2016) 'Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection', *Frontiers in Immunology*, 7, p. 335.

Krieger, S.E. *et al.* (2010) 'Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations', *Hepatology*, 51(4), pp. 1144–1157.

Labetoulle, R., Paul, S. and Roblin, X. (2018) 'Filgotinib for the treatment of Crohn's disease', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(3), pp. 295–300.

Ladner, S.K. *et al.* (1997) 'Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(8), pp. 1715–1720.

Launay, O. and Floret, D. (2015) 'Vaccination contre l'hépatite B', *médecine/sciences*, 31(5), pp. 551–558.

Le Duff, Y., Blanchet, M. and Sureau, C. (2009) 'The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent', *Journal of Virology*, 83(23), pp. 12443–12451.

Le Gal, F. *et al.* (2017) 'Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66(6), pp. 1826–1841.

Lehmann, E., Brueckner, F. and Cramer, P. (2007) 'Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity', *Nature*, 450(7168), pp. 445–449.

Lemon, S.M. and Thomas, D.L. (1997) 'Vaccines to prevent viral hepatitis', *The New England Journal of Medicine*, 336(3), pp. 196–204.

Leroy, E. and Constantinescu, S.N. (2017) 'Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile Janus kinase inhibition', *Leukemia*, 31(5), pp. 1023–1038.

Li, D. *et al.* (2019) 'Small DNA circles as bacterial topoisomerase I inhibitors', *RSC advances*, 9(32), pp. 18415–18419.

Li, Y.-J. *et al.* (2006) 'RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies', *Journal of Virology*, 80(13), pp. 6478–6486.

Li, Y.-J., Stallcup, M.R. and Lai, M.M.C. (2004) 'Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication', *Journal of Virology*, 78(23), pp. 13325–13334.

Liao, F.-T. *et al.* (2009) 'Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells', *The Journal of General Virology*, 90(Pt 5), pp. 1124–1134.

Liu, Y. *et al.* (2017) 'Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA', *PLoS pathogens*, 13(4), p. e1006296.

Lucifora, J. *et al.* (2023) 'Hepatitis D virus interferes with hepatitis B virus RNA production via interferon-dependent and -independent mechanisms', *Journal of Hepatology*, p. S0168827823000168.

Luo, H. *et al.* (1997) 'Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways', *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), pp. 1562–1571.

Lupberger, J. *et al.* (2011) 'EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy', *Nature Medicine*, 17(5), pp. 589–595.

Lütgehetmann, M. *et al.* (2012) 'Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(3), pp. 685–694.

Madejón, A. *et al.* (1990) 'Detection of HDV-RNA by PCR in serum of patients with chronic HDV infection', *Journal of Hepatology*, 11(3), pp. 381–384.

Magnius, L. *et al.* (2018) 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus', *Journal of General Virology*, 99(12), pp. 1565–1566.

Majzoub, K., Wrensch, F. and Baumert, T.F. (2019) 'The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans', *Viruses*, 11(8).

Makhoul, M. *et al.* (2013) 'Junctional ectopic tachycardia after congenital heart surgery in the current surgical era', *Pediatric Cardiology*, 34(2), pp. 370–374.

Makino, S. *et al.* (1987) 'Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA', *Nature*, 329(6137), pp. 343–346.

Marconi, V.C. *et al.* (2021) 'Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial', *The Lancet Respiratory Medicine*, 9(12), pp. 1407–1418.

Martin, N.A. (2003) 'The discovery of viral hepatitis: a military perspective', *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 149(2), pp. 121–124.

Maupas, P. *et al.* (1976) 'Immunisation against hepatitis B in man', *Lancet (London)*,

England), 1(7974), pp. 1367–1370.

Mease, P. *et al.* (2018) 'Efficacy and safety of filgotinib, a selective Janus kinase 1 inhibitor, in patients with active psoriatic arthritis (EQUATOR): results from a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial', *Lancet (London, England)*, 392(10162), pp. 2367–2377.

Mederacke, I. *et al.* (2010) 'Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), pp. 2022–2029.

Méheut, L., B., M. (2022) 'Hépatites virales non alphabétiques', *Hépatologie*.

Mendes, M. *et al.* (2013) 'Proteomic changes in HEK-293 cells induced by hepatitis delta virus replication', *Journal of Proteomics*, 89, pp. 24–38.

Menet, C.J. (2018) 'A Dual Inhibition, a Better Solution: Development of a JAK1/TYK2 inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(19), pp. 8594–8596.

Mentha, N. *et al.* (2019) 'A review on hepatitis D: From virology to new therapies', *Journal of Advanced Research*, 17, pp. 3–15.

Miao, Z. *et al.* (2020) 'Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 221(10), pp. 1677–1687.

Michelet, M. *et al.* (2022) 'Inducers of the NF- κ B pathways impair hepatitis delta virus replication and strongly decrease progeny infectivity in vitro', *JHEP Reports*, 4(3), p. 100415.

Modahl, L.E. *et al.* (2000) 'RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases', *Molecular and Cellular Biology*, 20(16), pp. 6030–6039.

Modahl, L.E. and Lai, M.M. (2000) 'The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication', *Journal of Virology*, 74(16), pp. 7375–7380.

Moroianu, J. *et al.* (1995) 'Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), pp. 6532–6536.

Morris, R., Kershaw, N.J. and Babon, J.J. (2018) 'The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway', *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(12), pp. 1984–2009.

Mota, S. *et al.* (2009) 'Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins', *Journal of Proteomics*, 72(4), pp. 616–627.

Mu, J.-J. *et al.* (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), pp. 60–70.

Muensterman, E. *et al.* (2022) 'Upadacitinib pharmacokinetics and exposure-response analyses of efficacy and safety in psoriatic arthritis patients - Analyses of phase III clinical trials', *Clinical and Translational Science*, 15(1), pp. 267–278.

Negishi, H., Taniguchi, T. and Yanai, H. (2018) 'The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11), p. a028423.

Negro, F. (2014) 'Hepatitis D virus coinfection and superinfection', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(11), p. a021550.

Netter, H.J. *et al.* (2021) 'Hepatitis Delta Virus (HDV) and Delta-Like Agents: Insights Into Their Origin', *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 652962.

Ni, Y. *et al.* (2014) 'Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes', *Gastroenterology*, 146(4), pp. 1070–1083.

Nohales, M.-Á., Flores, R. and Daròs, J.-A. (2012) 'Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), pp. 13805–13810.

Olsen, K. *et al.* (2023) 'Recent treatment advances and practical management of hepatitis D virus', *Clinical Medicine (London, England)*, 23(4), pp. 403–408.

Pascarella, S. and Negro, F. (2011) 'Hepatitis D virus: an update', *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31(1), pp. 7–21.

Perez-Vargas, J. *et al.* (2019) 'Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo', *Nature Communications*, 10(1), p. 2098.

Petersen, J. *et al.* (2008) 'Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein', *Nature Biotechnology*, 26(3), pp. 335–341.

Pflüger, L.S. *et al.* (2021) 'Hepatitis delta virus propagation enabled by hepatitis C virus-Scientifically intriguing, but is it relevant to clinical practice?', *Journal of Viral Hepatitis*, 28(1), pp. 213–216.

Philips, R.L. *et al.* (2022) 'The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do', *Cell*, 185(21), pp. 3857–3876.

Poland, G.A. and Jacobson, R.M. (2004) 'Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine', *The New England Journal of Medicine*, 351(27), pp. 2832–2838.

Portelinha, A. *et al.* (2021) 'ASN007 is a selective ERK1/2 inhibitor with preferential activity against RAS-and RAF-mutant tumors', *Cell Reports. Medicine*, 2(7), p. 100350.

Poubel, C.P. *et al.* (2019) 'FLT3 overexpression in acute leukaemias: New insights into the search for molecular mechanisms', *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1872(1), pp. 80–88.

Raivola, J., Haikarainen, T. and Silvennoinen, O. (2019) 'Characterization of JAK1 Pseudokinase Domain in Cytokine Signaling', *Cancers*, 12(1), p. 78.

Ramanathan, A., Robb, G.B. and Chan, S.-H. (2016) 'mRNA capping: biological functions and applications', *Nucleic Acids Research*, 44(16), pp. 7511–7526.

Rawlings, J.S., Rosler, K.M. and Harrison, D.A. (2004) 'The JAK/STAT signaling pathway', *Journal of Cell Science*, 117(Pt 8), pp. 1281–1283.

Reid, S.P. *et al.* (2006) 'Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation', *Journal of Virology*, 80(11), pp. 5156–5167.

Richardson, P. *et al.* (2020) 'Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. e30–e31.

Rizzetto, M. *et al.* (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), pp. 997–1003.

Rizzetto, M. *et al.* (1980) 'delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees', *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 77(10), pp. 6124–6128.

Rizzetto, M. (2015) 'Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), p. a021576.

Rizzetto, M., Hamid, S. and Negro, F. (2021) 'The changing context of hepatitis D', *Journal of Hepatology*, 74(5), pp. 1200–1211.

Roca Suarez, A.A. *et al.* (2018) 'Viral manipulation of STAT3: Evade, exploit, and injure', *PLoS Pathogens*, 14(3).

Rodig, S.J. *et al.* (1998) 'Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses', *Cell*, 93(3), pp. 373–383.

Rynhoud, H. *et al.* (2021) 'The Association Between the Use of Oclacitinib and Antibacterial Therapy in Dogs With Allergic Dermatitis: A Retrospective Case-Control Study', *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p. 631443.

Sanjana, N.E., Shalem, O. and Zhang, F. (2014) 'Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening', *Nature Methods*, 11(8), pp. 783–784.

Sato, S., Cornillez-Ty, C. and Lazinski, D.W. (2004) 'By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression', *Journal of Virology*, 78(15), pp. 8120–8134.

Scarponi, C.F. de O. *et al.* (2019) 'Hepatitis Delta Prevalence in South America: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 52, p. e20180289.

Schaper, M. *et al.* (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', *Journal of Hepatology*, 52(5), pp. 658–664.

Schoggins, J.W. *et al.* (2014) 'Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity', *Nature*, 505(7485), pp. 691–695.

Schulze, A., Gripon, P. and Urban, S. (2007) 'Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans', *Hepatology*, 46(6), pp. 1759–1768.

Schwartz, D.M. *et al.* (2017) 'JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(12), pp. 843–862.

Schweitzer, A. *et al.* (2015) 'Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013', *Lancet (London, England)*, 386(10003), pp. 1546–1555.

Serhal, L. and Edwards, C.J. (2019) 'Upadacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis', *Expert Review of Clinical Immunology*, 15(1), pp. 13–25.

Servant-Delmas, A. *et al.* (2014) 'Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France', *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 59(2), pp. 126–128.

Shattock, A.G. and Morgan, B.M. (1984) 'Sensitive enzyme immunoassay for the detection of delta antigen and anti-delta, using serum as the delta antigen source', *Journal of Medical Virology*, 13(1), pp. 73–82.

Shawky, A.M. *et al.* (2022) 'A Comprehensive Overview of Globally Approved JAK Inhibitors', *Pharmaceutics*, 14(5), p. 1001.

Shen, Y. *et al.* (2016) 'Association between JAK1 gene polymorphisms and susceptibility to allergic rhinitis', *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 34(2), pp. 124–129.

Shien, K. *et al.* (2017) 'JAK1/STAT3 Activation through a Proinflammatory Cytokine Pathway Leads to Resistance to Molecularly Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer', *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(10), pp. 2234–2245.

Sikora, D. *et al.* (2009) 'The hepatitis delta virus RNA genome interacts with eEF1A1, p54(nrb), hnRNP-L, GAPDH and ASF/SF2', *Virology*, 390(1), pp. 71–78.

Singh, D. *et al.* (2021) 'A phase 2 multiple ascending dose study of the inhaled pan-JAK inhibitor nezulcitinib (TD-0903) in severe COVID-19', *The European Respiratory Journal*, 58(4), p. 2100673.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P. and Duncan, S.A. (2010) 'Organogenesis and development of the liver', *Developmental Cell*, 18(2), pp. 175–189.

Smolen, J.S. *et al.* (2019) 'Upadacitinib as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate (SELECT-MONOTHERAPY): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 3 study', *Lancet (London, England)*,

393(10188), pp. 2303–2311.

Stebbing, J. *et al.* (2020) 'COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments', *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(4), pp. 400–402.

Stephenson-Tsoris, S. and Liang, T.J. (2023) 'Hepatitis Delta Virus-Host Protein Interactions: From Entry to Egress', *Viruses*, 15(7), p. 1530.

Stockdale, A.J. *et al.* (2020) 'The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis', *Journal of Hepatology*, 73(3), pp. 523–532.

Suárez-Amarán, L. *et al.* (2017) 'A new HDV mouse model identifies mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) as a key player in IFN- β induction', *Journal of Hepatology*, 67(4), pp. 669–679.

Sunzini, F., McInnes, I. and Siebert, S. (2020) 'JAK inhibitors and infections risk: focus on herpes zoster', *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 12, p. 1759720X2093605.

Sureau, C., Guerra, B. and Lanford, R.E. (1993) 'Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion', *Journal of Virology*, 67(1), pp. 366–372.

Sureau, C., Guerra, B. and Lee, H. (1994) 'The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus', *Journal of Virology*, 68(6), pp. 4063–4066.

Sureau, C. and Negro, F. (2016) 'The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis', *Journal of Hepatology*, 64(1 Suppl), pp. S102–S116.

Sureau, C. and Salisse, J. (2013) 'A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant', *Hepatology*, 57(3), pp. 985–994.

Szirovicza, L. *et al.* (2019) *Snake deltavirus utilizes envelope proteins of different viruses to generate infectious particles*. preprint. Microbiology.

T Virtanen, A. *et al.* (2019) 'Selective JAKinibs: Prospects in Inflammatory and Autoimmune Diseases', *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 33(1), pp. 15–32.

Tavanez, J.P. *et al.* (2020) 'Hepatitis delta virus interacts with splicing factor SF3B155 and

alters pre-mRNA splicing of cell cycle control genes', *The FEBS journal*, 287(17), pp. 3719–3732.

Taylor, J.M. (2006) 'Structure and replication of hepatitis delta virus RNA', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 307, pp. 1–23.

Terrault, N.A. *et al.* (2018) 'Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(4), pp. 1560–1599.

Thiyagarajah, K., Basic, M. and Hildt, E. (2023) 'Cellular Factors Involved in the Hepatitis D Virus Life Cycle', *Viruses*, 15(8), p. 1687.

Thomas, C. *et al.* (2011) 'Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons', *Cell*, 146(4), pp. 621–632.

Tseng, C.-H. *et al.* (2010) 'Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein', *Journal of Virology*, 84(2), pp. 918–927.

Tseng, C.-H. and Lai, M.M.C. (2009) 'Hepatitis delta virus RNA replication', *Viruses*, 1(3), pp. 818–831.

Turon-Lagot, V. *et al.* (2020) 'Targeting the Host for New Therapeutic Perspectives in Hepatitis D', *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), p. 222.

Urban, S. *et al.* (2014) 'Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes', *Gastroenterology*, 147(1), pp. 48–64.

Urban, S., Neumann-Haefelin, C. and Lampertico, P. (2021) 'Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease', *Gut*, 70(9), pp. 1782–1794.

Vaillant, A. (2019) 'REP 2139: Antiviral Mechanisms and Applications in Achieving Functional Control of HBV and HDV Infection', *ACS Infectious Diseases*, 5(5), pp. 675–687.

Vainchenker, W. *et al.* (2018) 'JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders', *F1000Research*, 7, p. 82.

Velkov, S. *et al.* (2018) 'The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data', *Genes*, 9(10), p. 495.

Vermeire, S. *et al.* (2017) 'Clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's

disease treated with filgotinib (the FITZROY study): results from a phase 2, double-blind, randomised, placebo-controlled trial', *The Lancet*, 389(10066), pp. 266–275.

Verrier, E. *et al.* (2018) 'Le transporteur d'acides biliaires NTCP, un acteur majeur dans l'infection par les virus humains des hépatites offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques', *Virologie*, 22, pp. 55–66.

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., *et al.* (2016) 'A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses', *Hepatology*, 63(1), pp. 35–48.

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Zona, L., *et al.* (2016) 'Solute Carrier NTCP Regulates Innate Antiviral Immune Responses Targeting Hepatitis C Virus Infection of Hepatocytes', *Cell Reports*, 17(5), pp. 1357–1368.

Verrier, E.R. *et al.* (2020) 'Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets', *Gut*, 69(1), pp. 158–167.

Verrier, E.R. *et al.* (2022) 'Cell-based cccDNA reporter assay combined with functional genomics identifies YBX1 as HBV cccDNA host factor and antiviral candidate target', *Gut*, p. gutjnl-2020-323665.

Villiers, M.-B. *et al.* (2015) 'Protein-peptide arrays for detection of specific anti-hepatitis D virus (HDV) genotype 1, 6, and 8 antibodies among HDV-infected patients by surface plasmon resonance imaging', *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), pp. 1164–1171.

Waksal, J.A., Tremblay, D. and Mascarenhas, J. (2021) 'Clinical Utility of Fedratinib in Myelofibrosis', *OncoTargets and Therapy*, Volume 14, pp. 4509–4521.

Wang, K.S. *et al.* (1986) 'Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome', *Nature*, 323(6088), pp. 508–514.

Wang, W. *et al.* (2021) 'Assembly and infection efficacy of hepatitis B virus surface protein exchanges in 8 hepatitis D virus genotype isolates', *Journal of Hepatology*, 75(2), pp. 311–323.

Wang, Y.-C. *et al.* (2009) 'The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin', *Virology Journal*, 6, p. 31.

Wang, Y.-H. *et al.* (2005) 'Novel nuclear export signal-interacting protein, NESI, critical for

the assembly of hepatitis delta virus', *Journal of Virology*, 79(13), pp. 8113–8120.

Wedemeyer, H. *et al.* (2019) 'Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial', *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(3), pp. 275–286.

Wedemeyer, H., Aleman, S., *et al.* (2023) 'A Phase 3, Randomized Trial of Bulevirtide in Chronic Hepatitis D', *The New England Journal of Medicine*, 389(1), pp. 22–32.

Wedemeyer, H., Schöneweis, K., *et al.* (2023) 'Safety and efficacy of bulevirtide in combination with tenofovir disoproxil fumarate in patients with hepatitis B virus and hepatitis D virus coinfection (MYR202): a multicentre, randomised, parallel-group, open-label, phase 2 trial', *The Lancet. Infectious Diseases*, 23(1), pp. 117–129.

Wedemeyer, H. and Manns, M.P. (2010) 'Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(1), pp. 31–40.

Wedemeyer, H. and Negro, F. (2019) 'Devil hepatitis D: an orphan disease or largely underdiagnosed?', *Gut*, 68(3), pp. 381–382.

Wernig, G. *et al.* (2008) 'Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera', *Cancer Cell*, 13(4), pp. 311–320.

Wesselhoeft, R.A. *et al.* (2019) 'RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo', *Molecular Cell*, 74(3), pp. 508-520.e4.

Wilks, A.F. (1989) 'Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), pp. 1603–1607.

Williams, V. *et al.* (2009) 'Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene', *Journal of General Virology*, 90(11), pp. 2759–2767.

Williams, V. *et al.* (2012) 'Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF-κB via oxidative stress', *Journal of Viral Hepatitis*, 19(10), pp. 744–753.

Wills-Karp, M. *et al.* (1998) 'Interleukin-13: central mediator of allergic asthma', *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), pp. 2258–2261.

Winthrop, K.L. *et al.* (2016) 'Tuberculosis and other opportunistic infections in tofacitinib-treated patients with rheumatoid arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(6), pp. 1133–1138.

Wong, S.K. and Lazinski, D.W. (2002) 'Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 15118–15123.

Wranke, A. *et al.* (2018) 'Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN)', *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 38(5), pp. 842–850.

Wroblewski, S.T. *et al.* (2019) 'Highly Selective Inhibition of Tyrosine Kinase 2 (TYK2) for the Treatment of Autoimmune Diseases: Discovery of the Allosteric Inhibitor BMS-986165', *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(20), pp. 8973–8995.

Wu, J.C. *et al.* (1995) 'Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction', *Gastroenterology*, 108(3), pp. 796–802.

Wu, Q. *et al.* (2019) 'JNK signaling in cancer cell survival', *Medicinal Research Reviews*, 39(6), pp. 2082–2104.

Wu, S.-C. *et al.* (2015) 'Activity of the Type II JAK2 Inhibitor CHZ868 in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia', *Cancer Cell*, 28(1), pp. 29–41.

Yan, H. *et al.* (2012) 'Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus', *eLife*, 1, p. e00049.

Yasuda, T. *et al.* (2016) 'Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis', *The Journal of Clinical Investigation*, 126(6), pp. 2064–2076.

Yeh, T.S. *et al.* (1996) 'Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly', *Journal of Virology*, 70(9), pp. 6190–6198.

Yeh, Y.-H.J. *et al.* (2020) 'Filgotinib suppresses HIV-1-driven gene transcription by inhibiting HIV-1 splicing and T cell activation', *Journal of Clinical Investigation*, 130(9), pp. 4969–4984.

Yuan, Y. *et al.* (2023) 'Chemoproteomic discovery of a human RNA ligase', *Nature Communications*, 14(1), p. 842.

Yuen, M.-F. *et al.* (2020) 'RNA Interference Therapy With ARC-520 Results in Prolonged Hepatitis B Surface Antigen Response in Patients With Chronic Hepatitis B Infection', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 72(1), pp. 19–31.

Yurdaydin, C. *et al.* (2002) 'Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis', *Journal of Hepatology*, 37(2), pp. 266–271.

Yurdaydin, C. *et al.* (2008) 'Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon', *Journal of Viral Hepatitis*, 15(4), pp. 314–321.

Yurdaydin, C. *et al.* (2022) 'A phase 2 dose-finding study of lonafarnib and ritonavir with or without interferon alpha for chronic delta hepatitis', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 75(6), pp. 1551–1565.

Zak, M. *et al.* (2019) 'Discovery of a class of highly potent Janus Kinase 1/2 (JAK1/2) inhibitors demonstrating effective cell-based blockade of IL-13 signaling', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(12), pp. 1522–1531.

Zhang, Z. *et al.* (2018) 'Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β/λ responses in hepatocytes', *Journal of Hepatology*, 69(1), pp. 25–35.

Zhang, Z. and Urban, S. (2020) 'Interplay between Hepatitis D Virus and the Interferon Response', *Viruses*, 12(11), p. 1334.

Zheng, Y. *et al.* (2023) 'Hepatitis B virus hijacks TSG101 to facilitate egress via multiple vesicle bodies', *PLoS pathogens*, 19(5), p. e1011382.

Zhou, H. *et al.* (2008) 'Genome-Scale RNAi Screen for Host Factors Required for HIV Replication', *Cell Host & Microbe*, 4(5), pp. 495–504.

Zhou, M. *et al.* (2017) 'Productive HBV infection of well-differentiated, hNTCP-expressing human hepatoma-derived (Huh7) cells', *Virologica Sinica*, 32(6), pp. 465–475.

Zi, J. *et al.* (2022) 'Multiple Regions Drive Hepatitis Delta Virus Proliferation and Are Therapeutic Targets', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 838382.

Zignego, A.L. *et al.* (1990) 'Amplification of hepatitis delta virus RNA sequences by polymerase chain reaction: a tool for viral detection and cloning', *Molecular and Cellular Probes*, 4(1), pp. 43–51.

Liste des communications scientifiques

Avril 2023 : Global Hepatitis Summit à Paris (France)

Présentation orale : « Identification And Characterization Of Janus Kinase JAK1 As An HDV-Related Host Factor And Antiviral Target »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Heydmann-Meiss L, Gerges E, Felli E, Giannone F, Pessaux P, Schuster C, Lucifora J, Baumert TF, Verrier ER

Avril 2023 : Journées Francophones de Virologie à Paris (France)

Présentation orale : « Identification et caractérisation de la Janus kinase JAK1 comme facteur d'hôte du HDV et cible antivirale »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Heydmann-Meiss L, Gerges E, Felli E, Giannone F, Pessaux P, Schuster C, Lucifora J, Baumert TF, Verrier ER

Décembre 2022 : Gastro Regio Meeting 2022 à Strasbourg (France)

Présentation orale : « Identification And Characterization Of Janus Kinase JAK1 As An HDV-Related Host Factor And Antiviral Target »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Heydmann-Meiss L, Gerges E, Schuster C, Baumert TF, Verrier ER

Septembre 2022 : HBV Meeting à Paris (France)

Présentation orale : « Identification And Characterization Of Janus Kinase JAK1 As An HDV-Related Host Factor And Antiviral Target »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Gerges E, Schuster C, Baumert TF, Verrier ER

Juin 2022 : Hepatitis Delta International Network à Londres (Royaume-Uni)

Présentation orale : « Identification And Characterization Of Janus Kinase JAK1 As An HDV-Related Host Factor And Antiviral Target »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Gerges E, Schuster C, Baumert TF, Verrier ER

Octobre 2021 : Innate Sensors Community Symposium III (en ligne)

Présentation orale : « Characterization of JAK1 Proviral Activity in Hepatitis Delta Virus Infection »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Schuster C, Baumert TF, Verrier ER

Juin 2021 : Réunion annuelle AC42 de l'ANRS (en ligne)

Présentation orale : « Characterization of JAK1 Proviral Activity in Hepatitis Delta Virus Infection »

Auteurs : Heuschkel MJ, Bach C, Schuster C, Baumert TF, Verrier ER

Annexe 1

A stable hepatitis D virus-producing cell line for host target and drug discovery

Bach C, Lucifora J, Delphin M, Heydmann L, [Heuschkel MJ](#), Pons C, Goto K, Scheers E, Schuster C, Durantel D, Pauwels F, Baumert TF, Verrier ER.

Étude publiée dans *Antiviral Research*, Janvier 2023 (209:105477)



A stable hepatitis D virus-producing cell line for host target and drug discovery

Charlotte Bach^{a,1}, Julie Lucifora^{b,1}, Marion Delphin^b, Laura Heydmann^a, Margaux J. Heuschkel^a, Caroline Pons^b, Kaku Goto^a, Els Scheers^c, Catherine Schuster^a, David Durantel^b, Frederik Pauwels^c, Thomas F. Baumert^{a,d}, Eloi R. Verrier^{a,*}

^a Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR,S1110, Strasbourg, France

^b CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, F-69007, Lyon, France

^c Janssen Research & Development, Janssen Pharmaceutical Companies, Beerse, Belgium

^d Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatito-digestif, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepatitis D virus
Virus-host interactions
Cell culture model
Lonafarnib

ABSTRACT

Chronic hepatitis D is the most aggressive form of chronic viral hepatitis. It is caused by super-infection of hepatitis B virus (HBV)-infected hepatocytes with hepatitis D virus (HDV). While the recent conditional approval of bulevirtide for HDV treatment offers a new therapeutic modality in Europe, there is an unmet medical need to further improve therapy. A more detailed characterization of virus-host interactions is needed for the identification of novel therapeutic targets. Addressing this need, we engineered a new stably-transformed cell line, named HuH7-2C8D, producing high titer recombinant HDV and allowing the study of viral particles morphogenesis and infectivity. Using this culture system, where viral propagation by re-infection is limited, we observed an increased accumulation of edited version of the viral genomes within secreted HDV viral particles over time that is accompanied with a decrease in viral particle infectivity. We confirmed the interaction of HDV proteins with a previously described host factor in HuH7-2C8D cells and additionally showed that these cells are suitable for co-culture assays with other cell types such as macrophages. Finally, the use of HuH7-2C8D cells allowed to confirm the dual antiviral activity of farnesyl transferase inhibitors, including the clinical candidate lonafarnib, against HDV. In conclusion, we have established an easy-to-handle cell culture model to investigate HDV replication, morphogenesis, and host interactions. HuH7-2C8D cells are also suitable for high-throughput antiviral screening assays for the development of new therapeutic strategies.

1. Introduction

Hepatitis D virus (HDV) is a small defective virus capable of infecting human hepatocytes and responsible for the more severe form of chronic viral hepatitis (Lucifora and Delphin, 2020). HDV is a satellite virus of hepatitis B virus (HBV), the leading cause of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide, and needs the presence of HBV envelope proteins (HBsAg) for the assembly of new viral particles (Lucifora and Delphin, 2020; Sureau and Negro, 2016). Detected in about 10% of the 296 million patients chronically infected by HBV, HDV infection leads to an accelerated development of liver damage and an increased risk of developing advanced liver disease and HCC compared to HBV

mono-infected patients (Sureau and Negro, 2016). Despite the recent development of innovative antiviral therapies based on the administration of the entry inhibitor bulevirtide (Urban et al., 2021), the current long-term treatments involving pegylated interferon alpha (PEG-IFN α) lead to a limited rate of viral clearance (Turon-Lagot et al., 2020). Thus, new therapeutic strategies are needed to further defeat this global health threat. HDV does not encode viral enzymes and thereby relies on host ones. The sole enzymatic activity of HDV is a difficult-to-target ribozyme activity. Targeting host activities compulsory for viral replication is therefore an area that may offer new opportunities. This is demonstrated by the development of lonafarnib, a farnesyl transferase inhibitor (FTI) impairing virion assembly, currently evaluated in phase III clinical trial,

* Corresponding author.

E-mail address: e.verrier@unistra.fr (E.R. Verrier).

¹ These authors equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105477>

Received 13 May 2022; Received in revised form 23 November 2022; Accepted 25 November 2022

Available online 26 November 2022

0166-3542/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and bulevirtide, which targets the virus receptor at the hepatocyte cell surface and received a conditional approval in the European Union (Turon-Lagot et al., 2020; Urban et al., 2021). Targeting host-dependency factors requires extensive knowledge on virus-host interactions and a comprehensive characterization of host factors involved in the viral life cycle. Although the main steps of the HDV life cycle have been characterized, the underlying molecular mechanisms of hepatocyte-HDV interactions still need to be more deeply investigated. HDV is characterized by a small circular RNA genome associated to the two forms of the HDV antigen (HDAG) within the viral ribonucleoprotein (RNP) (Sureau and Negro, 2016). The viral envelope is composed of the three forms of HBV surface antigen (HBsAg) (Sureau and Negro, 2016). Sharing the same envelope proteins, HDV and HBV are likely to enter the cells through a similar mechanism (reviewed in (Herscher et al., 2020b)), involving the initial attachment to heparan sulfate proteoglycan (HSPG) and a specific binding to the viral receptor NTCP at the hepatocyte basolateral membrane (Ni et al., 2014; Schulze et al., 2007; Verrier et al., 2016a; Yan et al., 2012). NTCP directly interacts with the preS1 region of large HBsAg (L-HBsAg) and this interaction is inhibited by synthetic preS1 peptides such as bulevirtide (Urban et al., 2021). Upon internalization, probably through clathrin-mediated endocytosis (Herscher et al., 2020a), HDV RNP is released in the cytoplasm and addressed to the nucleus. HDV replication takes place in the nucleus and fully relies on host polymerases, mainly RNA polymerase II (Lucifora and Delphin, 2020). HDV genome serves as a template for the transcription of HDAG mRNA, leading to the production of small HDAG (S-HDAG) that induces viral replication. In parallel, the antigenome is synthesized from HDV genome via a rolling-circle mechanism (Lucifora and Delphin, 2020; Sureau and Negro, 2016). The antigenome in turn serves as a matrix for the production of new versions of the HDV genome through the same mechanism. During viral replication, the adenosine deaminase ADAR edits the antigenome at the mRNA AMBER stop codon site, leading to the transcription of a longer mRNA and the synthesis of the large HDAG (L-HDAG). L-HDAG prenylation, inhibited by FTIs including lonafarnib, triggers both the inhibition of viral replication and virion assembly through the interaction with the small HBV envelope protein S-HBsAg (Lucifora and Delphin, 2020; Sato et al., 2004; Sureau and Negro, 2016; Turon-Lagot et al., 2020). Importantly, viral assembly and release are still poorly characterized.

The understanding of molecular interactions between HDV and hepatocyte host factors has been limited for a long time by the absence of easy-to-use cell culture models (Heuschkel et al., 2021). Although recent advances based on NTCP-expressing cells have allowed significant progress in the past ten years (Heuschkel et al., 2021), key aspects of the viral life cycle, notably assembly and release, remain unclear. Here, we report the establishment of a new HDV-producing cell line, termed HuH7-2C8D, allowing both the production of large stock of recombinant virus and the study of viral replication, assembly and release. We also suggest its use for the screening of host factors and antiviral molecules.

2. Material and methods

2.1. Plasmids and reagents

The lentiviral vector pLX304-HB2.7 expresses HBsAg (Genotype D, serotype ayw, GenBank: V01460.1) and was kindly provided by Professor Stephan Urban (University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany) (Lempp et al., 2019). The lentiviral vector pLV [shRNA]-Puro-U6>(shHBsAg-1) expresses a shRNA specifically targeting HBsAg (referenced as shHBs in the study) as well as the puromycin resistance gene and was obtained from VectorBuilder (vector ID: VB220325-1130fza). Target sequence: TTCCAGGATCCTCAACAAC. The lentiviral vector pLV[shRNA]-Puro-U6>Scramble_shRNA#1 expresses a shRNA (shCtrl in the study) with no target sequence in the human transcriptome and was obtained from VectorBuilder (vector ID: VB010000-0005mme). Target sequence: CCTAAGGTTAAGTC

GCCCTCG. The HDV-encoding plasmid pSVLD3 (genotype 1, GenBank: M21012.1) was kindly provided by Doctor John Taylor (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA). The production of pSVLD3-neo was adapted from (Chen et al., 1990). A neomycin resistance cassette was inserted into the pSVLD3 plasmid. The sequences of the neomycin resistance gene and its promoter were amplified from EX-C0391-Lv151 (GeneCopoeia) using the following primers: SacI-hPGK_Prom-F: 5'-AAAGAGCTCGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAG-GCAG-3' and BamHI-NeoR-R: 5'-AAAGGATCCTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGGG ATAG-3', and subcloned into pSVLD3 upon digestion by SacI and BamHI, producing pSVLD3-neo. Neomycin resistance gene expression is under the control of hPGK promoter (see Fig. S1). Lipopolysaccharide (LPS) was obtained from Invivogen (San Diego, CA, USA) and GM-CSF from R&D System. FTI-277 trifluoroacetate salt (F9803), lonafarnib (SML1457), dimethyl sulfoxide (DMSO), and PEG 8000 (polyethylene glycol) were obtained from Merck. PreS1 peptide is derived from the preS1 region of HBV envelope protein and was synthesized by Bachem (Bubendorf, CH). DNA transfection at the indicated concentrations was performed using the CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech) and FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) according to the manufacturers' instructions.

2.2. Cell lines

Human embryonic kidney 293T- (HEK 293T) (Lupberger et al., 2011), HepaRG- (Alfaite et al., 2016; Gripon et al., 2002), and HuH7.5-NTCP cells (Verrier et al., 2022) were cultured and differentiated as previously described. Monocytes purified from blood gases of healthy donors (Etablissement Français du Sang, EFS; code 895/1052) were isolated and cultivated as described (Delphin et al., 2021). For the production of NTCP-overexpressing HuH7, cells were seeded in six-well plates at 50% confluence 1 day prior to transduction with *SLC10A1*-expressing vesicular stomatitis virus pseudoparticles (VSVpp) (GeneCopoeia, 217EX-C0391-Lv151) produced in HEK 293T by transfection as described (Lupberger et al., 2011; Verrier et al., 2016a). After 3 days, cells were expanded and selected for NTCP expression with 500 µg/mL of neomycin (G418). HuH7-NTCP cells were maintained at a concentration of 250 µg/mL G418. For the production of a stable cell line producing HDV infectious particles, HuH7 cells were transduced with VSVpp containing pLX304-HB2.7 and selected with blasticidin at 8 µg/mL, producing the stable cell pool HuH7-HB2.7. Single cell sorting using a cell sorter SH800 (Sony) isolated cell clone HuH7-2C8 according to intracellular and extracellular HBsAg expression, as quantified by flow cytometry and chemiluminescence immunoassay (CLIA), respectively (see below). Subsequently, HuH7-2C8 cells were transfected with pSVLD3-neo and selected with G418 at 750 µg/mL in presence of blasticidin at 8 µg/mL, producing the HuH7-2C8D cell line. HuH7-2C8D cells were maintained at a concentration of 250 µg/mL G418 and 7 µg/mL blasticidin. The cell line was amplified and stored five passages after transfection with pSVLD3-neo plasmid.

2.3. Characterization of HuH7-2C8 and HuH7-2C8D cell lines

Extracellular HBsAg expression was quantified by chemiluminescence immunoassay (CLIA, Autobio, CL0310-2) according to the manufacturer's instructions. Intracellular expression of HBsAg in the different cell lines was assessed by flow cytometry as described (Eller et al., 2020) using a specific mouse monoclonal anti-HBsAg antibody (clone 1044/329, Novus) and a secondary AF647-labelled goat antibody targeting mouse IgGs (Jackson ImmunoResearch, 115-605-003). A CytoFLEX cytometer (Beckman Coulters) was used. Intracellular HBsAg and HDAG levels were also assessed by Western blot as described (Eller et al., 2020; Verrier et al., 2016a). Briefly, proteins were separated and blotted by electrophoresis and transfer system (BioRad). HBsAg and HDAG expressions were assessed using a monoclonal antibody targeting HBsAg - and a rabbit polyclonal anti-HDAG antibody, respectively. Both

antibodies were provided by Janssen Pharmaceutica (Beerse, Antwerp, Belgium). Peroxidase-conjugated goat secondary antibodies targeting human IgGs (109-035-003) and rabbit IgGs (101-035-144) were obtained from Jackson ImmunoResearch. β -actin- or β -tubulin expression was assessed in parallel using a mouse monoclonal antibody (Sigma, A5441) or a rabbit polyclonal antibody (GenTex, GTX101279), respectively. For β -actin detection, a secondary peroxidase-conjugated sheep antibody targeting mouse IgGs (GE Healthcare, NA931) was used. Protein expression was assessed using the ChemiDoc™ Imaging System (BioRad). The interaction between HDAg and MOV10 was assessed by co-immunoprecipitation as previously described (Verrier et al., 2020). HDAg immunoprecipitation was performed using Pierce™ Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit as described (Verrier et al., 2020). Briefly, confluent cells were washed with cold PBS and lysed in ice-cold IP Lysis/Wash Buffer on ice. Lysate was cleared by centrifugation at 13,000×g for 10 min. Cleared cell lysate was incubated with 5 μ g of patient-derived anti-HDAg antibody (Verrier et al., 2020) covalently bound to Pierce Protein A/G Magnetic Beads, or 5 μ g of human control IgG used as negative control. The beads were washed extensively to remove non-bound material and bound proteins were eluted in a low-pH elution buffer according to manufacturer's instructions. Eluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblot using a mouse monoclonal anti-MOV10 (Abcam, ab176687) antibody or the patient-derived anti-HDAg antibody (Verrier et al., 2020).

2.4. Production of recombinant HDV infectious particles

For the production of recombinant HDV infectious particles, HuH7-2C8D cells were plated in proliferation medium for three days consisting in HuH7 cell culture medium as described (Eller et al., 2020; Verrier et al., 2016a, 2020) complemented with 7 μ g/mL blasticidin and 250 μ g/mL G418. After three days, medium was replaced by production medium. Two types of production medium were used, showing a similar productivity: 1) William's E medium complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) or 2) primary hepatocyte maintenance medium (PMM, based on William's E medium (Eller et al., 2020; Verrier et al., 2020)) complemented with 10% FBS. Both media were complemented with 2% DMSO. Cell supernatants were harvested at different time points post medium change for the characterization of HDV infectious particles. Extracellular HBsAg expression was quantified by CLIA. For detection of extracellular HBsAg and HDAg expression by Western blot, supernatant from HuH7-2C8D cells was concentrated 7X with a 30% sucrose cushion after ultracentrifugation at 40,000 rpm for 4 h at 4 °C. Protein expression was assessed as described above. For the quantification of HDV RNA in cell supernatant, total RNA was extracted using ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Promega) or NucleoSpin 96 RNA (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed using Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix (ThermoFisher Scientific, M1682). qPCR was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and the following primers: HDV-Fw: 5'-CGGGCCGGCTACTCTTCT-3'; HDV-Re: 5'-AAGGAAGCCCTCGAGAAC-3'. Absolute HDV cDNA copies were assessed through a quantification standard based on synthetic HDV RNA obtained as described (Alfaiate et al., 2016) or from a quantified specific PCR product obtained from the pSVLD3 plasmid. The quantity of viral particles was estimated based on the quantification of extracellular HDV RNA copies, and was expressed as viral genome equivalents (Vge). For the characterization of viral particles, supernatant from HuH7-2C8 and HuH7-2C8D cells were concentrated with a 30% sucrose cushion and purified through a 10–45% iodixanol density gradient using Optiprep Density Gradient Medium (Merck, D1556) according to manufacturer's instructions after ultracentrifugation at 40,000 rpm for 16 h at 4 °C. Ten fractions were collected. 200 μ L of each fraction were weighted to assess the density. HBsAg levels in each fraction were assessed by CLIA. HDV RNA levels in each fraction were quantified by RT-qPCR as described

above. For the silencing of HBsAg expression, HuH7-2C8D cells were seeded one day prior to transduction with a lentiviral vector expressing shHBs or shCtrl. 3 days after transduction, cells were selected in production medium supplemented with puromycin at 1.8 μ g/mL for 3 days. Puromycin was then removed, and cells were cultured in production medium for 4 days. Supernatants were then harvested and silencing efficacy was assessed by CLIA quantification of extracellular HBsAg. For the inhibition of HDV assembly, HuH7-2C8D cells were seeded in amplification medium. After 3 days, medium was replaced by production medium complemented with FTI-277 at 10 μ M. Medium was replaced with fresh compound every 2/3 days. Viral parameters were assessed at different time points post treatment as described above.

2.5. HDV infection and coinfection

Infectious virus particles were harvested from the supernatant of HuH7-2C8D cells or produced as described (Alfaiate et al., 2016). If necessary, supernatants were subjected to overnight precipitation with 8% PEG 8000 as described (Alfaiate et al., 2016). HuH7-NTCP cells were infected with recombinant HDV particles as previously described (Verrier et al., 2016a, 2016b, 2020). Briefly, HuH7-NTCP cells were seeded one day prior to pretreatment or not with preS1 peptide at 200 nM for 1 h at 37 °C. Cells were then infected by HDV at 100 Vge/cell except otherwise stated in presence of 4% PEG. 16 h after inoculation, virus was removed, cells were washed and cultured in PMM with 2% DMSO. HDV infection was assessed at 6 days post infection (dpi) by immunofluorescence (IF) using the previously described rabbit anti-HDAg antibody and Alexa Fluor 647-labelled secondary antibody targeting rabbit IgGs (Jackson ImmunoResearch, 111-605-144). Cell nuclei were stained with DAPI. Fluorescent imaging was performed using an Axio Vert.A1 microscope (Carl Zeiss), and the number of HDAg-positive cells was quantified using a Celigo plate cytometer (Nexcelom). Alternatively, cells were lysed at 6dpi and total RNA was purified as described above. HDV infection levels were assessed by RT-qPCR quantification of HDV RNA primers and TaqMan® probe: HDV-835-851: 5'-TGGACGGTGCCTCCTCCT-3'; HDV-905-889: 5'-TCTTCGGGTCGGCATGG-3'. HDV-Pr-856-870: 5'-[FAM]-ATGCCAGGTCGGAC-[BHQ1]-3'. All values were normalized to GAPDH expression quantified using Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control (VIC™/MGB probe, primer limited, Applied Biosystems™, 4326317E). HuH7.5-NTCP and HepaRG cells were infected as previously described (Alfaiate et al., 2016; Verrier et al., 2022), and HDV infection was assessed after 6 days by RT-qPCR quantification of HDV RNA as described (Alfaiate et al., 2016; Verrier et al., 2022). HuH7.5-NTCP cells were coinfecting with HBV and HDV as previously described (Verrier et al., 2022).

2.6. RT-digital droplet PCR (RT-ddPCR) assay for the quantification of HDV RNA

The RT-ddPCR assay has been extensively described (Verrier et al., 2022). Briefly, total RNAs were purified and reverse transcribed from HuH7-2C8D cell supernatant at different time points post medium change as described above. Edited and non-edited versions of HDV RNA were quantified in a duplex assay through QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions as described (Lebosse et al., 2020; Verrier et al., 2022). The following primers amplifying the editable region of the HDV genome were used: HDV_951–970_Fw: 5'-TATTCAGTGGGGTCGACAAC-3'; HDV_1101-1082_Re: 5'-CTTCGTCCCAATCTGCAG-3'. The dual-labelled probes specific for non-edited and edited HDV sequences were respectively:

HDV_Probe-S: 5'-[6FAM]-CCTATGGAAATCCCTGGTTTCCCTGATG-[BHQ1]-3'

HDV_Probe-L: 5'-[HEX]-CCCATGGAAATCCCTGGTTTCCCTGATG-[BHQ1]-3'

Fluorescent data were analyzed using the QuantaSoft analysis

software (Bio-Rad). The quantification of absolute sample concentration was obtained by applying Poisson's distribution.

2.7. Monocyte co-culture with HuH7-derived cells

Co-culture with HuH7-derived cells was performed as previously described (Delphin et al., 2021). Briefly, HuH7, HuH7-2C8, or HuH7-2C8D cells were seeded in 24-well plates. Monocytes were seeded into 6.3 mm diameters PET inserts for 24-well plates, with pores of 0.45 μm diameter (Dutscher, 2515127) displayed above HuH7-derived cells (transwell system). Using GM-CSF (50 ng/mL), monocytes were differentiated into M1-monocyte-derived macrophages (MDM) through a six-day process as described (Delphin et al., 2021). M1-MDM were then stimulated with 10 ng/mL of LPS for 3 h. IL-6 and IL-1 β secretions within the M1-MDMs supernatant at day 7 were assessed using DuoSet ELISA from R&D Systems following the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analyses

Results are expressed as means \pm standard deviations (SD) as stated in the figure legends. Statistical analyses were performed using a two-tailed Mann-Whitney *U* test; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant. Significant *p*-values are indicated by asterisks in the individual figures and figure legends. The number of tested biological replicates (*n*) is indicated in the figure legends.

3. Results

3.1. Production of a stable cell line expressing both HBsAg and the HDV genome

We produced an HuH7-derived cell line stably secreting HDV infectious particles using the strategy depicted in Fig. 1A. First, HuH7 cells were transduced with a lentiviral vector expressing a 2.7 kb subgenomic fragment of the HBV ayw genome, allowing the expression of S-, M- and L-HBsAg under the control of their native promoters and enhancers (Lempp et al., 2019; Sureau et al., 1994). Transduction efficacy in the HuH7-HB2.7 cell pool was assessed by quantification of HBsAg intracellular expression by flow cytometry. As shown in Fig. 1B, only a fraction of the cells expressed HBsAg in the cell pool. In order to select an HBsAg-expressing clone, HuH7-HB2.7 single cells were dispensed in 96-well plates using a cell sorter and single clones were expanded. Among them, the HuH7-2C8 clone was selected according to its robust intracellular HBsAg expression level as determined by flow cytometry (Fig. 1B) and HBsAg secretion level as determined by CLIA (Fig. 1C, S2). HuH7-2C8 cells were then transfected with pSVLD3-neo plasmid (Fig. 1A) that is derived from the HDV genotype 1-expressing plasmid pSVLD3, in which a neomycin resistance cassette was inserted (Fig. S1). The resulting cell line, named HuH7-2C8D, was therefore selected for neomycin resistance. As shown in Fig. 1B–C, intracellular and secreted HBsAg levels are similar in HuH7-2C8D cells and their parental clone. To characterize the production of HDV particles, HuH7-2C8D cells were seeded and the dynamic of viral protein production was assessed by Western blot. As shown in Fig. 1D–E, the three forms of HBsAg are produced and secreted from HuH7-2C8D cells. In the same manner, the two forms of HDAg are detected both in cell lysates and cellular supernatants (Fig. 1F–G). Interestingly, the dynamic of intracellular HDAg production demonstrated an initial enrichment in S-HDAg, followed by a switch at day 7 when L-HDAg becomes more expressed in correlation with the timing of HDV replication and the editing of the viral antigenome (Fig. 1F), as previously shown in infection systems (Alfaia et al., 2016). Iodixanol-based density gradient applied to the supernatants of HuH7-2C8 and HuH7-2C8D cells confirmed that HDV RNA was detected in the same fractions as HBsAg (Fig. 1H–J), suggesting assembly and secretion of canonical HDV infectious particles. Taken

together, our results show that HuH7-2C8D cell line stably produces and secretes HDAg and HBsAg and is as a suitable model for the study of HDV replication and assembly.

3.2. HuH7-2C8D cells produce high titer recombinant HDV infectious particles

We tested the infectivity of HDV particles produced in HuH7-2C8D cells using the strategy presented in Fig. 2A. HuH7-2C8D cells were plated and cultured in production medium. Supernatants were harvested, pooled, and the titers of the resulting HDV inocula, assessed by qRT-PCR quantification of HDV RNA, were around 10^9 vge/mL. Of note such concentrated HDV viral inocula could be obtained from the classical transfection-based HDV production system only after concentration by PEG precipitation. HuH7-NTCP cells were then seeded and inoculated with HDV particles at increasing Vge per cell. To validate the specificity of infection, HuH7-NTCP were previously treated with a synthetic HBV preS1 peptide that binds to NTCP and inhibits viral entry. HDV infection was assessed by immunodetection of HDAg and RT-qPCR quantification of HDV RNA in infected cells. As shown in Fig. 3B–C, inoculation of HuH7-NTCP cells with HuH7-2C8D supernatant leads to the detection of HDAg-positive cells, with HDV RNA levels correlating with the initial virus concentration and with no effect on cell viability as shown by DAPI staining. HDV infection was strongly inhibited by preS1 peptide treatment, validating the specificity of infection. Of note, supernatants derived from HBs-silenced HuH7-2C8D cells (Fig. 3D) do not trigger an effective infection in HuH7-NTCP cells (Fig. 3D–E). Importantly, shHBs expression has no effect on cell viability, as quantified by the total number of cells at the time of supernatant harvest, and on intracellular HDAg levels (Fig. S3). Taken together, our results demonstrated that recombinant HDV particles secreted by HuH7-2C8D cells efficiently infect susceptible cells through a specific infection pathway. HuH7-2C8D cells may therefore serve as a source of large stocks of recombinant virus.

3.3. Time-dependent decrease in the infectivity of HDV particles

As one purpose of this cell line was the large-scale production of recombinant HDV infectious particles, we next aimed to determine the dynamic of virus production in HuH7-2C8D cells. To do so, cells were seeded, proliferation medium was replaced by production medium after three days, and supernatants were regularly harvested at different time points post medium change (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, extracellular HBsAg and HDV RNA levels follow more or less the same dynamic. HuH7-5-NTCP, differentiated HepaRG and HuH7-NTCP cells were infected with the different supernatants at an adjusted Vge/cell (Fig. 3A). We observed that the levels of infection decreased when cells were inoculated with HuH7-2C8D supernatants collected at late time points (Fig. 3C, D, 3E), suggesting a time-dependent decrease in HDV particles specific infectivity. Given the dynamic of HDV replication, we hypothesized that during virus production, ADAR-mediated editing of the viral antigenome likely leads to an accumulation of edited versions of the viral genomes that are packaged into *de novo* viral particles. In theory, these are defective viral particles unable to trigger viral replication, given that these edited versions of the genome do not allow the synthesis of S-HDAg, required for viral replication (Lucifora and Delphin, 2020). To test this hypothesis, we assessed the supernatants of HuH7-2C8D cells with a digital droplet PCR (ddPCR) method we recently developed (Verrier et al., 2022). This duplex RT-ddPCR assay allows the independent quantification of both edited and non-edited versions of viral RNA. When applied to the HuH7-2C8 supernatants from different time points post production start, we observed a time-dependent increase in the ratio between edited and non-edited HDV RNA (Fig. 3F) that would at least partially explain the decreased infectivity of viral particles observed in Fig. 3C, D and 3E. Of note, we believe that this is not a special feature of virions secreted from

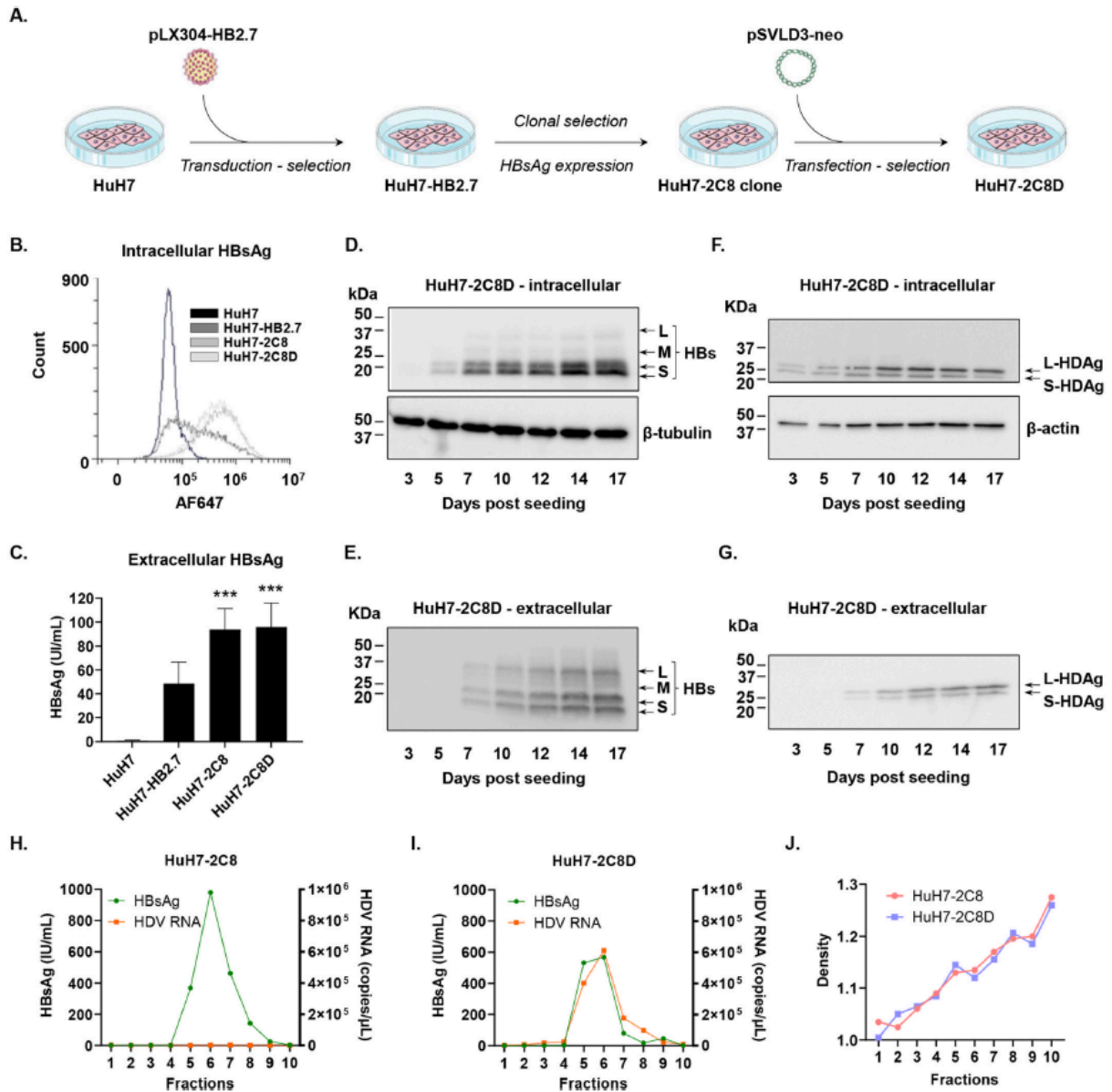


Fig. 1. Approach and virological characterization of the HuH7-2C8D cell line. **A.** Experimental strategy. HuH7 cells were first transduced with pLX304-HB2.7 lentiviral vector. From the HuH7.HB2.7 cell pool, HuH7-2C8 clone was isolated, expanded and transfected with HDV-expressing pSVLD3-neo plasmid, leading to the production of the HuH7-2C8D pool cell line. **B.** Intracellular HBsAg levels in the indicated cell lines assessed by flow cytometry. One representative experiment is shown. **C.** Extracellular HBsAg expression levels determined by CLIA in the supernatants of the different cell lines. Results are expressed as means \pm SD secreted HBsAg (UI/mL) from three independent experiments ($n = 15$). **D-E.** Intracellular (**D**) and extracellular (**E**) HBsAg expression level from HuH7-2C8D cells assessed by Western blot. HuH7-2C8D cells were seeded and supernatants were harvested and cell lysed at the indicated time points post seeding. For intracellular HBsAg levels, β -tubulin expression was detected in parallel as a control (**D**). One representative blot is shown. **F-G.** Intracellular (**F**) and extracellular (**G**) HDAg expression level from HuH7-2C8D cells assessed by Western blot. HuH7-2C8D cells were seeded, supernatants were harvested, and cell were lysed at the indicated time points post seeding. For intracellular HDAg levels, β -actin expression was detected in parallel as a control (**D**). One representative blot is shown. **H-J.** Iodixanol-based density gradient. Supernatant from HuH7-2C8 (**H**) and HuH7-2C8D (**I**) cells were concentrated with a 30% sucrose cushion and purified through a 10–45% iodixanol density gradient. Ten fractions were collected. HBsAg levels in each fraction were assessed by CLIA. Alternatively, total RNA was extracted and HDV RNA levels in each fraction were quantified by RT-qPCR. 200 μ L of each fraction were weighted to assess the density (**J**). One representative experiment out of three independent experiments is shown. *** $p < 0.001$.

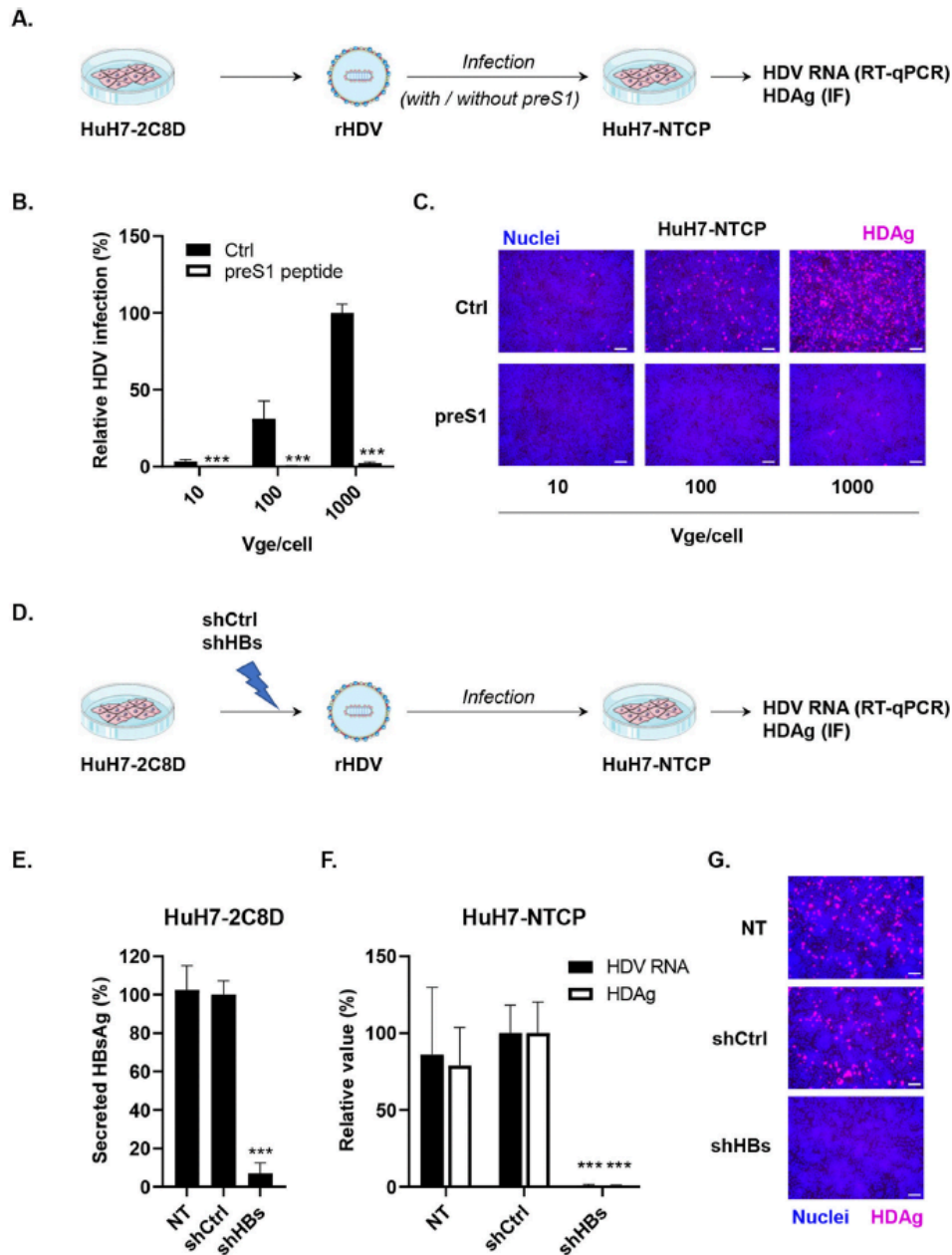


Fig. 2. Infection of HuH7-NTCP cells with HDV-containing supernatants from HuH7-2C8D cells. **A.** Experimental strategy. HuH7-2C8D cells were seeded and cultured in production medium. Supernatants were regularly harvested, pooled, and HDV RNA was quantified by RT-qPCR. **B–C.** HuH7-NTCP cells were seeded one day prior to incubation or not for 1h with preS1 peptide at 37 °C. HuH7-NTCP were then inoculated with HDV-containing supernatants at the indicated Vge/cell. HDV infection was assessed at 6 days post infection (dpi) by intracellular immunodetection of HDAg. The number of HDAg-positive cells was quantified using a plate cytometer (**B**). Results are expressed as means \pm SD % HDV infection compared to control HuH7-NTCP cells infected with HDV at 1000 Vge/cell (set at 100%) from three independent experiments ($n = 9$). Representative IF pictures for each condition are presented (**C**). scale bar: 100 μ m. **D–F.** Impact of shHBs expression on production of HDV infectious particles. HuH7-2C8D cells were seeded one day prior to transduction with shHBs- or shCtrl-expressing lentiviral vector. Cells were selected with puromycin and supernatants were harvested. shRNA efficacy was assessed by quantification of HBsAg by CLIA (**D**). Results are expressed as means \pm SD % HBsAg secretion compared to shCtrl-treated cells (set at 100%) from three independent experiments ($n = 10$). HuH7-NTCP cells were then inoculated with the supernatants at adjusted volume. HDV infection was assessed at 6 dpi by RT-qPCR quantification of HDV RNA (**E**). Results are expressed as means \pm SD % HDV RNA compared to HuH7-NTCP infected with supernatant from shCtrl-treated HuH7-2C8D cells (set at 100%) from three independent experiments ($n = 8$). Alternatively, infection was assessed by quantification of HDAg-positive cells by IF using a plate cytometer (**E–F**). Results are expressed as means \pm SD % HDAg-positive cells compared to HuH7-NTCP infected with supernatant from shCtrl-treated HuH7-2C8D cells (set at 100%) from three independent experiments ($n = 10$). Representative IF pictures are presented. NT: non transfected cells. scale bar: 100 μ m *** $p < 0.001$.

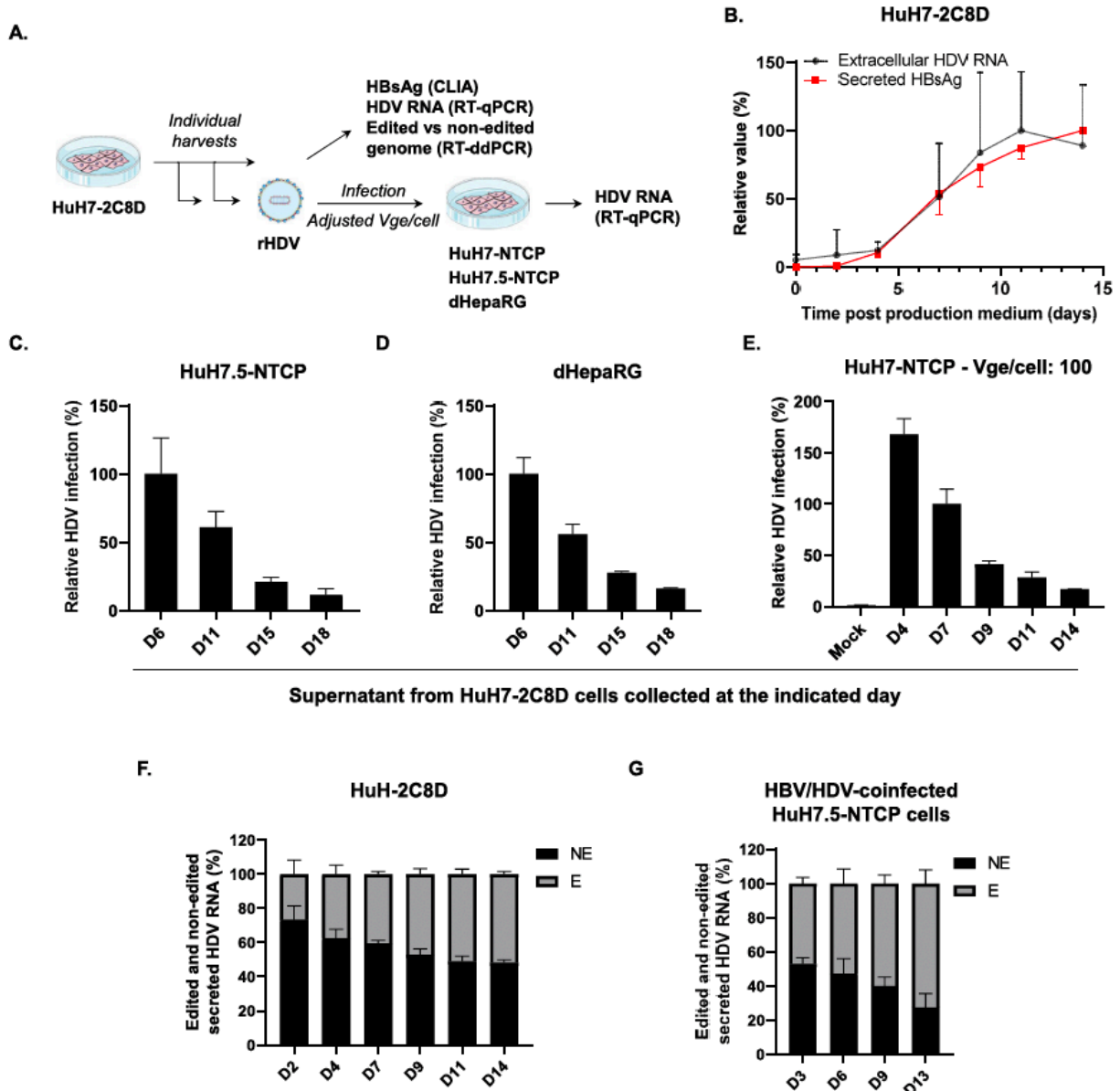


Fig. 3. Dynamic of HDV production in HuH7-2C8D cells. **A.** Experimental strategy. HuH7-2C8D cells were seeded three days prior to replacement by production medium. Supernatants were then regularly harvested and viral parameters were assessed (**B**). Results are expressed as means \pm SD % secreted HDV RNA compared to HDV RNA at day 11 (maximum, set at 100%) from three independent experiments ($n = 18$) and as means \pm SD % HBsAg levels compared HBsAg at day 14 (maximum, set at 100%) from three independent experiments ($n = 9$). Supernatants from the indicated time points were used to infect HuH7.5-NTCP (**C**), dHepaRG (**D**), or HuH7-NTCP (**E**) cells at an adjusted Vge/cell of 100. HDV infection was assessed at 6 dpi by quantification of intracellular HDV RNA by RT-qPCR. Results are expressed as means \pm SD % HDV RNA compared to cells infected with DMSO-treated supernatant (both set at 100%) from three independent experiments ($n = 9$). **F.** Supernatants used to infect HuH7-NTCP in (**E**) were subjected to RT-ddPCR method allowing the independent quantification of edited and non-edited version of HDV RNA. Results are expressed as fractions of edited (E) and non-edited (NE) HDV RNA from three independent experiments ($n = 9$). **G.** To confirm this results, supernatants from HBV/HDV-coinfected HuH7.5-NTCP cells were also were subjected to RT-ddPCR. Results are expressed as fractions of edited (E) and non-edited (NE) HDV RNA from one experiment ($n = 2$).

HuH7-2C8D cells but rather reflects the natural history of HDV particles secretion in a system that do not allow viral propagation and renewal of the initial viral matrix since we also observed an increase in the ratio between edited and non-edited HDV RNA secreted by HDV infected HuH7.5-NTCP (Fig. 3G). To circumvent this issue and produce highly

concentrated and infectious HDV inocula from HuH7-2C8D cells, we suggest to collect supernatants from HuH7-2C8D cells after 7 days of culture in production media. Indeed, although the virus production slightly decreases among passages, we showed a stable infectivity with such inocula produced from at least 5 consecutive passages of

HuH7-2C8D cells (Fig. 4).

3.4. HuH7-2C8D cells are a useful tool for studies of HDV-host interactions

We next investigated the possibility of using HuH7-2C8D cells for viral-host interactions studies. First, we confirmed the previously described (Haussecker et al., 2008) intracellular interaction between HDV and the cellular helicase MOV10 by co-IP assays (Fig. S4). Second, as HuH7-2C8 and HuH7-2C8D cells efficiently secrete HBsAg, we took advantage of these cells to analyze the interplay between HBsAg and macrophages which have been suggested to play a functional role in pathogenesis of liver disease. We previously showed that the presence of HBV modulates the secretion of cytokines, notably by decreasing IL-1 β secretion in macrophages, using a co-culture model of monocyte-derived macrophages (MDMs) and HepAD38 cells (Faure-Dupuy et al., 2019). More recently and using the same co-culture model, we associated the aforementioned modulations with HBsAg, as already suggested by others (Delphin et al., 2021; Wang et al., 2013; Zannetti et al., 2016). In order to validate this hypothesis using our new cellular model, HuH7, HuH7-2C8, and HuH7-2C8D cells were cultured during monocyte differentiation into M1-MDMs as illustrated in Fig. 5A. After stimulation of M1-MDMs with LPS, cytokine secretion was assessed by ELISA. As shown in Fig. 5B, co-culture of monocytes (during differentiation into

M1-MDMs) with HuH7-2C8 resulted in a decreased production of IL-6 and IL-1 β upon LPS stimulation. The same observation was made from HuH7-2C8D co-cultures (Fig. 5C). Taken together, we confirmed the ability of HBsAg in the presence of HDV virions to impair the secretion of cytokines from macrophages. Additionally, we confirmed the suitability of our cell culture system for the study of many steps of virus host-interactions.

3.5. FTI treatment decreases virion secretion and infectivity

Finally, we evaluated the ability of HuH7-2C8D cells to be a suitable model for the study of the mode of action of antivirals targeting HDV assembly and release. As FTIs, such as lonafarnib, have been shown to inhibit HDV assembly by impairing L-HDAg prenylation, we treated HuH7-2C8D cells with FTI-277 and assessed the viral parameters at different time points post treatment as well as the infectivity of the secreted particles (Fig. 6A). We observed an intracellular accumulation of HDV RNA upon FTI-277 treatment, as previously reported by several groups including ours (Alfaiate et al., 2016; Lempp et al., 2019; Sato et al., 2004; Verrier et al., 2022) (Fig. 6B). While secreted HBsAg levels were not affected by FTI-277, a robust decrease in secreted HDV RNA was observed (Fig. 6C) as expected. Recently, we demonstrated a second antiviral effect of FTI-277, by decreasing not only the number of secreted particles, but also the infectivity of the remaining virions that

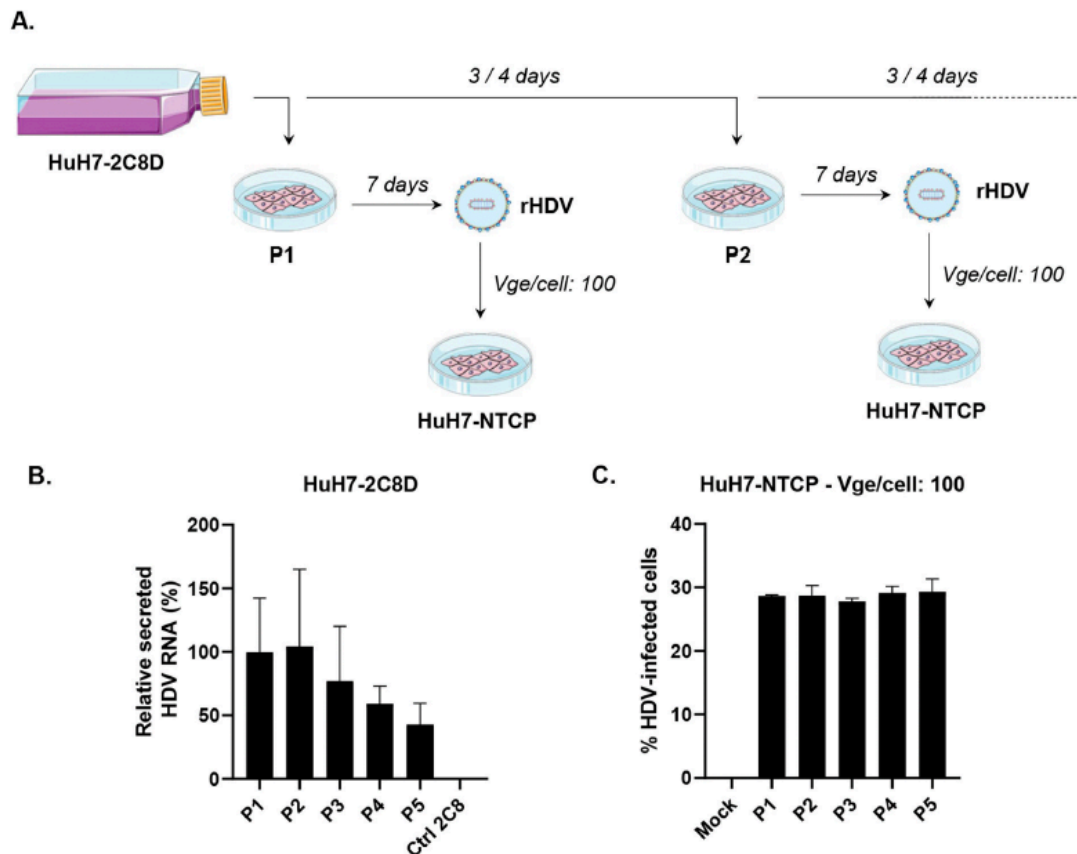


Fig. 4. Dynamic of HDV production upon successive passages of HuH7-2C8D cells. A. Experimental design. HuH7-2C8D cells cultured in culture medium were plated at each passage (P), every 3-4 days, and cultured in production medium. Seven days after plating, supernatants were harvested and secreted HDV RNA was assessed by RT-qPCR. 5 successive passages were studied. Results are expressed as means \pm SD % secreted HDV RNA compared to the first plating (P1, set at 100%) from three independent experiments (n = 9). A supernatant from HuH7-2C8 cells, not expressing the HDV genome, was used as a control (n = 3). C. Supernatants from each passage were used to infect HuH7-NTCP cells at an adjusted Vge/cell of 100. HDV infection was assessed 6 dpi by quantification of HDV-positive cells by IF. Results are expressed as means \pm SD % HDV-infected cells from one experiment (n = 3).

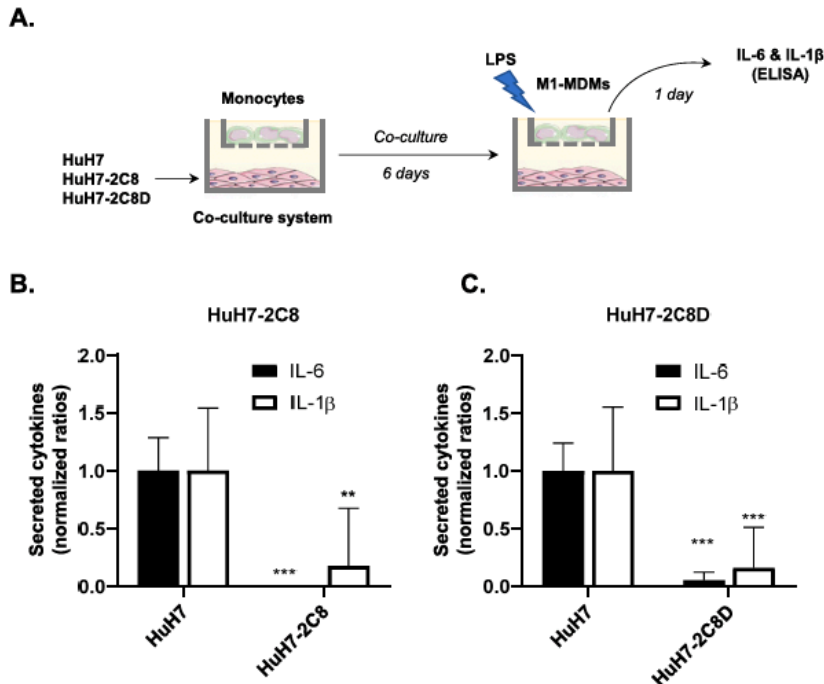


Fig. 5. HBsAg secretion inhibits cytokine secretion by macrophages. **A.** Experimental strategy. HuH7, HuH7-2C8, and HuH7-2C8D cells were co-cultured with monocytes, which were differentiated in M1-MDMs for 6 days using GM-CSF. M1-MDMs were then stimulated with LPS and cytokine secretion was assessed by ELISA 24h later. **(B-C).** Results are expressed as means \pm SD ratio IL-6 and IL-1 β secretion levels normalized to HuH7 conditions (control condition, set at 1) from two independent experiments (**B**, $n = 8$) and four independent experiments (**C**, $n = 16$, including 8 control points similar to **B**). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

are produced upon antiviral treatment (Verrier et al., 2022). To validate this hypothesis, HuH7-2C8D cells were seeded one day prior to treatment with FTI-277 for 9 days. An expected significant decrease in secreted HDV RNA levels was observed compared to DMSO-treated cells (Fig. 6D) in absence of any effect on HBsAg levels (Fig. 6E) and cell viability (Fig. S5A). Supernatants from both conditions were then used to infect naive HuH7-NTCP cells at an adjusted Vge/cell of 100. As shown in Fig. 6E, a marked decrease in virus infection was observed in cells infected with FTI-277-treated supernatants, demonstrating a strong reduction of virion infectivity upon FTI treatment. Of note, we excluded that the observed decrease in infectivity might be due to mis-quantification of our viral inocula since we obtained linear quantifications (Fig. S5B). Interestingly, we validated this result using lonafarnib, which seems more efficient than FTI-277 at inhibiting L-HDAg-mediated viral secretion (Fig. 6F). A similar decrease in virion infectivity in lonafarnib-treated cells compared to FTI-277 was observed at a low MOI of 25 Vge/cell (Fig. 6G). Taken together, our results validated the HuH7-2C8D cell line as a suitable model for the study of virion assembly and release as well as the screening of antivirals, and confirmed the dual antiviral activity of FTI on HDV infection.

4. Discussion

Chronic hepatitis D is the most severe form of chronic viral hepatitis associated with liver disease progression to liver failure and hepatocellular carcinoma. Efficient and safe therapies curing HDV infection and leading to an improvement of patients' outcome are needed. In this context, a comprehensive characterization of HDV-host interactions is required for the characterization of new antiviral targets. Importantly, HDV assembly and release are still poorly understood. Here, we propose a novel stable cell line allowing both the production of large scale of viral particles and the study of critical steps of the life cycle, including replication, interactions with cellular partners, viral assembly and release. Notably, we demonstrated the value of our model for the study of interplay between HDV-infected hepatic cells and macrophages

(without cell contact), by confirming the ability of HBsAg to inhibit the secretion of IL-1 β and IL-6 by macrophages. Interestingly, HuH7-2C8D cells allow the production of highly concentrated HDV inocula at around 10^9 Vge/mL that can even reach 10^{10} vge/mL after PEG precipitation. 1 mL of such a virus stock can be used to infect up to 10^4 wells of susceptible cells from 96-well plates, considering 10^4 cells/well and a multiplicity of infection of 100 Vge/cell. This study further advances HDV infection and production models (Lempp et al., 2019; Ni et al., 2019; Verrier et al., 2016a, 2020; Yan et al., 2012) by providing a source of highly infectious HDV particles suitable for high-throughput mechanistic studies and discovery of host-dependency factors and novel antivirals. Of note, the HuH7-END cell line was recently developed with a similar strategy but including in addition the expression of the HDV receptor NTCP (Ni et al., 2019). We report here a higher range of HDV particle production in HuH7-2C8D than the one reported in HuH7-END. However, since quantification of HDV copy numbers could be dramatically different between laboratories (Le Gal et al., 2016), the two cell lines should be compared side-by-side regarding virus production to draw any further conclusions. Importantly, HuH7 cell line seems to be particularly adapted to the production of HDV-replicating cells, probably because no activation of the innate immunity, usually triggered by the sensing of the HDV genome by MDA5, is observed in this cell line (Zhang et al., 2018).

When applied to study key aspects of the HDV life cycle, HuH7-2C8D cells allowed to confirm the dual antiviral activity of FTIs on HDV infection. FTIs including lonafarnib, currently evaluated in clinical trial, are known to inhibit L-HDAg prenylation and thus the production of HDV virions. By inhibiting L-HDAg prenylation, FTIs also impair the ability of L-HDAg to inhibit viral replication (Sato et al., 2004). As a consequence, FTI treatment leads to an temporary accumulation of intracellular RNA as previously described (Alfaiate et al., 2016; Lempp et al., 2019; Sato et al., 2004; Verrier et al., 2022) and confirmed in this study, although the pool of HDV RNA is eventually decreasing even in presence of FTI (Fig. 6B). As ADAR constantly edits the antigenome throughout the replication, this accumulation affects more and more

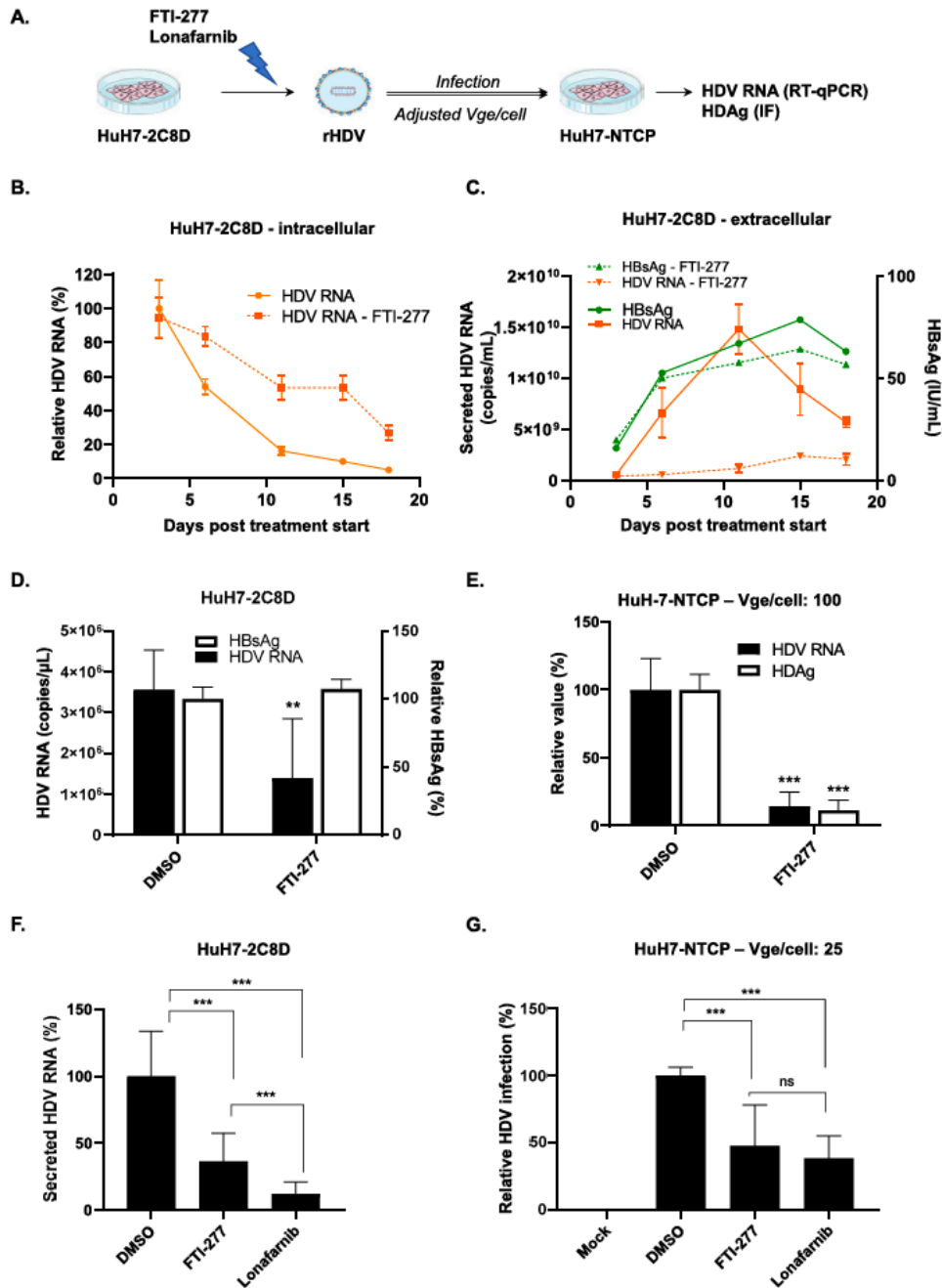


Fig. 6. FTI treatment inhibits virus production and infectivity. **A.** Experimental strategy. HuH7-2C8D cells were seeded three days prior to treatment with FTI-277 at 10 μ M. Supernatants were harvested, cells were lysed at different time points, and viral parameters were assessed. Intracellular HDV RNA was assessed by RT-qPCR (**B**). Results are expressed as means \pm SD % HDV RNA compared to HDV RNA in control cells at day 3 post treatment start (set at 100%) from one experiment ($n = 4$). Extracellular HDV RNA and HBsAg were assessed by RT-qPCR and CLIA, respectively (**C**). Results are expressed as means \pm SD secreted HDV RNA copies/ μ L ($n = 2$) and as HBsAg concentration (IU/mL, one experiment is shown). **D-E.** FTI-277 affects virion infectivity. HuH7-2C8D cells were seeded one day prior to treatment with FTI-277 at 10 μ M or with DMSO as a control for 9 days. Supernatants were harvested and viral parameters were assessed (**D**). Results are expressed as means \pm SD secreted HDV RNA copies/ μ L from three independent experiments ($n = 9$) and as % HBsAg levels compared to DMSO-treated cells (set at 100%) from three independent experiments ($n = 9$). HuH7-NTCP cells were then infected with the supernatants from DMSO- and FTI-277-treated cells at 100 Vge/cell (**E**). HDV infection was assessed at 6 dpi by quantification of intracellular HDV RNA by RT-qPCR and HDsAg-positive cells using a plate cytometer. Results are expressed as means \pm SD % HDV RNA or as % HDsAg-positive cells compared to cells infected with DMSO-treated supernatant (both set at 100%) from three independent experiments ($n = 9$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

edited versions of HDV RNA. Recently, we demonstrated that this modulation of edited/non-edited ratio was associated to a loss of infectivity of HDV particles, probably because particles packaging an edited version of the genome are unable to trigger viral replication (Verrier et al., 2022). Here, we confirmed this result, exemplifying the usefulness of our cell line to characterize the mechanism of action of antiviral molecules. Moreover, we observed that, even in absence of treatment, the modulation of edited versus non-edited ratio is associated with a decrease in the infectivity of viral particles that are produced. This observation reinforces the hypothesis of the inability of edited genome-containing HDV particles to infect naive cells due to the lack of S-HDAg expression. Importantly, the infectivity drop is more pronounced than the increase in edited genome fraction in the supernatant, suggesting that a complex process putatively involving other mechanisms explains the loss of infectivity of viral particles with time. Notably, although it has been demonstrated that L-HDAg inhibits the synthesis of HDV antigenome only when present in large excess (Modahl and Lai, 2000), we cannot exclude that cells may be infected by multiple viruses, leading to an inhibition of HDV replication by the L-HDAg coding genomes, which become predominant with time (Fig. 3F).

In conclusion, we established a stable cell line enabling the production of large quantities of viral particles for high-throughput studies in infection models. To date, recombinant HDV production relies on co-transfection of cells with HBsAg-encoding plasmid and HDV-encoding plasmid (Sureau et al., 1994). The HuH7-2C8D cell line provides a fast and convenient method to produce virus, overcoming the costs and time issues with transient transfection methods. Moreover, as an immortalized cell line, HuH7-2C8D cells should be suitable for high-throughput small molecule and genetic screens for the characterization of host factors involved in HDV replication, assembly and release, that would be complementary to the existing datasets characterizing HDV replication in mono-infection models (in absence of HBsAg) (for instance (Verrier et al., 2020)). Taken together, this will improve our understanding of HDV molecular virology.

Author contributions

F.P, T.F.B and E.R.V. initiated the study. E.R.V. supervised research. C.B. produced the cell lines. C.B., J.L., M.D., L.H., M.J.H., C.P., and K.G. characterized the cell lines and performed the validation experiments. J. L. performed the RT-ddPCR experiments. M.D. performed the co-culture experiments. C.B., J.L., M.D., E.S., L.H., M.J.H., C.P., C.S., D.D., F.P., T.F. B., and E.L.V. analyzed the data. E.R.V. wrote the manuscript and J.L., M.D., E.S., F.P., D.D., and T.F.B. reviewed it. All the authors approved the manuscript. C.B. and J.L. equally contributed to this study as first author.

Funding

This work of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021–2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), and by SFRI-STRAT'US project (ANR 20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. E.R.V. acknowledges fundings from Inserm, the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS, grant number ECTZ171594), and the French National Research Agency (ANR, grant number ANR-21-CE15-0035-01 DELTARget). J.L. acknowledges fundings from Inserm, CNRS, University of Lyon, and ANRS (grant number ECTZ172540). T. F. B. and E. R. V. received funding from Janssen Pharmaceutica as part of the VLAIO project ABDeCo (HBC.2017.0895). T. F. B. acknowledges funding from the European Union (EU ERC-AdG-2014-HEPCIR #671231 and ARC TheraHCC2.0 IHU201901299).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: T. F. B. and E. R. V. received funding from Janssen Pharmaceutica as part of the VLAIO project ABDeCo (HBC.2017.0895). E.S. and F.P. are employees of Janssen Research and Development and may be Johnson & Johnson stockholders.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank Professor Stephan Urban (University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany) and Doctor John Taylor (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) for having kindly provided the pLX304-HB2.7 and pSVLD3 plasmids, respectively. We thank Professor Fabien Zoulim and Doctor Barbara Testoni (CRCL, Lyon, France) for the use of the ddPCR device. We acknowledge Emilie Crouchet (Inserm UMR_S1110, Strasbourg, France) for excellent technical support, and Anne Zeter (Inserm UMR_S1110, Strasbourg, France) and Annie Tu (SATT Conectus Alsace, Illkirch, France) for excellent administrative support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105477>.

References

- Alfaiaite, D., Lucifora, J., Abeywickrama-Samarakoon, N., Michelet, M., Testoni, B., Cortay, J.C., Sureau, C., Zoulim, F., Deny, P., Durantel, D., 2016. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antivir. Res.* 136, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.006>.
- Chen, P.J., Kuo, M.Y., Chen, M.L., Tu, S.J., Chiu, M.N., Wu, H.L., Hou, H.C., Chen, D.S., 1990. Continuous expression and replication of the hepatitis delta virus genome in Hep G2 hepatoblastoma cells transfected with cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5253–5257. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5253>.
- Delphin, M., Faure-Dupuy, S., Isorce, N., Rivoire, M., Salvetti, A., Durantel, D., Lucifora, J., 2021. Inhibitory effect of IL-1beta on HBV and HDV replication and HBs antigen-dependent modulation of its secretion by macrophages. *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14010065>.
- Eller, C., Heydmann, L., Colpitts, C.C., El Saghire, H., Piccioni, F., Juhling, F., Majzoub, K., Pons, C., Bach, C., Lucifora, J., et al., 2020. A genome-wide gain-of-function screen identifies CDKN2C as a HBV host factor. *Nat. Commun.* 11, 2707. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16517-w>.
- Faure-Dupuy, S., Delphin, M., Aillot, L., Dimier, L., Lebosse, F., Fresquet, J., Parent, R., Matter, M.S., Rivoire, M., Bendriès-Vermare, N., et al., 2019. Hepatitis B virus-induced modulation of liver macrophage function promotes hepatocyte infection. *J. Hepatol.* 71, 1086–1098. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.032>.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Canic, 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, 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>.
- Haussecker, D., Cao, D., Huang, Y., Parameswaran, P., Fire, A.Z., Kay, M.A., 2008. Capped small RNAs and MOV10 in human hepatitis delta virus replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 714–721. <https://doi.org/10.1038/nmsb.1440>.
- Herrocher, C., Pastor, F., Burlaud-Gaillard, J., Dumans, A., Seigneuret, F., Moreau, A., Patient, R., Eymieux, S., de Rocquigny, H., Hourieux, C., et al., 2020a. Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol.* 22, e13205 <https://doi.org/10.1111/cmi.13205>.
- Herrscher, C., Roingeard, P., Blanchard, E., 2020b. Hepatitis B virus entry into cells. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9061486>.
- Heuschkel, M.J., Baumert, T.F., Verrier, E.R., 2021. Cell culture models for the study of hepatitis D virus entry and infection. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13081532>.

- Le Gal, F., Brichtler, S., Sahli, R., Chevreton, S., Gordien, E., 2016. First international external quality assessment for hepatitis delta virus RNA quantification in plasma. *Hepatology* 64, 1483–1494. <https://doi.org/10.1002/hep.28772>.
- Lebosse, F., Inchauspe, A., Locatelli, M., Miaglia, C., Diederichs, A., Fresquet, J., Chapus, F., Hamed, K., Testoni, B., Zoulim, F., 2020. Quantification and epigenetic evaluation of the residual pool of hepatitis B covalently closed circular DNA in long-term nucleoside analogue-treated patients. *Sci. Rep.* 10, 21097 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78001-1>.
- Lempp, F.A., Schlund, F., Rieble, L., Nussbaum, L., Link, C., Zhang, Z., Ni, Y., Urban, S., 2019. Recapitulation of HDV infection in a fully permissive hepatoma cell line allows efficient drug evaluation. *Nat. Commun.* 10, 2265. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10211-2>.
- Lucifora, J., Delphin, M., 2020. Current knowledge on hepatitis delta virus replication. *Antivir. Res.* 179, 104812 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104812>.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M., Gorke, S., et al., 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 17, 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm.2341>.
- Modahl, L.E., Lai, M.M., 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, 7375–7380. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.16.7375-7380.2000>.
- Ni, Y., Lempp, F.A., Mehrle, S., Nkongo, S., Kaufman, C., Falth, M., Stindt, J., Koniger, C., Nassal, M., Kubitz, R., et al., 2014. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146, 1070–1083. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.024>.
- Ni, Y., Zhang, Z., Engelskircher, L., Verch, G., Tu, T., Lempp, F.A., Urban, S., 2019. Generation and characterization of a stable cell line persistently replicating and secreting the human hepatitis delta virus. *Sci. Rep.* 9, 10021 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46493-1>.
- Sato, S., Comillez-Ty, C., Lazinski, D.W., 2004. By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression. *J. Virol.* 78, 8120–8134. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8120-8134.2004>.
- Schulze, A., Gripon, P., Urban, S., 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46, 1759–1768. <https://doi.org/10.1002/hep.21896>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.6.4063-4066.1994>.
- Sureau, C., Negro, F., 2016. The hepatitis delta virus: replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* 64, S102–S116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>.
- Turon-Lagot, V., Saviano, A., Schuster, C., Baumert, T.F., Verrier, E.R., 2020. Targeting the host for new therapeutic perspectives in hepatitis D. *J. Clin. Med.* 9, 222. <https://doi.org/10.3390/jcm9010222>.
- Urban, S., Neumann-Haefelin, C., Lampertico, P., 2021. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut* 70, 1782–1794. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323888>.
- Verrier, E.R., Colpitta, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S.C., Habersetzer, F., Durantel, D., Abou-Jaoude, G., et al., 2016a. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* 63, 35–48. <https://doi.org/10.1002/hep.28013>.
- Verrier, E.R., Colpitta, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Zona, L., Xiao, F., Thumann, C., Crouchet, E., Gaudin, R., Sureau, C., et al., 2016b. Solute carrier NTCP regulates innate antiviral immune responses targeting hepatitis C virus infection of hepatocytes. *Cell Rep.* 17, 1357–1368. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.084>.
- Verrier, E.R., Salvetti, A., Pons, C., Michelet, M., Rivoire, M., Baumert, T.F., Durantel, D., Lucifora, J., 2022. Loss of hepatitis D virus infectivity upon farnesyl transferase inhibitor treatment associates with increasing RNA editing rates revealed by a new RT-ddPCR method. *Antivir. Res.* 198, 105250 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105250>.
- Verrier, E.R., Weiss, A., Bach, C., Heydmann, L., Turon-Lagot, V., Kopp, A., El Saghire, H., Crouchet, E., Pessaux, P., Garcia, T., et al., 2020. Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* 69, 158–167. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317065>.
- Wang, S., Chen, Z., Hu, C., Qian, F., Cheng, Y., Wu, M., Shi, B., Chen, J., Hu, Y., Yuan, Z., 2013. Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J. Immunol.* 190, 5142–5151. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201625>.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al., 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1, e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>.
- Zanetti, C., Roblot, G., Charrier, E., Ainouze, M., Tout, I., Briat, F., Isorce, N., Faure-Dupuy, S., Michelet, M., Marotel, M., et al., 2016. Characterization of the inflammasome in human kupffer cells in response to synthetic agonists and pathogens. *J. Immunol.* 197, 356–367. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502301>.
- Zhang, Z., Filzmayr, C., Ni, Y., Sultmann, H., Mutz, P., Hiet, M.S., Vondran, F.W.R., Bartenschlager, R., Urban, S., 2018. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN-beta/lambda responses in hepatocytes. *J. Hepatol.* 69, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.021>.

Annexe 2

Cell-based cccDNA reporter assay combined with functional genomics identifies YBX1 as HBV cccDNA host factor and antiviral candidate target

Verrier ER, Ligat G, Heydmann L, Doernbrack K, Miller J, Maglott-Roth A, Jühling F, El Saghire H, [Heuschkel MJ](#), Fujiwara N, Hsieh SY, Hoshida Y, Root DE, Felli E, Pessaux P, Mukherji A, Mailly L, Schuster C, Brino L, Nassal M, Baumert TF

Étude publiée dans *Gut*, Décembre 2022 (72(9):1745-1757)



OPEN ACCESS

Original research

Cell-based cccDNA reporter assay combined with functional genomics identifies YBX1 as HBV cccDNA host factor and antiviral candidate target

Eloi R Verrier,¹ Gaëtan Ligat ,¹ Laura Heydmann,¹ Katharina Doernbrack,² Julija Miller,² Anne Maglott-Roth,³ Frank Jühling,¹ Houssein El Saghire,¹ Margaux J Heuschkel,¹ Naoto Fujiwara ,⁴ Sen-Yung Hsieh,⁵ Yujin Hoshida,⁴ David E Root,⁶ Emanuele Felli,^{1,7} Patrick Pessaux,^{1,7} Atish Mukherji,¹ Laurent Mailly,¹ Catherine Schuster ,¹ Laurent Brino,³ Michael Nassal ,² Thomas F. Baumert ^{1,7}

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323665>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Prof. Thomas F. Baumert and Dr Eloi R Verrier, Strasbourg, France; Thomas.Baumert@unistra.fr, e.verrier@unistra.fr and Professor Michael Nassal, Freiburg, Germany; michael.nassal@uniklinik-freiburg.de

ERV and GL are joint first authors.

MN and TFB are joint senior authors.

Received 19 November 2020
Accepted 24 November 2022
Published Online First
9 December 2022



► <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2022-329185>



© Author(s) (or their employer(s)) 2023. Re-use permitted under CC BY. Published by BMJ.

To cite: Verrier ER, Ligat G, Heydmann L, et al. *Gut* 2023;**72**:1745–1757.

ABSTRACT

Objectives Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a leading cause of liver disease and hepatocellular carcinoma. A key feature of HBV replication is the synthesis of the covalently close circular (ccc)DNA, not targeted by current treatments and whose elimination would be crucial for viral cure. To date, little is known about cccDNA formation. One major challenge to address this urgent question is the absence of robust models for the study of cccDNA biology.

Design We established a cell-based HBV cccDNA reporter assay and performed a loss-of-function screen targeting 239 genes encoding the human DNA damage response machinery.

Results Overcoming the limitations of current models, the reporter assay enables to quantify cccDNA levels using a robust ELISA as a readout. A loss-of-function screen identified 27 candidate cccDNA host factors, including Y box binding protein 1 (YBX1), a DNA binding protein regulating transcription and translation. Validation studies in authentic infection models revealed a robust decrease in HBV cccDNA levels following silencing, providing proof-of-concept for the importance of YBX1 in the early steps of the HBV life cycle. In patients, YBX1 expression robustly correlates with both HBV load and liver disease progression.

Conclusion Our cell-based reporter assay enables the discovery of HBV cccDNA host factors including YBX1 and is suitable for the characterisation of cccDNA-related host factors, antiviral targets and compounds.

INTRODUCTION

Chronic infection by hepatitis B virus (HBV) is a major cause of advanced liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC), the second-leading cause of cancer death worldwide.¹ Despite the availability of an effective prophylactic vaccine, an estimated 250 million people worldwide are chronic virus carriers.² While nucleos(t)ide analogues (such as tenofovir or entecavir) have been proven to effectively control HBV infection by suppression of viral replication, treatment is lifelong and viral cure remains extremely rare. PEG-IFN- α -based therapies can result in viral cure in a small subset of

WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

- ⇒ Antiviral therapeutic strategies can control hepatitis B virus (HBV) infection, but viral cure is rarely observed.
- ⇒ Current antiviral therapies do not eliminate covalently close circular (ccc)DNA, HBV's persistence reservoir.
- ⇒ Knowledge about cccDNA formation and its host-dependency factors is limited.
- ⇒ DNA repair factors are expected to play a central role in cccDNA formation.

WHAT THIS STUDY ADDS

- ⇒ A cell-based reporter assay allows simple and robust quantification of cccDNA by ELISA.
- ⇒ The assay enables discovery of HBV cccDNA host factors.
- ⇒ A loss-of-function screen identified YBX1 as a previously undiscovered cccDNA-related HBV host factor that directly interacts with HBV DNA.
- ⇒ Silencing of YBX1 expression impairs HBV infection.
- ⇒ Gene expression analyses in patients suggest an association between YBX1 and virus-induced liver disease and cancer.

HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

- ⇒ The cell-based cccDNA reporter assay will enable to discover urgently needed targets for viral cure in patients.

patients; however, these therapies are limited by a low response rate and significant side effects.³

HBV belongs to the *Hepadnaviridae* family, small enveloped retrotranscribing DNA viruses.⁴ In infectious virions the genome is present as a 3.2 kb relaxed circular (rc) DNA in which one strand is covalently linked to the viral polymerase.⁵ Following entry into hepatocytes through heparan-sulfate proteoglycan and the liver-specific sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) as high affinity receptor,⁶ the nucleocapsid transports

the rcDNA to the nuclear pore for release into the nucleus. There, rcDNA is converted into an episomal covalently close circular (ccc)DNA minichromosome that serves as a template for all viral transcripts including pregenomic (pg) RNA,⁷ which is encapsidated and reverse transcribed into new rcDNA. The rcDNA-containing nucleocapsids can be enveloped and released as virions or be recycled to the nucleus to replenish the cccDNA pool.⁸ Hence cccDNA formation is key to HBV persistence.⁷ A few cccDNA copies per liver cell can reactivate full virus production on therapy withdrawal, or on loss of immunological control over the low-level replication likely going on even under therapy. Any true cure of chronic HBV infection will require elimination of cccDNA.⁷

To date, the molecular basis of rcDNA to cccDNA conversion is poorly understood, largely due to the historic lack of feasible *in vitro* infection systems in which virus production is strictly dependent on cccDNA. Conceptual clues on the mechanism governing cccDNA formation come from the structural differences between the two DNAs. Accordingly, conversion comprises multiple steps, such as the release of the polymerase, trimming/fill-in of the DNA-strands, and eventually ligation. Given HBV's minimal coding capacity, the underlying activities are likely to come from the host cell, in particular the DNA repair machinery, a network of ~250 factors evolved to fix any deviation from a perfect double-stranded structure.⁷ Based on this premise several recent studies unravelled the involvement of DNA repair factors in cccDNA formation. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2) was shown to be capable of releasing the bound polymerase from HBV and duck HBV (DHBV) rcDNA.⁹ A DNA polymerase-targeted siRNA screen identified DNA polymerase K (POLK), a gamma-family DNA polymerase, as a key contributor to the completion of the positive strand for the conversion of deproteinised (DP-) rcDNA into cccDNA.¹⁰ Flap endonuclease 1 (FEN1) has been shown to bind and cleave the 5'-flap structure of HBV rcDNA *in vitro* to promote cccDNA formation,¹¹ possibly representing an alternative, nucleolytic pathway towards DP-rcDNA. Most recently, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), replication factor C complex, DNA polymerase δ (POLD), FEN-1 plus DNA ligase 1 (LIG1) were found as the minimal host factor set for *in vitro* conversion of rcDNA-like molecules into cccDNA forms.¹² However, the redundancies in the DNA repair machinery and even more the complex environment of an intact cell, including intracellular trafficking and metabolic turnover of the viral components, imply that cccDNA formation *in vivo* involves numerous additional host factors. Their identification will be crucial for a comprehensive understanding of HBV persistence as well the definition of new antiviral targets as a basis for a cure for chronic HBV infection; given their fundamental role in cellular DNA replication and apparent lack of HBV specificity the five minimally required already identified host factors are unlikely to make such targets.

In spite of the development of recent cell culture infection systems for HBV, a major limitation for the investigation of cccDNA formation is the limited number of cccDNA copies in infected cells.¹³ Moreover, cccDNA quantification by qPCR is still not finally standardised while Southern blotting, which allows for unambiguous distinction of cccDNA from all other viral DNA forms, is an intrinsically insensitive method.¹³ Hence, aiming to characterise novel cccDNA-related host factors we established in this study a novel cccDNA reporter cell line based on the >20fold higher cccDNA copy numbers produced by

DHBV in human HepG2 hepatoma cells.⁸ Applying to this cell line a loss-of-function screening strategy using an shRNA library targeting the DNA repair machinery and subsequent validation in HBV infection models we uncover YBX1 as a new cccDNA-related HBV host factor.

RESULTS

A robust cell-based reporter assay models cccDNA formation using a simple ELISA-based readout for cccDNA quantification

To address the limitations of detection of low abundance of cccDNA for functional genomics, we established a cell-based cccDNA reporter assay (figure 1A), which enables the non-invasive monitoring of cccDNA through a simple and robustly quantifiable ELISA for the cccDNA-dependent generation of a secreted, haemagglutinin (HA) tagged viral antigen in a stable HepG2 cell line, termed HA2/3. One key feature to achieve robust cccDNA levels in this model is the use of an envelope-deficient DHBV genome which can boost cccDNA copy numbers per cell to >100 in avian yet also in human hepatoma cells.⁸ In a first approach, an expression cassette wherein pgRNA transcription is controlled by a tetracycline (Tet) Response-Element (TRE) promoter was integrated into HepG2.TA2-7 cells¹⁴ which stably express a Tet-transactivator (tTA); the tTA binds to and activates the TRE promoter only in the absence of Tet or its analogue doxycyclin (Dox). Hence Dox withdrawal from the culture medium induces pgRNA transcription. Owing to its dual function as mRNA for core protein (HBcAg for HBV, DHBcAg for DHBV) and polymerase and as substrate for reverse transcription into rcDNA this is sufficient to initiate intracellular replication. If cccDNA is formed from the rcDNA, pgRNA transcription comes under control of the authentic viral core promoter which, different from the TRE promoter, produces an additional, 5' extended transcript, the precore RNA (see figure 1A-C); this enables synthesis of the N terminally extended precore protein, precursor of the processed, secretory e antigen (HBeAg for HBV, DHBeAg for DHBV). Hence specific detection of eAg would indicate prior cccDNA formation, as previously proposed.¹⁵ It is well established that HBcAg and HBeAg share largely identical primary sequences but adopt different three-dimensional structures.^{16,17} Their serological discrimination relies largely on inaccessibility of epitopes in the assembled capsid and the scarcity of free capsids in serum, owing to immune complex formation. As this does not hold in cell culture, the naked HBV capsids known to be released from the cells,¹⁸ especially when damaged, can mock the presence of HBeAg. Via side-by-side expression of HBV core and precore protein we demonstrated that this is as well an issue with DHBV since DHBcAg accumulated to comparable amounts in the culture supernatant as the glycosylated and non-glycosylated forms of DHBeAg (figure 2A). Hence, DHBeAg could only serve as surrogate marker for cccDNA if strictly DHBeAg-specific antibodies were available which they are not.

We, therefore, sought to introduce a tag into the preC sequence such that it is exclusively expressed as part of the precore protein, does not interfere with secretion, and remains on DHBeAg on processing. Two constructs with a HA tag inserted shortly upstream of the core open reading frame (DpCHA1, DpCHA2) met these criteria, as shown by the secretion of glycosylated, anti-HA detectable proteins of the expected size (figure 2A). An important concern was the overlap on the pgRNA level of the preC coding region with the D ϵ RNA stem-loop that acts as encapsidation signal and

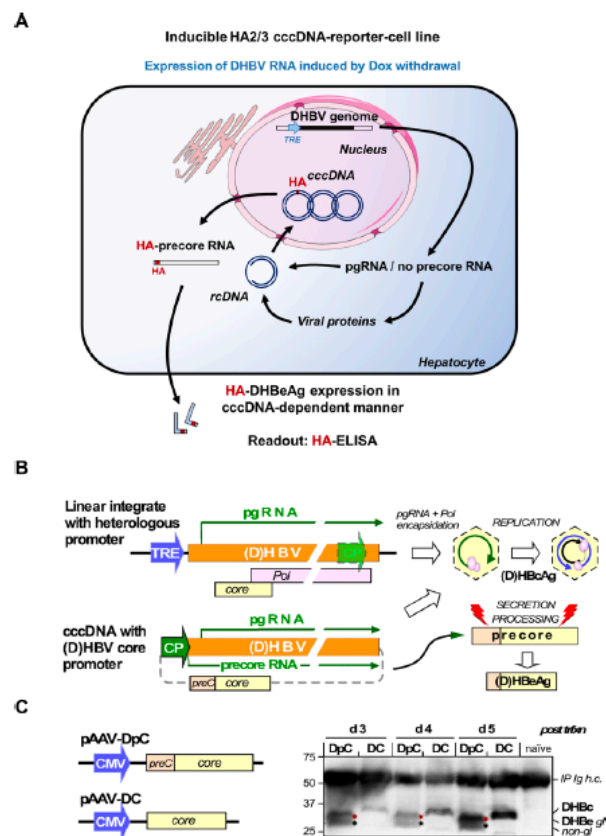


Figure 1 Use of secreted wild-type DHBcAg as non-invasive surrogate marker for cccDNA is frustrated by cellular release of DHBcAg. (A) Cartoon of the Tet-controlled HepG2 cell line expressing a modified full-length DHBV genome (with pgRNA expression under control of the Tet-responsive TRE promoter). Cells start producing DHBV RNA after removal of doxycycline (Dox) from the culture medium. Expression of the DHBV envelope protein L is prevented by a premature stop codon. The cells synthesise no precore RNA whose start site would lie upstream of the start site defined by the TRE promoter. After pgRNA reverse transcription into DNA, DHBV DNA is recycled in the nucleus leading to the formation of cccDNA, which will serve as an additional template for viral transcription generating precore RNA and DHBV HBeAg (DHBcAg). Consequently, in this model, DHBcAg is a direct marker for cccDNA activity. In addition, a HA-tag encoding sequence was inserted into the precore region, before the start of the core ORF, leading to the production of a HA-tagged DHBcAg. (B) Assay principle. As mRNA for core protein and polymerase, and as substrate for reverse transcription pgRNA is sufficient to initiate hepadnaviral replication. Transcription of pgRNA from the authentic core promoter (CP) on cccDNA can be substituted by a heterologous promoter (eg, a Tet responsive TRE promoter) in front of a linear (D) HBV genome integrated into a plasmid or host chromosome. In this way no precore RNA and hence neither precore protein nor its processing product (D) HBeAg are generated (top). On circular cccDNA, the CP promoter controls pgRNA plus precore RNA transcription, supporting replication and (D) HBeAg synthesis (bottom). (C) Release of DHBcAg from cells obscures specific detection of DHBcAg. To mimic the translation products of pgRNA and precore RNA the ORFs for DHBV core (DC) and precore (DpC) proteins were expressed in transfected HepG2 cells from CMV promoter controlled pAAV vectors (left). Products in the culture supernatants were enriched by immunoprecipitation with a polyclonal anti-DHBc/e antiserum on days 3, 4 and 5 post-transfection and analysed by Western blotting. The DpC vectors produced a double band at about 27 and 30 kDa, as expected for non-glycosylated (non-gly, black stars) and glycosylated (gly, red stars) DHBcAg from DHBV16; clearly, however, also the DC vectors generated a specific band at about 30 kDa, as expected for DHBV core protein. Hence as reported for HBV,¹⁹ also the core protein from DHBV can be released from cells, likely as non-enveloped capsids. Hence in the absence of a truly preC specific antibody the presence of DHBcAg prevents unambiguous detection of DHBcAg in an ELISA format, ablating the cccDNA dependency of the assay. Specificity can be regained by selective tagging of DHBcAg (see figure 2). cccDNA, covalently close circular DNA; CMV, cytomegalovirus; DHBV, duck hepatitis B virus; IP Ig h.c., heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation.

replication origin for first-strand DNA synthesis; however, both constructs supported formation of wild-type like rc- and double-strand linear DNA (figure 2B) when part of the full DHBV genome in expression vector pCD16_{env}. We therefore transfected an analogous TRE-promoter controlled DpCHA2 construct into HepG2.TA2-7 cells and, after evaluating various cell clones for cccDNA formation and HAeAg secretion, chose clone HA2/3 for all further experiments. Clonality of the cell line as well as efficient

Dox regulation are supported by nearly all cells showing intracellular DHBcAg staining in the absence and very few cells staining positive in the presence of Dox. As shown in figure 2C, the accumulation of nuclear cccDNA around day 10 postinduction by Dox withdrawal was clearly reflected by a steep increase in HA signal intensity in the culture supernatant (monitored by a sandwich ELISA using a chromogenic substrate), attesting to secretion of HA-tagged DHBcAg as a valid surrogate marker for cccDNA formation. Furthermore,

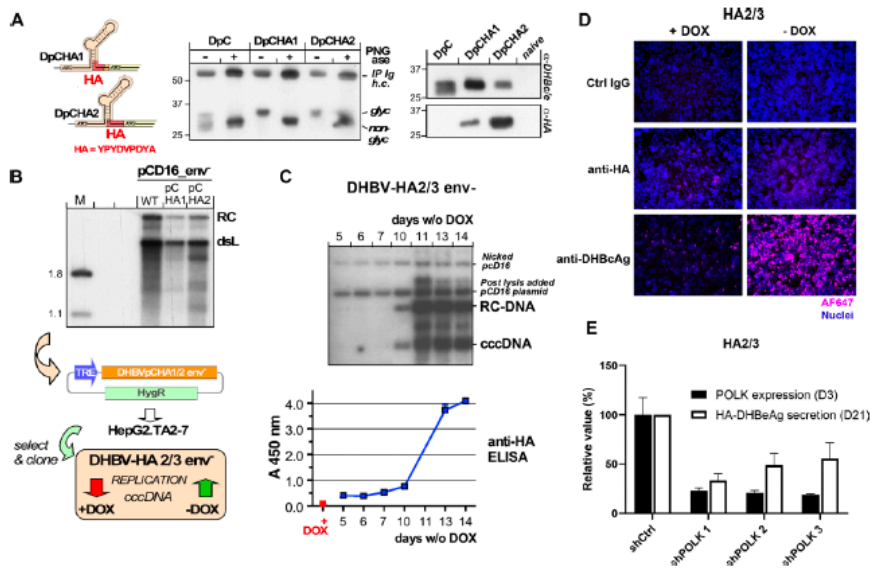


Figure 2 Strategically positioned HA-tags compatible with DHBV precore processing and replication. (A) glycosylation and retention of the HA-tag indicate DHBc-like secretion. constructs DpCHA1 and DpCHA2 differ in the insertion position of the HA-tag coding sequence in preC which is four amino acids upstream of the core ORF in DpCHA1, and immediately in front of the core ORF in DpCHA2 (left); the predicted signal sequence cleavage site (SignalP V3) is eight residues upstream. Vector pAAV-DpC and the HA-tag derivatives were transfected into HepG2 cells, and DHBc/e-reactive products in the culture supernatants were enriched by immunoprecipitation. About one half of the immunopellet was treated with PNGase, the other half was not, then both were analysed by immunoblotting with polyclonal anti-DHBc/e antiserum (middle). While the doublet character of the main products from both HA-tag constructs was less pronounced than for the DpC construct, PNGase caused a similar mobility increase, indicating loss of glycosylation. Only the products from the HA-constructs were detected by a monoclonal anti-HA antibody (right), confirming that the secreted products contained the HA tag. (B) Replication competence. HepG2 cells were transfected with vector pCD16_env- encoding an envelope-deficient variant of wild-type DHBV16 (WT) and the respective pCHA1 and pCHA2 derivatives. Five days post-transfection viral DNAs from cytoplasmic capsids were analysed by southern blotting using a ³²P-labelled DHBV DNA probe. although signals appeared slightly weaker than those from WT, both PchA derivatives clearly supported dsL and rc-DNA formation. The pCHA-modified DHBV genomes were recloned into vector pTRE2-hyg under control of the TRE promoter. The vectors were transfected into tet-transactivator 2 (tTA2) containing HepG2.TA2-7 cells, and individual cell clones were selected using hygromycin. Clone DHBV-HA2/3_env- showed good inducibility of DHBV replication on Dox withdrawal and was used for all further experiments. (C) Kinetics of cccDNA formation in induced DHBV-HA2/3 cells. After the indicated times in Dox-free medium (6-well format) cells were harvested and nuclear viral DNAs extracted using the QIAamp DNA mini kit were subjected to southern blotting as in (B); postnuclear lysis each sample was supplemented with 150 pg pCD16 plasmid as recovery control. maintenance of the HA sequence in cccDNA was confirmed by sequencing of the PCR amplicon generated from nuclear DNA using DHBV primers D26832+ (corresponding to DHBV16 positions 2178–2200) / D26814- (complementary to positions 71–95). In parallel, duplicate aliquots (200 µL each) from the culture supernatants of the cells were examined by sandwich ELISA using anti-DHBc/e coated plates plus a rat monoclonal anti-HA antibody - peroxidase conjugate (Roche #12013819001) for detection. (D) Detection of HA-DHBeAg and DHBeAg by if 19 days after Dox withdrawal in HA2/3 cells using specific antibodies. Nuclei were stained with DAPI. (E) Effect of *POLK* silencing on HA-DHBeAg secretion in HA2/3 cells. HA2/3 cells were plated in absence of Dox and transduced with lentivirus encoding three different shRNAs targeting Polk. 3 days after transduction, cells were lysed, total RNA was extracted and *POLK* expression was quantified by RT-qPCR. Results are expressed as means±SD% relative *POLK* expression compared with shCtrl (set at 100%) from two biological replicates. In parallel, supernatant from *POLK*-silenced cells were harvested 21 days post Dox withdrawal and HA-DHBeAg secretion was quantified by anti-HA ELISA. Results are expressed as means±SD% relative HA-HBeAg secretion compared with shCtrl (set at 100%) from four independent experiments. cccDNA, covalently close circular DNA; DHBV, duck hepatitis B virus; HA, haemagglutinin.

the very weak intracellular HA-staining suggests that the tagged DHBeAg is efficiently secreted (figure 2D).

Notably, the time it takes for cccDNA and DHBeAg to exceed the lower limit of detection correlates with the scale of the experiment; for instance, one well of a 6-well plate (as used here) holds about 20-fold more cells than one well of 96-well plate (as used in the shRNA screen). For the screening in 96-well format we therefore established a more sensitive chemiluminescent ELISA format whereby the increase in HA signal became evident from around day 14 to day 22 postinduction. As an adequately enduring silencing of host factors by chemical siRNAs did not appear feasible, we instead went for a lentiviral shRNA expression approach. Optimisation with the screening

platform determined that D21 was an appropriate time point for the analysis of gene silencing impact on HA-DHBeAg. For validation, we transduced HA2/3 cells with lentiviruses encoding three different validated shRNAs targeting the expression of *POLK* which was previously described as an important contributor to the formation of HBV cccDNA,¹⁰ or a scrambled shRNA control. All three shRNAs achieved an approximately 80% reduction in *POLK* expression after 3 days (figure 2E), and this correlated with 40%–60% lower signals in the HA ELISA than in the shCtrl sample (figure 2E) 21 days after Dox withdrawal. Together these data indicated that the HA2/3 cell line is a relevant model to study cccDNA formation and regulation through the quantification of secreted DHBeAg, and hence is suited for

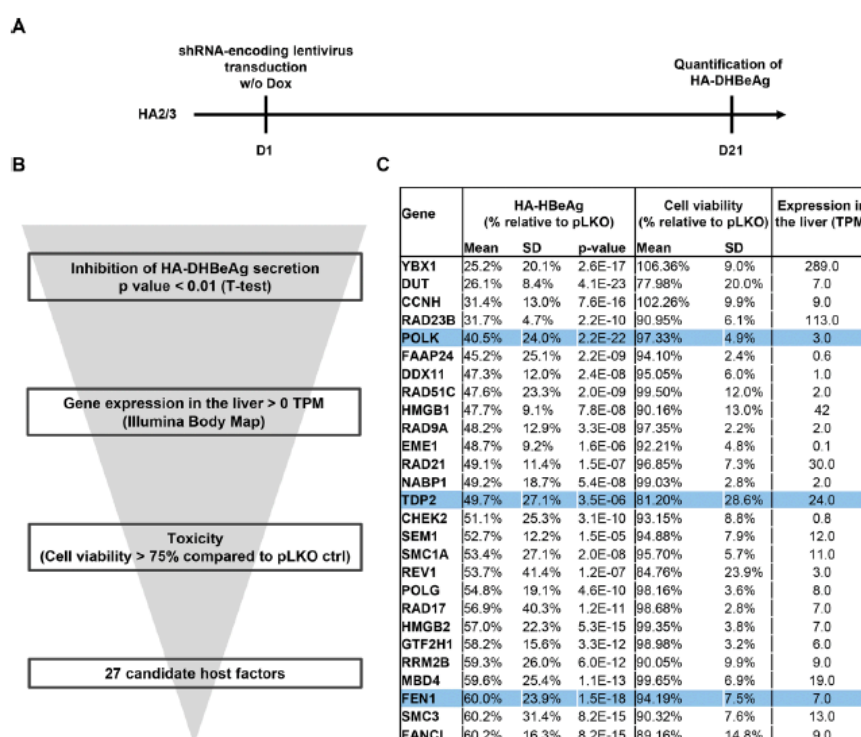


Figure 3 Approach of loss-of-function screen (LOF) in HA2/3 cells for the identification of HBV cccDNA host-dependency factors. **A.** schematic workflow of LOF-screen. **(B)** Selection of candidate genes from the primary screen with the phenotypic robustness between replicates, the expression in the liver (illumina body MAP) and the toxicity (cell viability >75% compared with pLKO ctrl). **(C)** 27 candidates from the primary screen. The global effect of individual gene silencing on HBeAg production was analysed by pooling the effect of the three-independent shRNA per gene (n=9). P values were obtained through a two-tailed Student's t-test comparing phenotypic effects of shRNAs and pLKO ctrl. *POLK*, *TDP2* and *FEN1* are highlighted in blue. cccDNA, covalently close circular DNA; FEN1, flap endonuclease 1; HA, haemagglutinin; HBV, hepatitis B virus.

the identification of cccDNA-related host factors through RNAi-based loss-of-function screening.

A loss-of-function screen targeting the DNA damage response (DDR) machinery uncovers 27 candidate HBV cccDNA host-dependency factors

Given the anticipated crucial role of DNA repair in cccDNA formation, we next devised a lentiviral shRNA library targeting 239 genes belonging to the DNA damage response (DDR) machinery, with each gene being targeted by three independent shRNAs (online supplemental table S1). shRNAs targeting *POLK* expression were additionally used as positive controls, while empty pLKO vector and turboGFP expression vectors were used as negative controls. We then applied this targeted shRNA screen to the HA2/3 cell line, using as readout the HA-tagged DHBeAg ELISA values at 21 days after doxycycline withdrawal (figure 3A). Long-term silencing efficacy induced by shRNA was assessed by quantification of gene expression for one target (online supplemental figure S1). Using this approach, we identified a series of HBV cccDNA host factor candidates in which shRNA transduction correlated with a significant decrease in HA-DHBeAg production (figure 3B and online supplemental table S2). Computational analysis of the candidates including phenotypic variability and significance between replicates, toxicity and expression in the liver resulted in a short list of 27 candidates. Importantly, they included *POLK*, *TDP2* and *FEN1*, previously described as cccDNA-related HBV host factors, supporting the validity of our approach to uncover cccDNA host-dependency

factors (figure 3C). Among the top-scoring candidates was *YBX1*, encoding the Y box binding protein 1 (formerly YB-1), also known as nuclease-sensitive element-binding or Y-box transcription factor. *YBX1* is a DNA/RNA binding protein involved in several cellular processes, including DNA repair, regulation of transcription and translation, pre-mRNA splicing and mRNA packaging, that is, formation of mRNA nucleoprotein complexes.¹⁹ Another top candidate was the *DUT* encoding deoxyuridine triphosphatase, a key enzyme of nucleotide metabolism which hydrolyzes dUTP to dUMP and pyrophosphate. *DUT* is an essential enzyme for maintaining DNA integrity by preventing misincorporation of uracil into DNA, which results in DNA toxicity and cell death.²⁰ Interestingly, dUTPase enzymes are encoded by many retroviruses and were shown to be essential for viral replication of HIV types 1 and 2.²⁰ As a pararetrovirus expressing no dUTPase, endogenous dUTPase may well play an important role in the life cycle of HBV by preserving the integrity of viral DNA. Yet another top-scorer was *DDX11* which encodes a DEAD box DNA helicase (*DDX11*) involved in DNA replication recovery from DNA damage.²¹ An early step in cccDNA conversion from rcDNA is the removal of protein P and the RNA oligomer from the 5' ends of the two DNA strands. Removal of the respective flap-structures has been ascribed to *FEN1* which is also one of the five core factors for *in vitro* cccDNA formation.¹² *DDX11* cooperates with *FEN1* during removal of 5'-flap structures during Okazaki fragment maturation and long-patch base excision repair.²²

Taken together, our approach enabled to uncover several previously unidentified cccDNA-related host factor candidates. Given the HBV infection phenotype on silencing, absent or at most limited host cell toxicity during silencing, high expression in the liver (figure 3C) and previously described targetability by small molecules^{23,24} we chose to focus on YBX1 for further analyses. In this context, we first confirmed by Southern blot the effect of YBX1 and POLK depletion on human HBV cccDNA levels in another reporter cell line, HAC18, which expresses the HBV genome in an analogous manner to the DHBV genome in HA2/3 cells (online supplemental figure S2).

Validation of YBX1 as an HBV host factor in an HepG2-NTCP cell infection model

Next, we aimed to validate the role of YBX1 in state-of-the-art HBV infection models. Taking advantage of our previously described HepG2-NTCP cell line susceptible to robust HBV-infection,²⁵ we performed silencing studies using shRNA targeting YBX1 expression. HepG2-NTCP were individually transduced with three different shRNA-containing lentivirus constructs, selected with puromycin 48 hours prior to HBV infection and harvested 10 days postinfection (figure 4A). While TDP2-knock-out (KO) cells have been reported to be permissive to HBV infection,²⁶ DHBV cccDNA accumulation was slowed down in these cells.²⁶ Moreover, TDP2 was identified as a target in our primary screen. Consequently, TDP2-targeting shRNA was used as a control. Knockdown of both TDP2 and YBX1 resulted in a marked reduction of secreted HBeAg, intracellular HBV RNA (both pgRNA and PreC RNA (see online supplemental table S3) and intracellular HBsAg levels (figure 4B–D), revealing a significant decrease in HBV infection in YBX1-silenced HepG2-NTCP cells.

We then generated YBX1-KO HepG2-NTCP cells using CRISPR-Cas9 technology (figure 4E) and specific guide RNA. A robust decrease in YBX1 expression was observed in cells transduced with sgRNA targeting YBX1 (figure 4F). Functional analyses on infection with HBV showed a marked decrease in the levels of HBV markers in YBX1-KO HepG2-NTCP cells compared with HepG2-NTCP not related to cell viability (Figure 4G,H). Collectively, these functional analyses support an important role for YBX1 in HBV infection of HepG2-NTCP cells.

To study the functional role of YBX1 for the formation and/or maintenance of HBV cccDNA levels, we assessed HBV DNA replication intermediates in HBV infected YBX1-silenced HepG2-NTCP cells by Southern blot. As shown in figure 4I and figure 4J, shRNA-induced silencing of YBX1 resulted in a marked decrease in cccDNA levels relative to non-silenced HBV-infected cells. The identity of the band marked as cccDNA was confirmed by heat denaturation and subsequent linearisation by EcoRI digestion (online supplemental figure S3). Similar results were observed in HBV-infected YBX1-KO HepG2-NTCP cells (Figure 4I,J). Interestingly, no decrease in HBV infection was observed when YBX1 knockdown in HBV-infected HepG2-NTCP cells was achieved after virus infection when the initial cccDNA pool is already established (online supplemental figure S4). Comparable results were observed in HA2/3 cells (online supplemental figure S4).

Finally, we aimed to clarify the mode of action by which YBX1 affects the early steps of the HBV life cycle. First, loss-of-function studies did not reveal a significant modulation of key cccDNA host factor expression on YBX1 knockdown, including POLK, TDP2 and PCNA (online supplemental figure S5A). Next, we functionally excluded a major role of YBX1 on viral cell entry, as

no effect on infection of YBX1-KO Huh7-NTCP cells by hepatitis D virus was observed (online supplemental figure S5B–D) which, like HBV, uses NTCP as entry receptor. Taken together, these results confirm a key functional role of YBX1 in early steps of the HBV life cycle in infected hepatocytes, subsequent to virus entry but prior to the establishment of the initial cccDNA pool.

YBX1 is recruited to HBV DNA

The above results led us to hypothesise that due to its nucleic acid binding abilities,¹⁹ YBX1 might directly interact with the HBV genome to promote cccDNA formation and accumulation. YBX1 is well known to bind to promoter/enhancer regions containing a Y-box motif (5'-CTGATTGGCCAA-3'),²⁷ although other DNA and RNA sequences can also be bound.²⁸ Moreover, it has been previously reported that YBX1 can bind to integrated HBV DNA regions.²⁹ Importantly, using sequence alignments as shown in figure 5A, we found putative Y-box motifs within the HBV *ayw* reference sequence (GenBank V01460.1) as well as within the DHBV16 reference sequence (GenBank K01834.1). Therefore, to investigate whether the YBX1-induced HBV regulation involves the recruitment of YBX1 to the HBV genome, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) qPCR assays on nuclear extracts from HBV-infected HepG2-NTCP cells with an anti-YBX1 antibody and an anti-HBcAg antibody as a positive control (figure 5B). Immunoprecipitation efficacy was controlled by Western blot detection of the precipitated proteins (figure 5B). Importantly, ChIP-qPCR analysis revealed specific recruitment of YBX1 to HBV DNA in the nucleus of infected HepG2-NTCP cells (figure 5C). Notably, we confirmed this result using nuclear extracts from three HBV-infected chimeric FRG-NOD mice (online supplemental table S4) suggesting that this interaction is present during HBV infection *in vivo*, although the kinetics of this interaction in the context of cccDNA steady-state levels still remains to be determined, since the ChIP assays was performed at a single time point both in cell culture models and in chronically infected human chimeric mice (figure 5C,D).

The rescue of YBX1 expression in KO cells restores cccDNA formation and HBV infection

To validate the canonical association between YBX1 and HBV DNA, we took advantage of YBX1-KO HepG2-NTCP cells (figure 6A). We designed YBX1 cDNA constructs carrying silent mutations in the sgRNA target sequence, and coding for the wild type amino acid sequence of YBX1 (YBX1-WT). We restored YBX1 expression in the YBX1-KO HepG2-NTCP cells, leading to robust and similar protein expression compared with endogenous levels (figure 6B). These cells were then infected by HBV. As shown in figure 6C, ectopic restoration of YBX1-WT was associated with a rescue of HBV infection phenotype, as measured by HBeAg secretion at day 10 postinfection. Importantly, YBX1-WT expression restored cccDNA levels at day 2 postinfection as shown by qPCR, confirming the importance of YBX1 in the early steps of the HBV life cycle and cccDNA formation or regulation (figure 6C). The increase in cccDNA levels in YBX1-KO cells expressing YBX1-WT was confirmed by Southern blot analyses (online supplemental figure S6). Finally, we performed ChIP-qPCR assays on nuclear extracts from HBV infected YBX1-KO cells expressing either YBX1-WT and confirmed the ability of the ectopic version of YBX1 to bind HBV DNA (figure 6E). Taken together, our results confirm the importance of YBX1 in the early steps of the viral life cycle and the early formation or regulation of cccDNA.

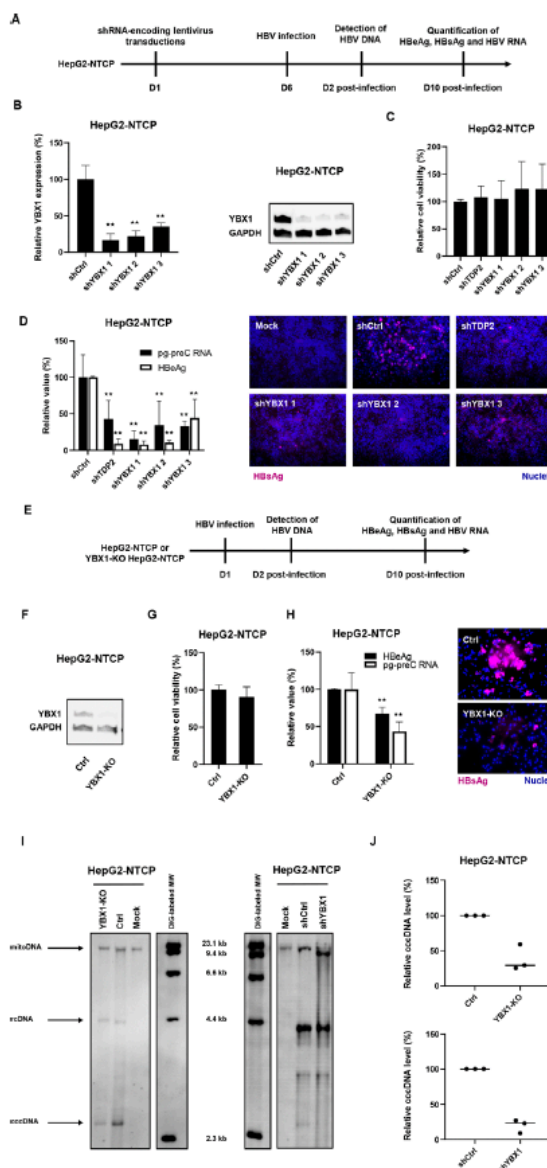


Figure 4 Validation of YBX1 as a HBV cccDNA host-dependency factor in the HBV permissive cell line HepG2-NTCP. (A) Experimental approach and timelines for the shRNA-based validation approach. HepG2-NTCP cells were transduced with lentivirus encoding three *YBX1*-targeting shRNA (shYBX1 1, 2, 3) 3 days post-transduction, total RNA was extracted and *YBX1* expression was quantified by RT-qPCR (B), left panel). Results are expressed as means \pm SD% relative *YBX1* expression compared with shCtrl (set at 100%) from three independent experiments. In parallel, *YBX1* expression was controlled by Western blot in transduced HepG2-NTCP (B), right panel). One representative blot is shown. 6 days post-transduction, cells were then infected with HBV. (C) Cell viability was assessed 10 days postinfection (DPI). Results are expressed as means \pm SD% relative cell viability compared with shCtrl (set at 100%) from three independent experiments. (D) HBV infection was assessed by quantification of HBV markers at 10 DPI: secreted HBeAg by CLIA (white) and HBV pg-preC RNA by RT-qPCR (white). Results are expressed as means \pm SD% relative HBV infection compared with shCtrl (set as 100%) from three independent experiments. Intracellular HBeAg expression was assessed by IF 10 DPI. (E) Experimental approach and timelines for the CRISPR/Cas9 validation approach. *YBX1*-KO cell line was produced from HepG2-NTCP cells through CRISPR/Cas9 technology using a specific sgRNA targeting *YBX1*. (F) *YBX1* protein expression in *YBX1*-KO cells compared with parental HepG2-NTCP cells (Ctrl) was assessed by Western blot. Cells were then infected with HBV for 10 days. (G) Cell viability was assessed 10 DPI. Results are expressed as means \pm SD% relative cell viability compared with HBV-infected HepG2-NTCP (set at 100%) from three independent experiments. (H) HBV infection was assessed 10 DPI by quantification of secreted HBeAg by CLIA (black) and HBV pg-preC RNA quantification by RT-qPCR (white). Results are expressed as means \pm SD% relative HBV infection compared with HBV-infected HepG2-NTCP (set as 100%) from three independent experiments. Intracellular HBeAg expression was assessed 10 dpi by IF. (I) Detection of HBV DNAs by Southern blot from *YBX1*-silenced and *YBX1*-KO cells. HBV rcDNA and HBV cccDNA are indicated. One representative experiment is shown. (J) Quantification of cccDNA levels. cccDNA levels were quantified using ImageJ software. Three independent experiments are shown. ** $p < 0.01$ (two-tailed Mann-Whitney U test). cccDNA, covalently close circular DNA; HBV, hepatitis B virus; NTCP, sodium-taurocholate cotransporting polypeptide.

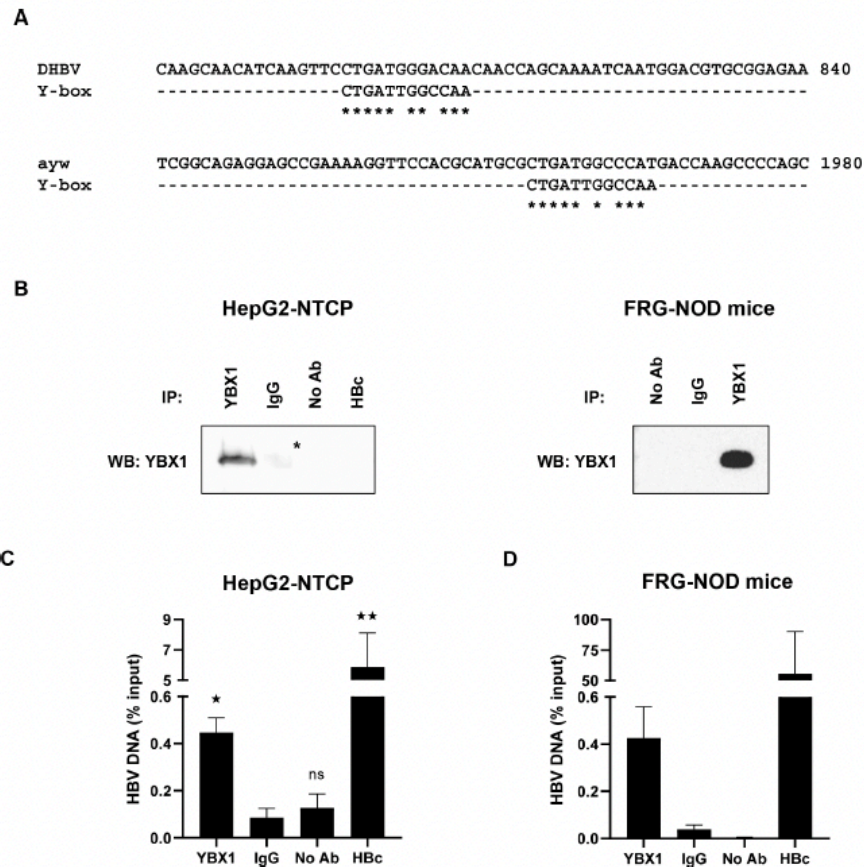


Figure 5 YBX1 binds to HBV DNA. (A) Putative Y-box motifs within the DHBV (K01834.1) and HBV genomes (ayw strain; V01460.1). (B, C). ChIP-qPCR assay on HBV-infected HepG2-NTCP cells. HepG2-NTCP cells were infected with HBV. Nuclear DNA was extracted two DPI and ChIP was performed using a specific anti-YBX1 antibody and a specific anti-HBcAg (HbC) antibody as a positive control. Immunoprecipitation efficacy was assessed by Western blot (B). The StAR in the blot corresponds to non-specific signal due to the presence of heavy chains (around 50 kDa) from the rabbit isotype control used for the immunoprecipitation and that are still weakly detected despite the use of an adapted HRP reagent. HBV DNA in immunoprecipitated eluates was quantified by qPCR (C). Results are shown as means \pm SEM% HBV DNA in eluates compared with input samples from five biological replicates. (D) The same ChIP-qPCR assay was performed using nuclear extracts from HBV-infected FRG-NOD mice. Results are shown as means \pm SEM% HBV DNA in eluates compared with input samples from three independent mice (one sample per mouse). * p <0.05; ** p <0.01 (two-tailed Mann-Whitney U test). ChIP, chromatin immunoprecipitation; HBV, hepatitis B virus; NS, non-significant

Validation of functional role of YBX for the HBV life cycle in primary human hepatocytes

We next validated the functional role of YBX1 for the HBV life cycle in primary human hepatocytes, the *in vitro* model most closely related to HBV infection in patients (figure 7A). Silencing of YBX1 expression in PHH prior to HBV resulted in a marked decrease in HBeAg secretion and cccDNA levels (figure 7B–E). These data confirm in the clinically most translatable HBV infection cell-based model a functional role of YBX1 in the HBV life cycle. Of note, YBX1 expression was upregulated in HBV-infected PHH compared with non-infected cells (figure 7F).

Analysis of YBX1 gene expression in patients with chronic HBV infection and liver disease

Based on our observation that HBV can modulate YBX1 expression in PHH (figure 7F), we next studied YBX1 gene expression in liver tissues in different cohorts of patients with HBV infection and liver disease. As controls we used hepatitis C virus (HCV)-infected or NASH patients with a similar disease phenotype.

A significant positive correlation (Spearman's $r=0.85$, $p=0.006$) was observed between HBV viral load and YBX1 expression in liver tissues from nine HBV-infected patients (GSE14322) (figure 8A),²⁵ suggesting that YBX1 may be a clinically relevant factor for HBV infection.³⁰ Indeed, higher expression of YBX1 in the livers from patients with surgically resected HBV-related HCC was associated with significantly higher probability of tumour recurrence after the resection (figure 8B) and eventually lower long-term overall survival rate (figure 8C). Furthermore, we observed a marked and significant correlation between YBX1 expression and the expression of fibrosis-associated genes, including VIM, encoding the vimentin in HBV-infected patients (GSE121248) (Spearman's $r=0.60/p=8.332e-05$) (figure 8D). Vimentin is a well-described biomarker for several cancers including sarcoma,³¹ known to be involved in the progression of liver disease and HCC.³²

In contrast, there were no significant associations with fibrosis progression in a cohort of NASH patients (GSE49541) or HCV load, although a non-significant positive tendency was observed

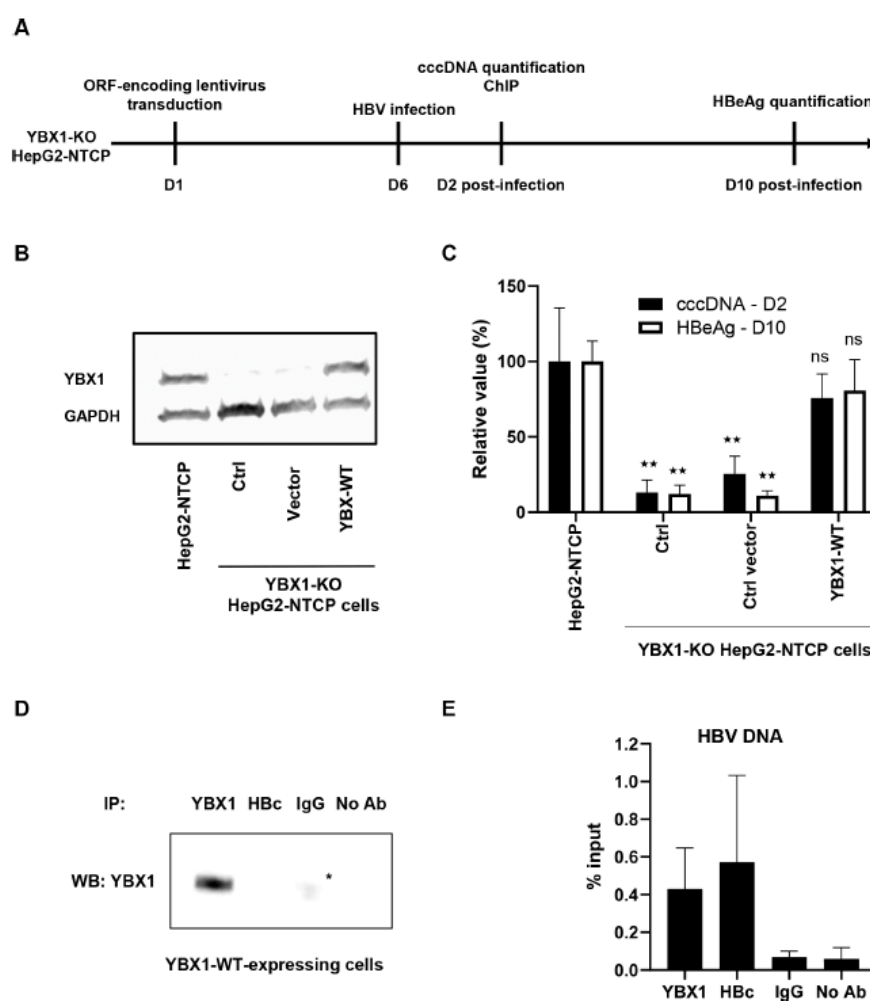


Figure 6 Rescue of YBX1 expression restores HBV infection in YBX1-KO cells. (A) Experimental timelines. YBX1-KO cells were transduced with lentivirus encoding the wild type version of YBX1 (YBX1-WT). (B) YBX1 expression was controlled by Western blot. 6 days after transduction, cells were infected by HBV. Two days postinfection, DNA was extracted and cccDNA levels were quantified by specific qPCR (C). Results are expressed as means \pm SD% relative cccDNA levels secretion compared with HepG2-NTCP cells (set as 100%) from three independent experiments. In parallel, secreted HBeAg levels were quantified 10 DPI by CLIA. Results are expressed as means \pm SD% relative HBeAg secretion compared with HepG2-NTCP cells (set as 100%) from three independent experiments (C–E). In parallel, ChIP-qPCR assay was performed on YBX1-WT-expressing HepG2-NTCP cells infected by HBV at day two postinfection using a specific anti-YBX1 antibody, a specific anti-HBeAg antibody, or a control IgG. YBX1 immunoprecipitation efficiency was assessed by Western blot (D). The StAR in the blots correspond to non-specific signal due to the presence of heavy chains (around 50 kDa) from the rabbit isotype control used for the immunoprecipitation (E). Results are expressed means \pm SDM HBV DNA levels (% input) from three biological replicates. ** $p < 0.01$ (two-tailed Mann-Whitney U test). cccDNA, covalently close circular DNA; ChIP, chromatin immunoprecipitation; HBV, hepatitis B virus; KO, knock-out; NS, non-significant; NTCP, sodium-taurocholate cotransporting polypeptide.

between YBX1 expression and disease progression and survival in patients with HCV-related cirrhosis (GSE15654) (figure 8E–H).

DISCUSSION

In this study, we established a novel cell-based reporter assay using a simple ELISA as a readout which enables fast-track discovery of HBV cccDNA host factors as antiviral targets for cure. Using this assay, we identified YBX1 as a previously undiscovered HBV host-dependency factor. Moreover, gene expression analyses in patients suggest that YBX1 is clinically not only relevant for the HBV life cycle but also for the pathogenesis of virus-induced liver disease and cancer.

A key limitation for the investigation of cccDNA formation is the low number of cccDNA copies in infected cells. The cell-based reporter system described in this study overcomes this challenge by enabling the non-invasive monitoring of cccDNA via the cccDNA-dependent generation of a secreted HA tagged DHBcAg. We note that Cai *et al* independently described a principally similar system for HBV.³³ In our study, we decided to initially focus on DHBV, a hepadnavirus closely related to HBV, because it produces a much higher number of cccDNA copies per cell compared with human HBV even in the same human hepatoma cells.⁸ This approach can be scaled up to 96 or 384 well plates allowing medium-sized drug or loss-of-function screens. The ELISA format allows simple automatic or robotic analyses.

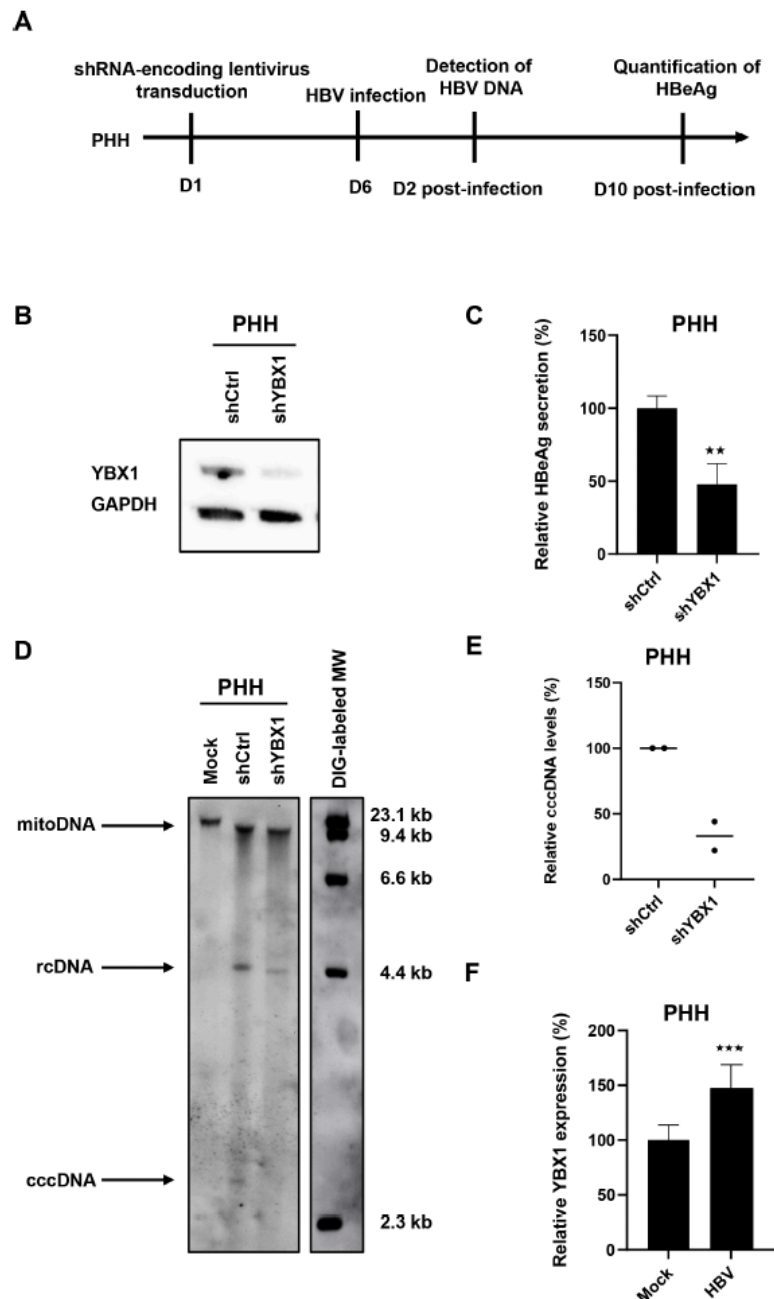


Figure 7 Ybx1 knock-down inhibits HBV infection in primary human hepatocytes. (A) Experimental approach and timelines. Primary human hepatocytes (PHH) cells were transduced with lentivirus encoding a *YBX1*-targeting shRNA (shYBX1) 3 days post-transduction, *YBX1* expression was controlled by Western blot. (B) One representative blot is shown. Six days post-transduction, PHH cells were then infected with HBV, and HBV infection was assessed by quantification of secreted HBeAg by CLIA 10dpi. Results are expressed as means±SD% relative HBV infection compared with shCtrl (set as 100%) from three independent experiments. (C) In parallel, PHH cells were lysed at day 2 postinfection, DNA was extracted and HBV DNA was detected by Southern blot (D). HBV rcDNA and HBV cccDNA are indicated. One representative experiment is shown. (E) Quantification of cccDNA levels using ImageJ software from two independent experiments. (F) *YBX1* mRNA expression in HBV-infected PHH. PHH were infected with HBV and *YBX1* expression was assessed 10 dpi. Results are expressed as means±SD% relative *YBX1* expression compared with shCtrl (set at 100%) from four independent experiments. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (two-tailed Mann-Whitney U test). cccDNA, covalently close circular DNA; HBV, hepatitis B virus; RCdna, relaxed circular dna.

The inter-assay reproducibility is high, thus minimising the need for many replicates or repetitions. The assay is fast with robust read-outs in 2 weeks. These features provide a major conceptual

and technical advance compared with current assays requiring RT-PCR or blotting approaches. While the biology of duck and human cccDNA is similar, it is notable that differences may

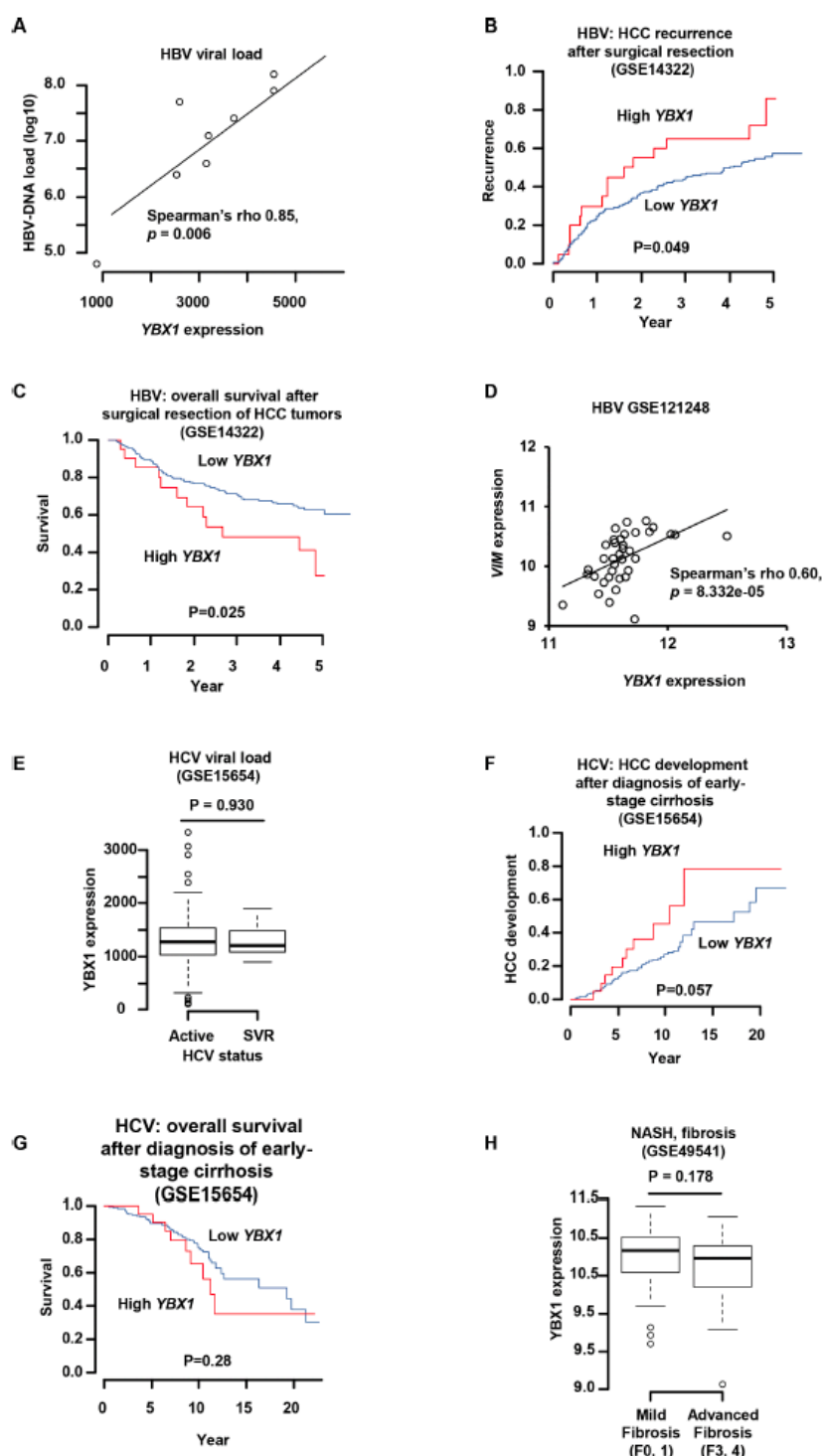


Figure 8 *YBX1* expression correlates with HBV load, HCC recurrence and survival in patients. (A) *YBX1* mRNA expression in HBV-infected patients (cohort described in methods). (B, C) Tumour recurrence (B) and survival (C) and level of *YBX1* expression (low-high) in a cohort of HBV-induced HCC patients (GSE14322). (D) Correlation between *YBX1* expression and *VIM* expression in HBV-infected patients (GSE121248). (E) Correlation between *YBX1* expression and the NASH fibrosis stage (GSE49541). (F) Correlation between *YBX1* expression and the HCV status. (G, H) Survival (G) and HCC development (H) depending on level of *YBX1* expression (low-high) (GSE15654). HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus.

exist in cccDNA formation between DHBV and HBV, as already suggested by the much higher cccDNA levels DHBV can accumulate in the same cells⁸ and DHBV's apparently more pronounced dependence on TDP2.^{9,26} However, the identification of known HBV cccDNA-dependency factors beyond TDP2 such as POLK, and FEN1 confirms the ability of our approach to use DHBV cccDNA as a template to identify HBV cccDNA-related host factors. Furthermore, we have developed an HA2/3 analogous HBV cell line with cccDNA dependent HA-HBeAg production (HAC18) in which we could confirm the negative impact of YBX1 depletion (online supplemental figure S2). However, the high cccDNA levels in HA2/3 cells remain a major technical advantage because they also correlate with higher HA-ELISA signals. We note that HA-HBeAg secretion in our assay would respond not only to alterations in the multiple steps of cccDNA formation and/or transcription from the cccDNA minichromosome, but also to factors involved in translation of the precore protein and/or its processing and secretion as HBeAg. Our choice of anti-DDR shRNAs makes the latter scenario unlikely for the current study yet also opens additional future opportunities.

Using this approach, we identified YBX1 as a previously undiscovered HBV host-dependency factor, although not essential for cccDNA production as it is not totally abolished in YBX1-KO cells (figure 4). The functional relevance of YBX1 for the HBV life cycle was confirmed by several lines of evidence: (1) Genetic YBX1 loss-of-function analyses using CRISPR-Cas9 or shRNA resulted in a marked decrease in HBV infection in cell lines and primary human hepatocytes. (2) A substantial reduction in cccDNA levels confirmed functional relevance of YBX1 to synthesise and maintain robust cccDNA levels. (3) A specific recruitment of YBX1 to HBV genome. YBX1 is a multifunctional DNA/RNA-binding protein that regulates transcription and translation.¹⁹ Increased levels of YBX1 have been correlated with DNA topoisomerase II activity, already described as cccDNA-related HBV host factor. Moreover, a previous study reported a direct interaction between YBX1 and PCNA,³⁴ one of the crucial factors required for *in vitro* cccDNA formation.¹² Although we do not observe a modulation of PCNA expression on YBX1 silencing (online supplemental figure S5), a detailed understanding of the functional role of YBX1-PCNA interaction in cccDNA formation would require additional studies. Collectively, our data indicate events after entry and preceding establishment of the cccDNA pool as major target(s) for YBX1 proviral activity. However, further studies are needed to unravel in more detail the molecular mechanism(s) of YBX1 in cccDNA formation and/or regulation in the HBV life cycle. YBX1 is a targetable protein and therefore a candidate for antiviral therapy. Small molecules specifically targeting YBX1 should be tested to assess its potential as an antiviral target. Although several YBX1-targeting drugs have been described, such as fisetin²³ or CYT387,²⁴ they have additional targets beyond YBX1.^{24,35,36} YBX1-specific specific inhibitors would be required to further confirm the targetability of YBX1 using a small molecule approach.

Since YBX1 is involved in the modulation of several signal transductions pathways, HBV-YBX1 interaction may also play a role in the pathogenesis of virus-induced liver disease and HCC. Indeed, in patients, YBX1 expression is accompanied by expression of genes involved in liver disease progression, as well as lower survival of HCC patients. High expression of YBX1 is often detected in various cancers including HCC, and is closely related to the progression, poor prognosis and multi-drug resistance.^{37,38} In this regard it is also of interest to note that YBX1 has been suggested as target in anticancer therapies.³⁹ However, additional experiments are required to fully evaluate

the functional role of HBV in the regulation of YBX1 expression and disease biology.

Collectively, the implication of our study is threefold: (1) We have established a robust and simple cell-based system enabling to discover HBV cccDNA-dependency factor as targets for viral cure; (2) our study uncovers the DNA repair factor YBX1 as an important factor for cccDNA biology, providing an opportunity for exploring YBX1 as target for HBV cure; (3) we observed an association between HBV infection, YBX1 expression and virus-induced liver disease suggesting that targeting YBX1 may not only reduce viral cccDNA but potentially also ameliorate HBV-induced liver disease and cancer incidence.

MATERIALS AND METHODS

All the materials, reagents and protocols are detailed in online supplemental material.

Author affiliations

¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMRS 1110, Strasbourg, France

²Department of Internal Medicine II/Molecular Biology, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany

³IGBMC, Plateforme de Criblage Haut-débit, Illkirch, France

⁴Department of Internal Medicine, Liver Tumor Translational Research Program, Simmons Comprehensive Cancer Center, Division of Digestive and Liver Diseases, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

⁵Department of Gastroenterology and Hepatology, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan

⁶Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA

⁷Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatologie-digestif, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

Twitter Eloi R Verrier @eloi_verrier

Acknowledgements We thank our colleagues Sarah Durand (Inserm UMR_51110, Strasbourg, France), Elodie Boeuf and Amélie Weiss (IGBMC, Illkirch-Graffenstaden, France), and Céline Costa (University of Freiburg, Germany) for excellent technical support. Joachim Lupberger and Karim Majzoub (Inserm UMR_51110, Strasbourg, France) for helpful discussions. We thank our collaborator Julie Lucifora (CIRI, Lyon, France) for excellent technical support on ChIP assays.

Contributors TB is the guarantor of the study and serves as lead corresponding author. TB and MN initiated the study, designed and supervised research. ERV, LH, KD, JM, MN and TB produced and characterised the HA2/3 cell line. ERV, AM-R, LB, MN and TB set up, designed and performed the shRNA screen. ERV and GL analyzed the screen. GL and LH performed the validation experiments with the support of MJH and AM. EF and PP provided human hepatocytes. LM provided mouse samples. ERV, GL, LH, CS, AM, MJH, LM, MN and TB analysed the data. ERV, GL, FJ, HES, NF, S-YH, YH and TB analyzed the clinical data. ERV, GL, MN and TB wrote the manuscript. All the authors read and edited the manuscript. ERV and GL contributed equally as first authors. MN and TB contributed equally to this work as senior authors. All the authors approved the study.

Funding This work was supported by Inserm, the University of Strasbourg, the European Union (Infect-ERA hepBccc, ERC-2014-AdG-671231-HEPCIR, ERC-AdG-2020-FIBCAN #101021417 and Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement 667273 - HEPICAR), Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS ECTZ87384) and the French Cancer Agency (ARC IHU201901299). This work of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), and by SFRI-STRAT'US project (ANR 20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. GL is the recipient of an ANRS fellowship (ECTZ86820 and ECTZ158023). ERV acknowledges fundings from ANRS (ECTZ104527), and the French National Research Agency (ANR, grant number ANR-21-CE15-0035-01 DELTarget).

Competing interests None declared.

Patient and public involvement Patients and/or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of this research.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval Primary human hepatocytes (PHH) were obtained from liver tissue from patients undergoing liver resection for liver metastasis at the Strasbourg University Hospitals with informed consent. Protocols were approved by the local

Ethics Committee of the Strasbourg University Hospitals (CPP) and the Ministry of Higher Education and Research of France (DC 2016 2616). Human samples from HBV infected patients followed at the Chang Gung Memorial Hospital (Taipei, Taiwan) were obtained with informed consent. Protocols were approved by the local Ethics Committee (Institutional Review Board 102-3825C). Participants gave informed consent to participate in the study before taking part.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available on reasonable request. All data relevant to the study are included in the article or uploaded as online supplemental information.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 Unported (CC BY 4.0) license, which permits others to copy, redistribute, remix, transform and build upon this work for any purpose, provided the original work is properly cited, a link to the licence is given, and indication of whether changes were made. See: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ORCID iDs

Gaëtan Ligat <http://orcid.org/0000-0003-1237-1936>

Naoto Fujiwara <http://orcid.org/0000-0002-4109-3421>

Catherine Schuster <http://orcid.org/0000-0001-7281-4511>

Michael Nassal <http://orcid.org/0000-0003-2204-9158>

Thomas F. Baumert <http://orcid.org/0000-0002-8864-2168>

REFERENCES

- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018.
- Ginzberg D, Wong RJ, Gish R. Global HBV burden: guesstimates and facts. *Hepatol Int* 2018;12:315–29.
- Ligat G, Goto K, Verrier E, et al. Targeting viral cccDNA for cure of chronic hepatitis B. *Curr Hepatol Rep* 2020;19:235–44.
- Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008;134:235–49.
- Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:4597–601.
- Herrschler C, Roingeard P, Blanchard E. Hepatitis B virus entry into cells. *Cells* 2020;9. doi:10.3390/cells9061486. [Epub ahead of print: 18 Jun 2020].
- Nassal M. Hbv cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 2015;64:1972–84.
- Köck J, Rösler C, Zhang J-J, et al. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001082.
- Königer C, Wingerl I, Marsmann M, et al. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4244–53.
- Qi Y, Gao Z, Xu G, et al. DNA polymerase κ is a key cellular factor for the formation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005893.
- Kitamura K, Que L, Shimadu M, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog* 2018;14:e1007124.
- Wei L, Ploss A. Core components of DNA lagging strand synthesis machinery are essential for hepatitis B virus cccDNA formation. *Nat Microbiol* 2020;5:715–26.
- Schreiner S, Nassal M. A role for the host DNA damage response in hepatitis B virus cccDNA formation-and beyond? *Viruses* 2017;9:125.
- Sun D, Nassal M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J Hepatol* 2006;45:636–45.
- Cai D, Mills C, Yu W, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4277–88.
- Nassal M, Rieger A. An intramolecular disulfide bridge between CYS-7 and CYS61 determines the structure of the secretory core gene product (E antigen) of hepatitis B virus. *J Virol* 1993;67:4307–15.
- DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, et al. Antigenic switching of hepatitis B virus by alternative dimerization of the capsid protein. *Structure* 2013;21:133–42.
- Bardens A, Döring T, Stieler J, et al. Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. *Cell Microbiol* 2011;13:602–19.
- Lyabin DN, Eliseeva IA, Ovchinnikov LP. Yb-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5:95–110.
- Hizi A, Herzog E. dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. *Retrovirology* 2015;12:70.
- Shah N, Inoue A, Woo Lee S, et al. Roles of ChIR1 DNA helicase in replication recovery from DNA damage. *Exp Cell Res* 2013;319:2244–53.
- Farina A, Shin J-H, Kim D-H, et al. Studies with the human cohesin establishment factor, ChIR1. Association of ChIR1 with Ctf18-RFC and FEN1. *J Biol Chem* 2008;283:20925–36.
- Khan MI, Adhami VM, Lall RK, et al. YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin. *Oncotarget* 2014;5:2462–74.
- Liu S, Marnett AE, Alexe G, et al. The kinases IKBKE and TBK1 regulate MYC-dependent survival pathways through YB-1 in AML and are targets for therapy. *Blood Adv* 2018;2:3428–42.
- Eller C, Heydmann L, Colpitts CC, et al. A genome-wide gain-of-function screen identifies CDKN2C as a HBV host factor. *Nat Commun* 2020;11:2707.
- Cui X, McAllister R, Boregowda R, et al. Does tyrosyl DNA Phosphodiesterase-2 play a role in hepatitis B virus genome repair? *PLoS One* 2015;10:e0128401.
- Horwitz EM, Maloney KA, Ley TJ. A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma-globin genes. *J Biol Chem* 1994;269:14130–9.
- Budkina KS, Zlobin NE, Kononova SV, et al. Cold shock domain proteins: structure and interaction with nucleic acids. *Biochemistry* 2020;85:1–19.
- Kajino K, Yamamoto T, Hayashi J, et al. Recombination hot spot of hepatitis B virus genome binds to members of the HMG domain protein family and the Y box binding protein family; implication of these proteins in genomic instability. *Intervirology* 2001;44:311–6.
- Chen C-J, Yang H-I, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65–73.
- Leader M, Collins M, Patel J, et al. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology* 1987;11:63–72.
- Lee SJ, Yoo JD, Choi SY, et al. The expression and secretion of vimentin in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *BMB Rep* 2014;47:457–62.
- Cai D, Wang X, Yan R, et al. Establishment of an inducible HBV stable cell line that expresses cccDNA-dependent epitope-tagged HBeAg for screening of cccDNA modulators. *Antiviral Res* 2016;132:26–37.
- Ise T, Nagatani G, Imamura T, et al. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 1999;59:342–6.
- Ravula AR, Teegala SB, Kalakotla S, et al. Fisetin, potential flavonoid with multifarious targets for treating neurological disorders: an updated review. *Eur J Pharmacol* 2021;910:174492.
- Wang X, Lu J, Li J, et al. CYT387, a potent IKBKE inhibitor, suppresses human glioblastoma progression by activating the Hippo pathway. *J Transl Med* 2021;19:396.
- Chao H-M, Huang H-X, Chang P-H, et al. Y-Box binding protein-1 promotes hepatocellular carcinoma-initiating cell progression and tumorigenesis via Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 2017;8:2604–16.
- Xiao L, Zhou Z, Li W, et al. Chromobox homolog 8 (CBX8) interacts with Y-box binding protein 1 (YBX1) to promote cellular proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Aging* 2019;11:7123–49.
- Law JH, Li Y, To K, et al. Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability. *PLoS One* 2010;5:e12661.

Annexe 3

JAK1 promotes HDV replication and is a potential target for antiviral therapy

[Heuschkel MJ](#), Bach C, Heydmann-Meiss L, Gerges E, Felli E, Giannone F, Pessaux P, Schuster C, Lucifora J, Baumert TF, Verrier ER.

Étude publiée dans *Journal of Hepatology*, Novembre 2023
(DOI: 10.1016/j.jhep.2023.10.030)

JAK1 promotes HDV replication and is a potential target for antiviral therapy

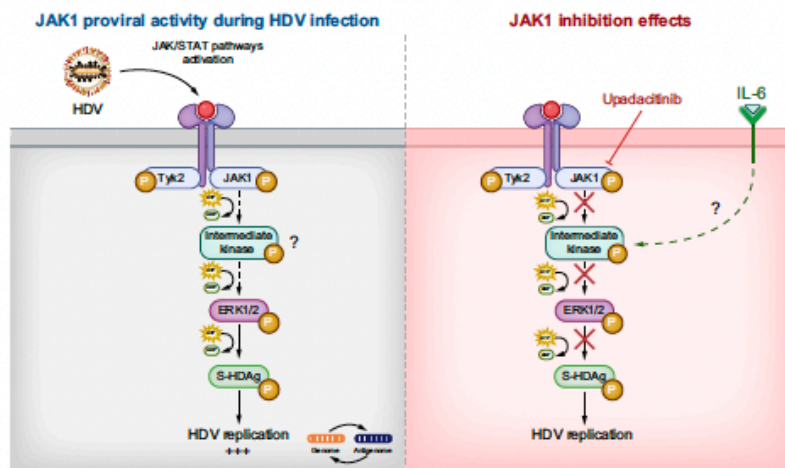
Authors

Margaux J. Heuschkel, Charlotte Bach, Laura Meiss-Heydmann, ..., Julie Lucifora, Thomas F. Baumert, Eoi R. Verrier

Correspondence

e.verrier@unistra.fr (E.R. Verrier).

Graphical abstract



Highlights

- JAK1 exhibits an unexpected proviral activity during HDV infection in various *in vitro* models, including primary human hepatocytes.
- JAK1 proviral activity is independent of the MDA5-mediated innate immune response and the activation of STAT3.
- JAK1 depletion is associated with inhibition of HDV replication via modulation of ERK1/2 and S-HDAg phosphorylation levels.
- FDA-approved JAK1-specific inhibitors such as upadacitinib are efficient antivirals for the treatment of hepatitis D.

Impact and implications

Chronic hepatitis D is the most aggressive form of chronic viral hepatitis. As no curative treatment is currently available, new therapeutic strategies based on host-targeting agents are urgently needed. Here, using loss-of-function strategies, we uncover an unexpected interaction between JAK1, a major player in the innate antiviral response, and HDV infection. We demonstrated that JAK1 kinase activity is crucial for both the phosphorylation of the delta antigen and the replication of the virus. By demonstrating the antiviral potential of several FDA-approved JAK1 inhibitors, our results could pave the way for the development of innovative therapeutic strategies to tackle this global health threat.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.030>

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). J. Hepatol. 2023, ■, 1–12

JAK1 promotes HDV replication and is a potential target for antiviral therapy

Margaux J. Heuschkel¹, Charlotte Bach¹, Laura Meiss-Heydmann¹, Emma Gerges¹, Emanuele Felli², Fabio Giannone², Patrick Pessaux², Catherine Schuster¹, Julie Lucifora³, Thomas F. Baumert^{1,2,4}, Eloi R. Verrier^{1,*}

Journal of Hepatology 2023. vol. ■ | 1–12

Background & Aims: Chronic co-infection with HBV and HDV leads to the most aggressive form of chronic viral hepatitis. To date, no treatment induces efficient viral clearance, and a better characterization of virus-host interactions is required to develop new therapeutic strategies.

Methods: Using loss-of-function strategies, we validated the unexpected proviral activity of Janus kinase 1 (JAK1) – a key player in innate immunity – in the HDV life cycle and determined its mechanism of action on HDV through various functional analyses including co-immunoprecipitation assays.

Results: We confirmed the key role of JAK1 kinase activity in HDV infection. Moreover, our results suggest that JAK1 inhibition is associated with a modulation of ERK1/2 activation and S-HDAg phosphorylation, which is crucial for viral replication. Finally, we showed that FDA-approved JAK1-specific inhibitors are efficient antivirals in relevant *in vitro* models including primary human hepatocytes.

Conclusions: Taken together, we uncovered JAK1 as a key host factor for HDV replication and a potential target for new antiviral treatment.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Chronic hepatitis D is the most severe form of chronic viral hepatitis and is caused by HDV, a small defective hepatotropic virus identified in 1977.¹ This satellite virus of HBV, the leading cause of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide, is characterized by a small genome that does not encode its own envelope proteins and is dependent on the expression of hepatitis B surface antigens (HBsAg) for the completion of its replicative cycle and the secretion of infectious viral particles.² Hepatitis D is therefore the result of either HBV and HDV co-infection or HDV/HBV superinfection in patients chronically infected with HBV.³ At least twenty-five million people are chronically coinfecting with HBV and HDV⁴ but this number remains unclear and fluctuates between studies, some of them estimating the number of chronically HDV-infected patients at seventy-two million individuals worldwide with a variable and increasing prevalence across regions, especially in developed countries, despite the availability of a preventive HBV vaccine that also protects against HDV infection.^{5,6}

Although recent progress has been made in the understanding of the molecular virology of HDV, therapeutic options for chronic hepatitis D are still limited. Current antiviral

treatments against HBV infection are generally not effective against HDV, and the absence of a HDV-specific polymerase complicates attempts to identify appropriate therapeutic targets. For decades, the main treatment consisted of the use of pegylated-interferon alpha (PEG-IFN- α) but only a limited number of patients achieve a sustained response, which is the foundation of eventual improvement in related liver fibrosis.⁷ In this context, host-targeting agents, which target cellular factors that are essential for the viral cycle, have been successfully explored for the development of new antivirals. This is exemplified by the development of the entry inhibitor bulevirtide, which received approval for medical use in the European Union in July 2020.⁸ While the main steps of the HDV life cycle have been characterized, notably through the development of adapted study models based on NTCP-expressing cells,⁹ the underlying molecular mechanisms of hepatocyte-HDV interactions still need to be more deeply investigated.

HDV is a small spherical virus that possesses a lipid envelope in which the three HBsAg (L-, M-, and S-) are anchored. This envelope contains the ribonucleoprotein complex that includes the viral genome associated with the two isoforms of the hepatitis delta antigen (HDAg), S-HDAg for the short form and

Keywords: Hepatitis D virus; host factor; replication; antiviral treatment; HDAg; kinase.

Received 30 March 2023; received in revised form 17 October 2023; accepted 21 October 2023; available online xxx

* Corresponding author. Address: Inserm U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France;

Tel.: +33 3 68 85 37 06, fax: +33 3 68 85 55 08.

E-mail address: e.verrier@unistra.fr (E.R. Verrier).

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.030>



JAK1 promotes HDV replication

L-HDAg for the long form.¹⁰ These two viral proteins undergo numerous modifications and play a key role in the viral replication cycle. Notably, phosphorylation of S-HDAg is important for viral replication while farnesylation of L-HDAg is essential to negatively regulate replication and promote the assembly of new virions.^{2,10}

HDV is a non-cytopathic virus strongly activating the type I and III interferon (IFN) response upon recognition of viral RNA in the cytoplasm by the cytosolic sensor melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5).¹¹ This recognition leads to increased expression of IFN-stimulated genes (ISGs), such as *MX2* and radical S-adenosyl methionine domain containing 2 (*RSAD2*), thus contributing to the inhibition of HBV replication in coinfecting hepatocytes.^{12,13} The virus seems sensitive to a limited degree to this endogenous response,¹¹ while stages in the early life cycle of HDV are moderately affected by exogenous type I IFN.^{11,14,15} In addition to the interaction of viral RNA with the RNA sensing machinery, L-HDAg has been suggested

to activate the transcription factors NF- κ B and signal transducer and activator of transcription (STAT)3 through oxidative stress,¹⁶ putatively contributing to the persistence of the virus in hepatocytes.¹⁷

In the context of a complex interaction between HDV and innate immune factors and the need of new antiviral targets, we previously performed a loss-of-function screen using pools of four small-interfering RNAs (siRNAs) targeting more than 7,500 genes belonging to the druggable genome and identified 191 candidates potentially important for the HDV cycle. Among the primary candidates were key members of the pyrimidine biosynthesis pathway but also, surprisingly, Janus kinase 1 (JAK1).¹⁸ Although JAK1 plays a key role in the innate immune response against viral infection,¹⁹ we observed an unexpected proviral activity of this kinase in a bona fide infection system. The aim of this study was the validation of JAK1 as a key host factor in HDV infection and the evaluation of its potential as an antiviral target for innovative therapies against HDV.

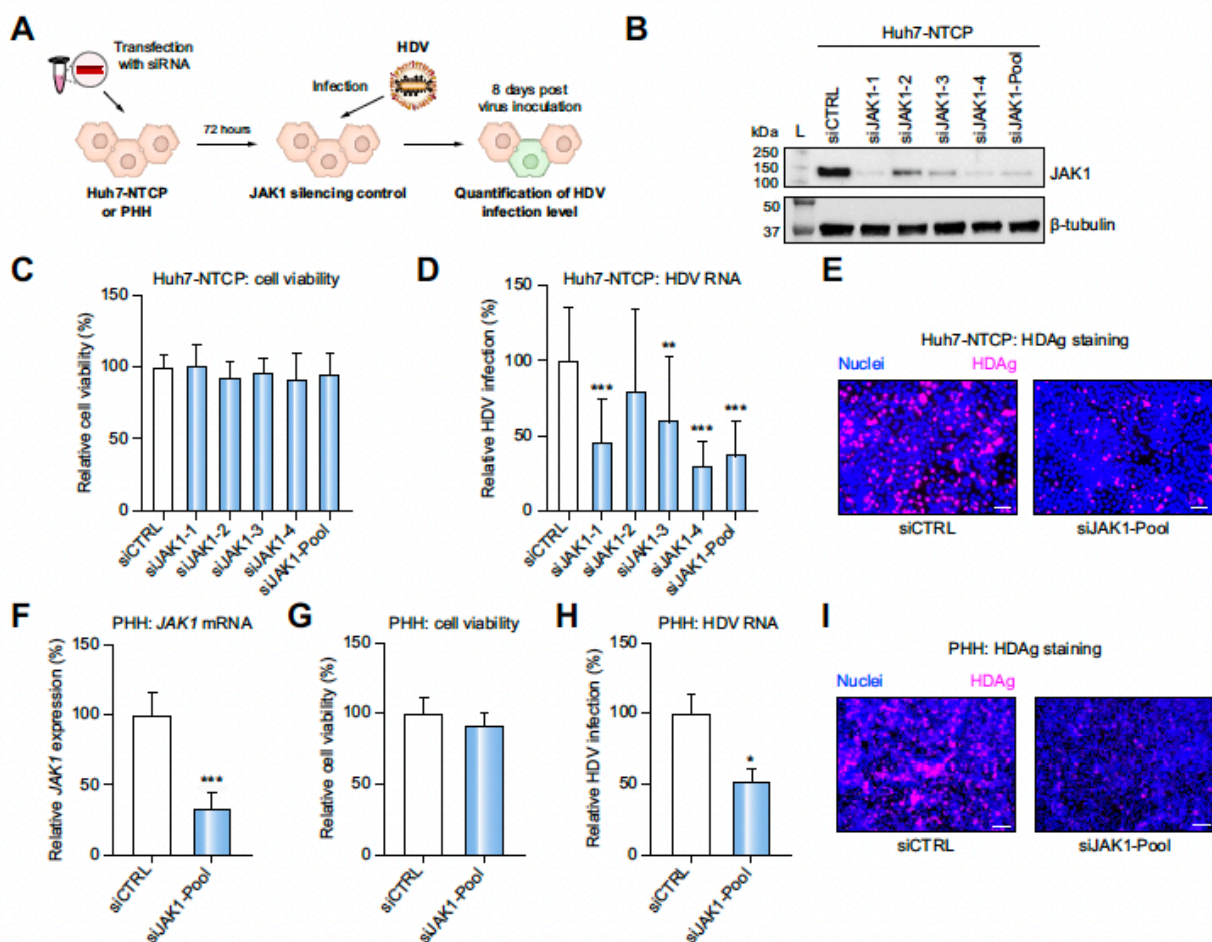


Fig. 1. JAK1-KD is associated with decreased HDV infection. (A) Experimental strategy. (B-E) JAK1-KD in Huh7-NTP cells. JAK1 expression was controlled by WB from one representative experiment 72 h after siRNA transfection (B). (C-E) Cells were then infected by HDV for 8 days, cell viability was assessed (C), and HDV infection was quantified by RT-qPCR from six independent experiments. Alternatively, (E) HDV infection was assessed by IF. (F-I) JAK1-KD inhibits HDV infection in PHHs. JAK1-KD was assessed by RT-qPCR (F), and cell viability (G) and HDV infection (H-I) were assessed after 8 days of infection as described above from four independent experiments. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test). Scale bar: 100 μ m. IF, immunofluorescence; KD, knockdown; PHHs, primary human hepatocytes; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR; siRNA, small-interfering RNA.

Materials and methods

Materials and methods are fully presented in the CTAT table and supplementary information.

Results

Validation of JAK1 as a cellular host factor for HDV infection

To confirm the results from the primary screen,¹⁸ we first performed the deconvolution of the siRNA pool targeting *JAK1* expression prior to HDV infection in Huh7-NTCP cells. As shown in Fig. 1A-E, the silencing efficacy of the four individual siRNAs correlated with the inhibition of HDV infection. The inhibitory impact of *JAK1* knockdown (KD) on HDV infection when the siRNA pool was transfected after viral inoculation further suggests a role for *JAK1* in the replication of the virus (Fig. S1). We next validated this result by knocking down *JAK1*

expression in primary human hepatocytes (PHHs) and observed a significant inhibition of HDV infection associated with a decrease in *JAK1* expression in si*JAK1*-Pool-transfected PHHs (Fig. 1F-I). We next engineered a stable Huh7-NTCP-derived *JAK1* knockout (KO) clone named Huh7-NTCP-*JAK1*-KO, and two derived cell lines named *JAK1*^{res} and *JAK1*^{mut}, expressing a wild-type version of *JAK1* resistant to the single-guide RNA used to produce the KO cell line or a mutant version of the protein unable to bind ATP²⁰ carrying L633 K and K622A mutations in the pseudo-kinase domain, respectively (Fig. 2A). The previously described Huh7-NTCP-YBX1-KO cell line²¹ was used as a control as the loss of YBX1 (Y-box binding protein 1) protein expression had no effect on HDV infection. To assess the kinase activity of *JAK1* in these cell lines, cells were stimulated with IFN- α -2a and the level of phosphorylated STAT1 and STAT3 (pSTAT1 and pSTAT3) proteins was analyzed by western blot. As shown in Fig. 2B, both *JAK1*-KO cells and *JAK1*^{mut} cells were unable to phosphorylate STAT1 and STAT3

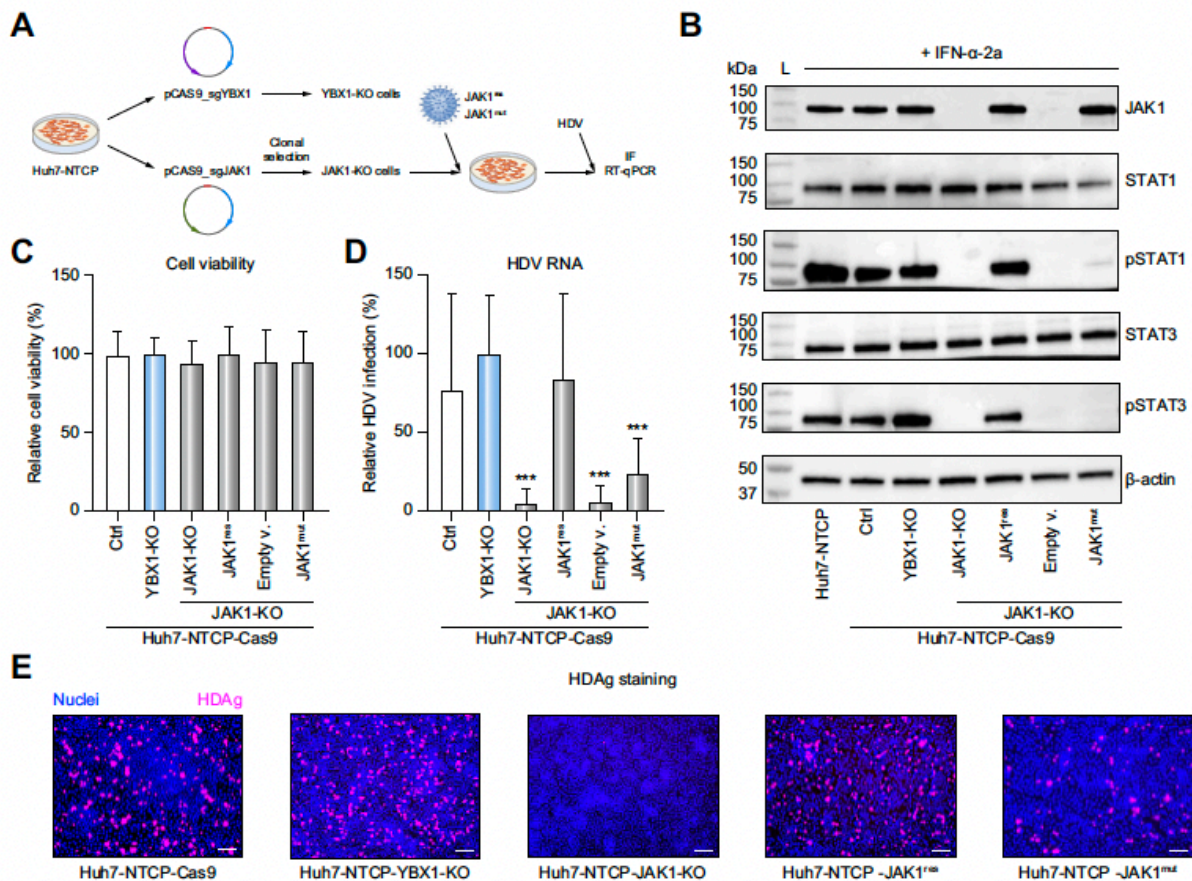


Fig. 2. JAK1 is a key host factor for HDV infection. (A) Generation of the cell lines. (B) Cells were stimulated with IFN- α -2a for 30 min. Expression levels were assessed by western blot. One representative experiment is shown. (C-E) *JAK1* kinase activity is crucial for HDV infection. Cells were infected with HDV at 100 Vge/cell. After 8 days, cell viability was controlled (C) and HDV infection was assessed by RT-qPCR quantification of HDV RNA (D). The results from four independent experiments are presented. Alternatively, HDV infection was assessed by IF (E). One representative experiment is shown. *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney U test). Scale bar: 100 μ m. IF, immunofluorescence; KO, knockout; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR.

JAK1 promotes HDV replication

upon IFN- α -2a stimulation. To validate the role of JAK1 in the viral life cycle, these cell lines were then infected with HDV. HDV infection level was strongly reduced in JAK1-KO cells while the infectious phenotype was rescued in the JAK1^{res} cell line (Fig. 2C-E). Furthermore, no rescue was observed in JAK1^{mut} cells, thus demonstrating the key role of JAK1 kinase activity in the HDV life cycle. To test the impact of clonal selection on cellular susceptibility to HDV infection, Huh7-NTCP-Cas9 and JAK1-KO cells were differentiated for 1 week in DMSO-containing medium (to induce the susceptibility to HBV infection). As shown in Fig. 3B, DMSO-mediated differentiation had no impact on JAK1 expression levels. Cells were then infected with HBV or HDV. As shown in Fig. 3C-F, HDV infection was markedly reduced in JAK1-KO cells compared to control cells while HBV infection level remained similar between the two cell lines, suggesting a comparable susceptibility to HBV and HDV entry in JAK1-KO and control

cells. Taken together, we demonstrated the key role of JAK1 kinase activity in HDV replication.

JAK1 inhibitors exhibit antiviral activity against HDV infection

To investigate the potential of JAK1 as an antiviral target, we tested an FDA-approved JAK1-inhibitor, upadacitinib, used for the treatment of rheumatoid arthritis,²² in comparison with a JAK2-specific inhibitor, fedratinib, another FDA-approved molecule notably used for the treatment of myelofibrosis.²³ Interestingly, only upadacitinib inhibits the phosphorylation of STAT1 and STAT3 upon IFN- α -2a stimulation in Huh7-NTCP cells (Fig. 4A), suggesting no impact of fedratinib on JAK1 activity at the tested concentrations. We next assessed the effect of these compounds on HDV infection by treating cells with the inhibitors 24 h prior to viral inoculation and for 8 days

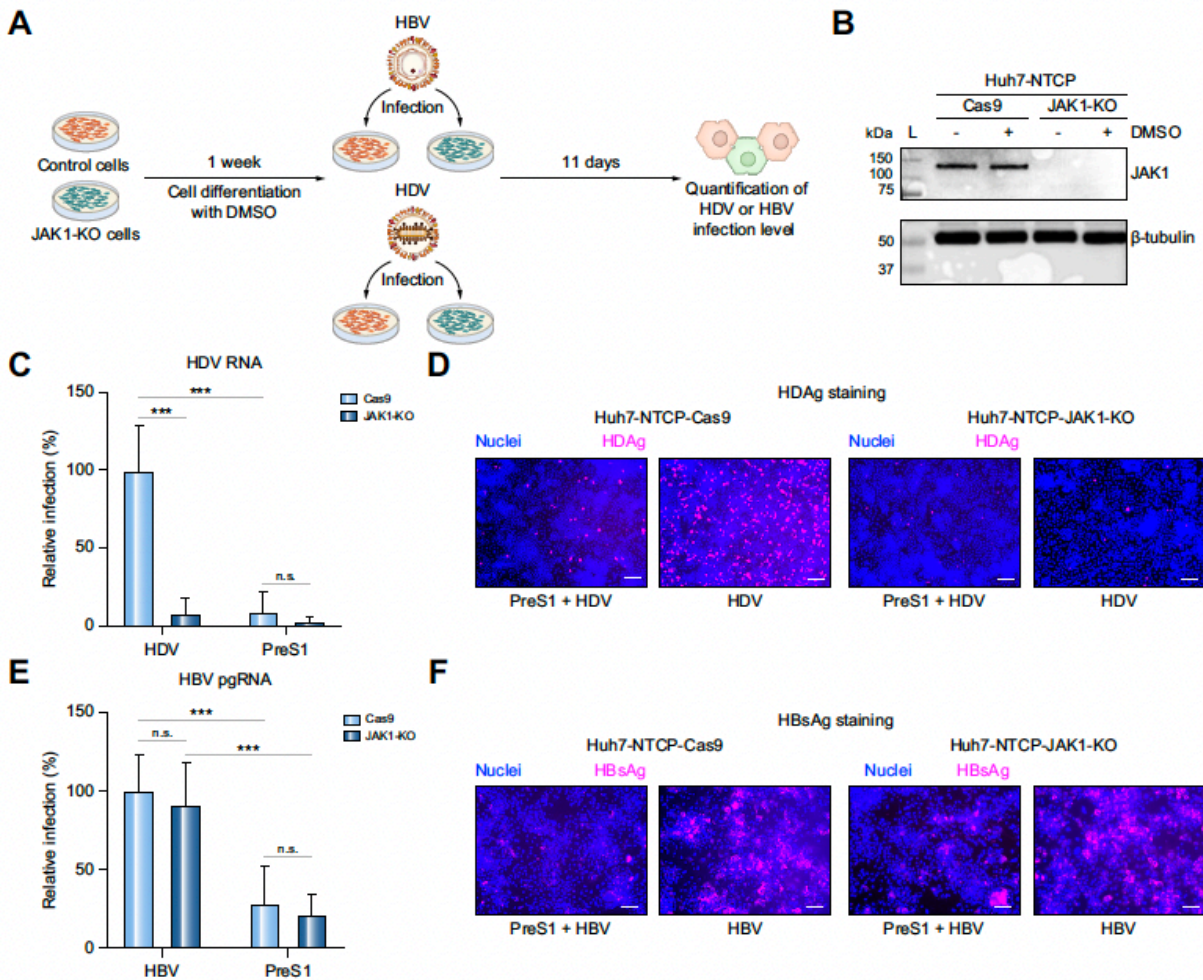


Fig. 3. JAK1-KO does not affect viral entry. (A) Experimental strategy. (B) Control of JAK1 expression by western blot. (C-D) JAK1-KO inhibits HDV infection. HDV infection was quantified by RT-qPCR from three independent experiments (C) or by IF (D). (E-F) JAK1-KO does not affect HBV infection. HBV infection was assessed by RT-qPCR from three independent experiments (E) or by IF (F). ****p* < 0.001 (Mann-Whitney *U* test). Scale bar: 100 μ m. IF, immunofluorescence; KO, knockout; pgRNA, pregenomic RNA; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR.

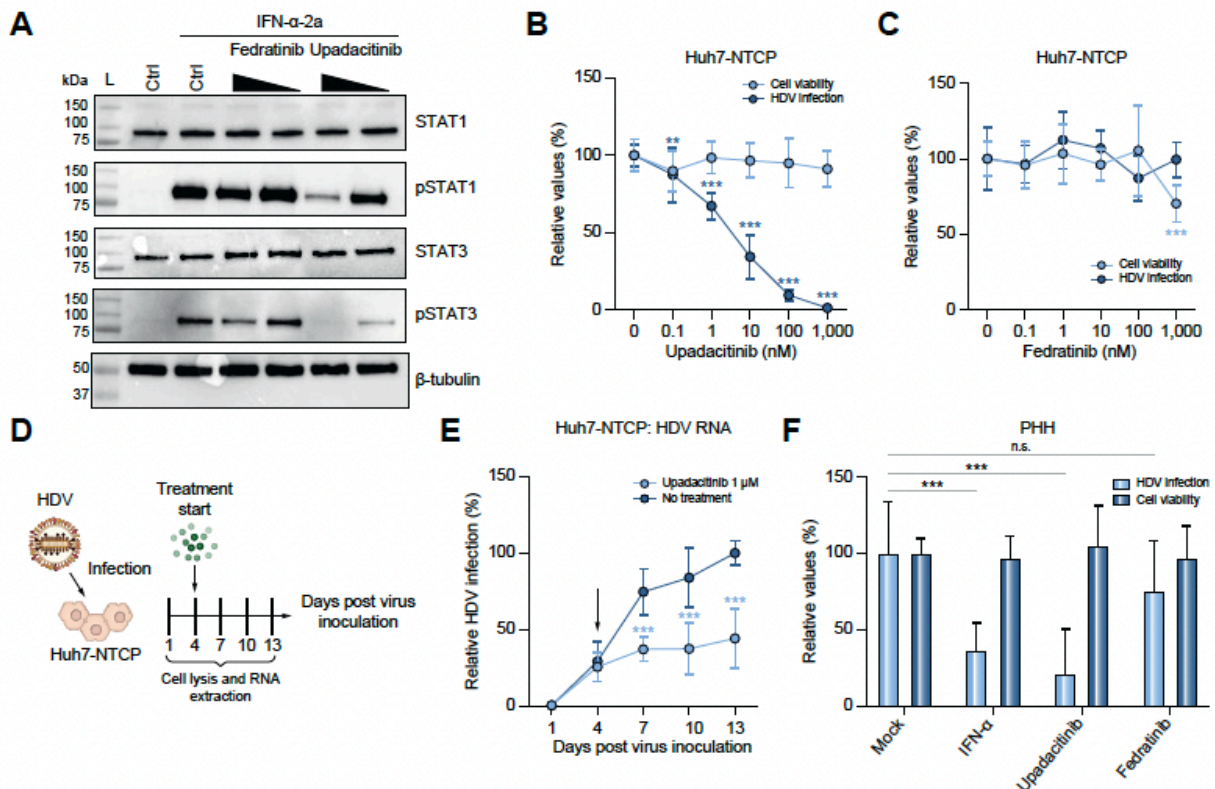


Fig. 4. Upadacitinib inhibits HDV replication. (A) STAT1 and STAT3 phosphorylation levels upon 30 min treatment with IFN- α -2a and either upadacitinib or fedratinib (100 nM or 1 μ M) were assessed by western blot. (B-C) Antiviral activity of JAK inhibitors. Cell viability and HDV infection were assessed after 8 days in infected Huh7-NTCP pretreated for 24 h with increasing doses of either upadacitinib (B) or fedratinib (C) from four independent experiments. Treatment duration: d(-1)-8. (D-E) Upadacitinib inhibits HDV infection after initiation of viral replication. Huh7-NTCP cells were infected with HDV and treated with 1 μ M upadacitinib after inoculation. Treatment duration: d4-13 after virus inoculation. HDV infection was assessed by RT-qPCR after 1, 4, 7, 10 and 13 days from three independent experiments. (F) Upadacitinib inhibits HDV infection level in PHHs. PHHs were infected with HDV and treated with 1 μ M upadacitinib or fedratinib. Treatment duration: d1-8. After 8 days, HDV infection was assessed by RT-qPCR from four independent experiments. *** p < 0.001, ** p < 0.01 (Mann-Whitney U test). PHHs, primary human hepatocytes; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR.

of infection. As shown in Fig. 4B,C, only upadacitinib dose-dependently inhibited HDV infection by contrast with fedratinib. Moreover, upadacitinib treatment at various stages post viral inoculation dose-dependently inhibits HDV infection levels (Fig. S2A-C). This is notably illustrated by the marked inhibition of viral replication by 1 μ M upadacitinib administered 3 days post infection (Fig. 4D,E), suggesting an impact on the replication of the virus even after its initiation. To eliminate any non-specific effect in the observed antiviral activity of upadacitinib, Huh7-NTCP-Cas9, JAK1-KO, and JAK1^{Res} cells were infected with HDV (Fig. S2D,E) and treated with increasing doses of upadacitinib. Upadacitinib dose-dependently inhibited HDV infection in the control and the JAK1^{Res} cells. By contrast, upadacitinib treatment had no effect on the relative levels of HDV infection observed in JAK1-KO cells, thus confirming that upadacitinib's antiviral activity against HDV infection was JAK1 dependent. Interestingly, the antiviral potential of upadacitinib was also validated in HDV-infected PHHs (Fig. 4F). Of note, two other JAK1-specific inhibitors, oclacitinib and filgotinib (Fig. 5A), also inhibited HDV infection in both HDV-infected Huh7-NTCP cells (Fig. 5B) and PHHs (Fig. 5C,D). Finally, since JAK/STAT signaling pathways are known to be modulated by

several viruses,^{19,24} we evaluated the impact of JAK1 inhibition in additional infection models. As shown in Fig. S3, contrary to its effect on HDV infection, upadacitinib treatment exhibits no antiviral activity against HCV, HBV, nor SARS-CoV-2, suggesting a specific interaction between HDV and the kinase. Taken together, our results highlight the specific antiviral potential of JAK1 inhibitors on HDV infection.

JAK1 proviral activity is independent of the MDA5-mediated innate immune response and the activation of STAT3

JAK1 plays a key role in the transduction of the type I IFN signal. In this context, HDV RNA is recognized by the innate immune sensor MDA5 leading to the activation of the type I and III IFN pathways and the JAK1-mediated induction of ISG expression.¹¹ We first hypothesized that the proviral activity of JAK1 may be linked to the induction of proviral ISG upon infection, like MOV10, known to be involved in the HDV life cycle.²⁵ Thus, we first aimed to assess the innate immune response after HDV infection in two cellular models, Huh7-NTCP and HepG2-NTCP cells, the latest being known to express ISG upon HDV infection.¹¹ *RSAD2* was selected as the

JAK1 promotes HDV replication

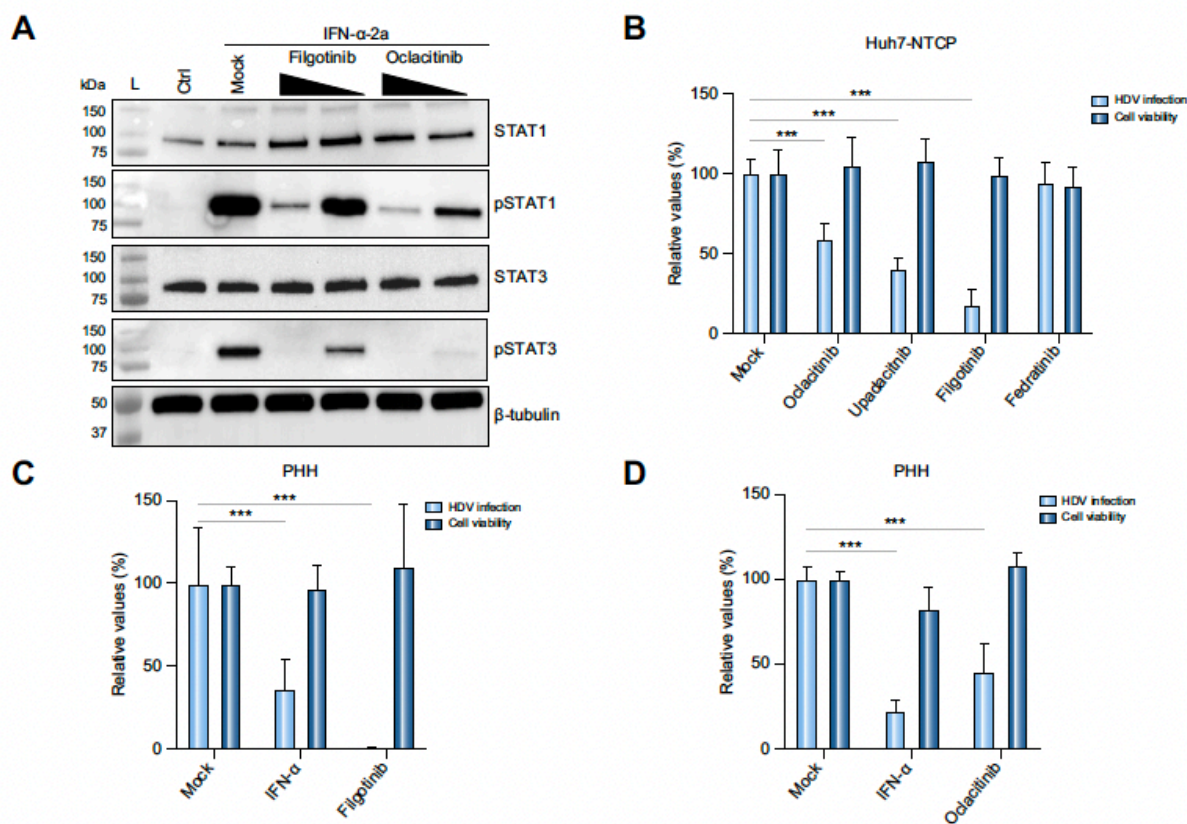


Fig. 5. JAK1 inhibitors specifically inhibit HDV infection. (A) STAT1 and STAT3 phosphorylation levels upon 30 min treatment with IFN- α -2a and either filgotinib or oclacitinib (100 nM or 1 μ M) were assessed by western blot. (B) Cells were infected with HDV and treated with the different inhibitors at 1 μ M. HDV infection was quantified by RT-qPCR after 8 days from four independent experiments. (C-D) PHHs were infected with HDV and treated with 1 μ M of inhibitor or with IFN- α -2a as a control. Treatment duration: d1-8. HDV infection was quantified by RT-qPCR from four (filgotinib, panel C) and three (oclacitinib, panel D) independent experiments. *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney U test). PHHs, primary human hepatocytes; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR.

most upregulated ISG upon HDV infection *in vitro*.¹³ As shown in Fig. 6A,B, no induction of *RSAD2* expression was observed in Huh7-NTCP cells in contrast to HepG2-NTCP cells, confirming a previous result suggesting no type I IFN response upon HDV infection in Huh7-NTCP cells.¹¹ Interestingly, *JAK1-KD* in HepG2-NTCP cells is also associated with inhibition of HDV infection (Fig. 6C-F) despite a differential innate immune activation compared to Huh7-NTCP cells. In the same manner, upadacitinib inhibits HDV infection in HepG2-NTCP with an IC_{50} lower than 1 nM (Fig. S4A), suggesting the existence of an innate immunity-independent proviral activity of JAK1. We next aimed to validate this observation in a more relevant model for innate immune pathways and took advantage of differentiated HepaRG (dHepaRG) cells, with *IFIH1* (encoding MDA5) KO.¹³ We first confirm the importance of MDA5 for the expression of ISG upon HDV infection (Fig. 6G). Interestingly, upadacitinib treatment in HDV-infected dHepaRG wild-type cells and dHepaRG-MDA5-KO cells revealed a comparable antiviral activity of this inhibitor (Fig. 6H), reinforcing the hypothesis of an independence between JAK1 proviral activity and the HDV-induced innate immune response. Thus, we hypothesized that the proviral activity of JAK1 may be associated with STAT3 activation, as it was previously demonstrated that L-HDAg can

activate STAT3 through oxidative stress independently of the IFN-mediated response.¹⁶ Although we confirmed STAT3 activation in HDV-infected Huh7-NTCP cells and to a lesser extent in HDV-infected HepG2-NTCP cells (Fig. S4B,C), STAT3 activation was no longer observed in HDV-infected dHepaRG-MDA5-KO cells (Fig. 6I), suggesting that the IFN-independent STAT3 activation by HDV was specific to the Huh7 or HepG2 background. As upadacitinib still exhibits an antiviral activity in absence of ISG expression and STAT3 activation in the dHepaRG model, our results highlight a proviral activity of JAK1 independent of the innate immune response and pro-inflammatory factors activated by the virus upon infection.

JAK1 promotes HDV replication through ERK1/2 activation

As a major kinase involved in many cellular processes, we hypothesized that JAK1 could affect HDV replication, especially S-HDAg phosphorylation at serine 177 (Ser177), which is known to be crucial for HDV replication.²⁶ To assess the impact of JAK1 activity on HDV replication, Huh7-NTCP cells with altered *JAK1* expression were transfected with a plasmid expressing S-HDAg to avoid the effect of JAK1

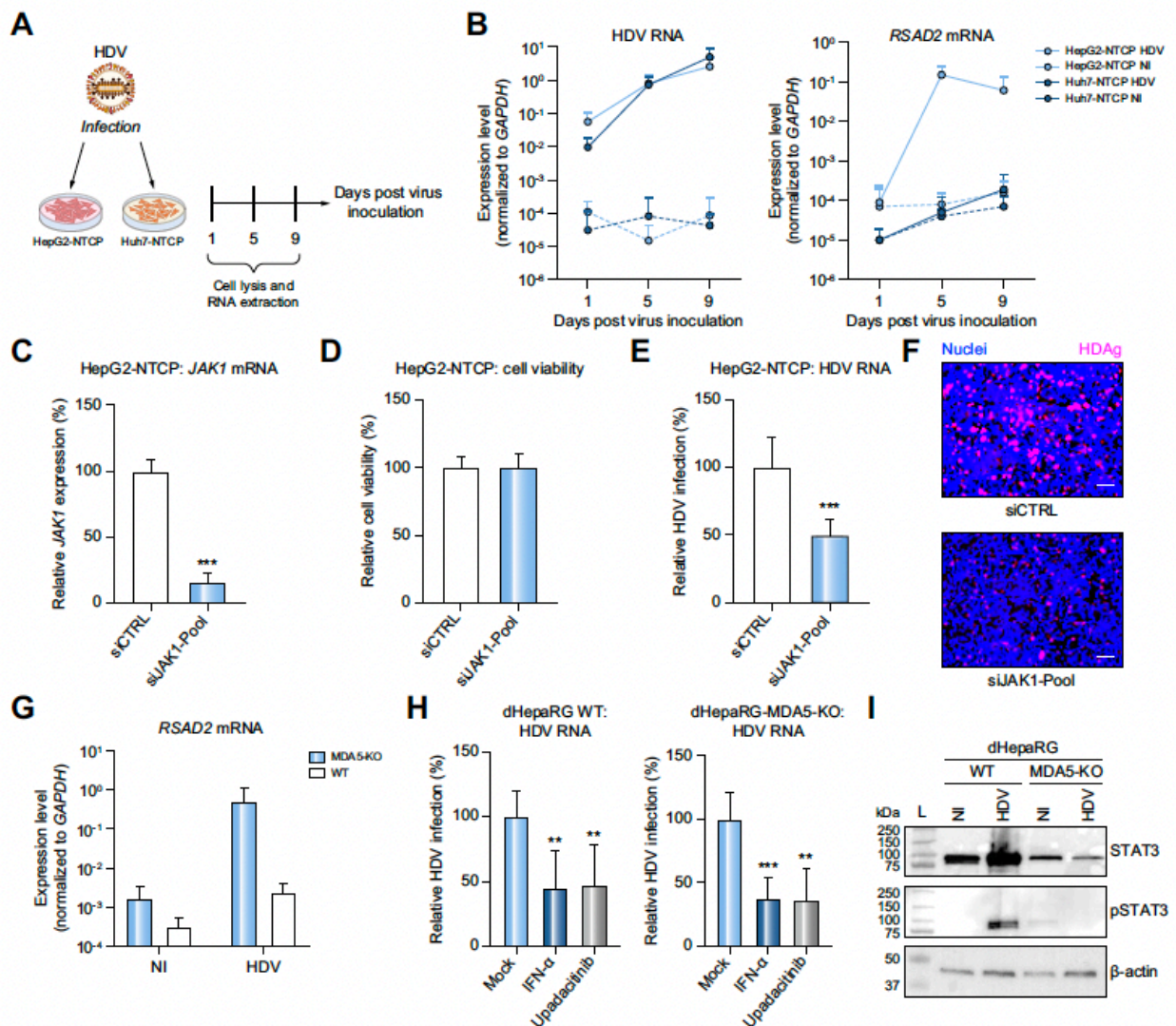


Fig. 6. Provirial activity of JAK1 is independent of the innate immune response and STAT3 activation. (A-B) ISG expression in HDV-infected cells. Huh7-NTCP and HepG2-NTCP cells were infected with HDV; *RSAD2* expression as well as HDV RNA levels were quantified by RT-qPCR at the indicated time points post infection. Results are expressed as means + SD log₁₀ relative expression level normalized to *GAPDH* expression from three independent experiments. (C-F) *JAK1*-KD in HepG2-NTCP cells was performed as described above. *JAK1* expression (C) and cell viability (D) were assessed and HDV infection was quantified by RT-qPCR from three independent experiments (E) or by IF (F). (G-I) Upadacitinib inhibits HDV infection in dHepaRG WT- and MDA5-KO cells. HDV-infected cells were treated with 1 μ M of upadacitinib or with IFN- α -2a. Treatment duration: d1-8. *RSAD2* expression (G) and HDV infection (H) were quantified in both cell lines by RT-qPCR from four independent experiments. pSTAT3 expression was assessed by western blot in HDV-infected cells 8 days after virus inoculation (I). *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U* test). Scale bar: 100 μ m. IF, immunofluorescence; KO, knockout; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR; SD, standard deviation; WT, wild-type.

on HDV replication that would affect HDV Ag expression levels in an infectious context. HDV Ag phosphorylation was assessed by co-immunoprecipitation using an anti-phospho-serine antibody (Fig. 7A). Analysis of HDV Ag phosphorylation indicated that *JAK1* depletion was associated with a loss of S-HDV Ag phosphorylation; either in *JAK1*-KO (Fig. 7B) or *JAK1*-KD (Fig. 7C) cells. Similar results were obtained by co-immunoprecipitation with an anti-HDV Ag antibody followed by detection of phosphorylated peptides by western blotting using the anti-phospho-serine antibody (Fig. 7D-F). As a technical control,

no phosphorylated S177A S-HDV Ag was detected (Fig. 7G-H), strongly suggesting that the pS177 is the major phosphorylation site detectable through our approach. To validate this observation in an infection model, we treated HDV-infected Huh7-NTCP cells with 1 μ M upadacitinib 4 days after viral inoculation, as described in Fig. 4E and Fig. S2B, to avoid too pronounced an inhibition of HDV Ag synthesis by the drug. Upadacitinib treatment was associated with a decrease in S-HDV Ag phosphorylation levels at day 7 and 10 after viral inoculation, confirming our previous observations (Fig. S5).

JAK1 promotes HDV replication

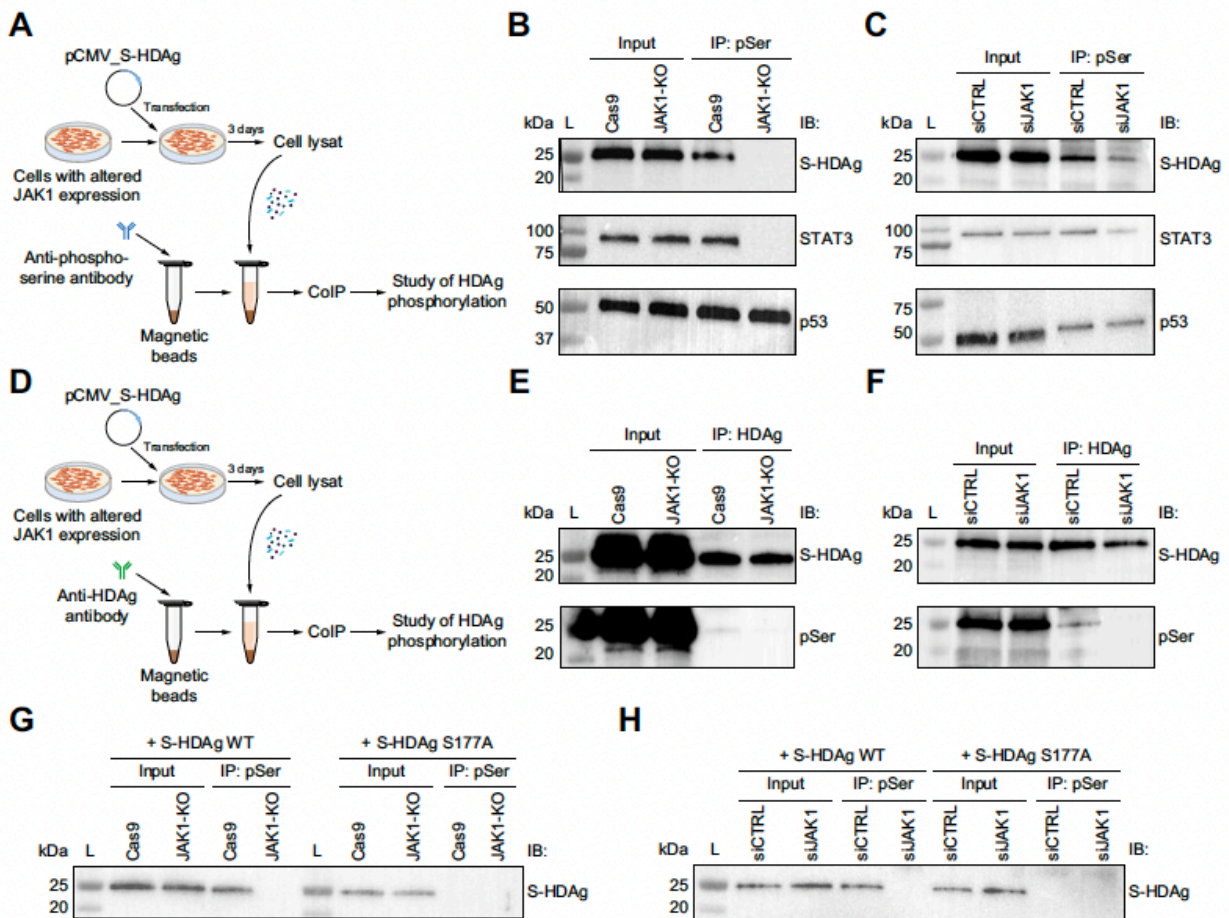


Fig. 7. Provirial activity of JAK1 is associated with a modulation of S-HDAg phosphorylation. (A-C). HDAG phosphorylation in HDAG-expressing cells determined by co-IP with an anti-phospho-serine antibody (pSer). Experimental strategy is presented in (A). (B-C) S-HDAg expression in the original cell lysate (input) and in the IP eluates (IP) was assessed by western blot in JAK1-KO (B) or KD (C) cells. STAT3 (positive control) or P53 (negative control) expression was determined for each sample. (D-F) Similar assays with co-IP performed using an anti-HDAg antibody. (G-H) Similar assays in cells expressing S177A HDAG. Co-IP assays were performed using an anti-phospho-serine antibody. S-HDAg expression was assessed by IB. Co-IP, co-immunoprecipitation; IB, immunoblot; IP, immunoprecipitation; KD, knockdown; KO, knockout; L-HDAg, large delta antigen isoform; S-HDAg, small delta antigen isoform.

Given that JAK1 is a tyrosine kinase and due to the absence of tyrosine residues in the sequence of HDAG, we then hypothesized the involvement of an intermediate kinase that could phosphorylate HDAG upon a JAK1-dependent activation. To assess the impact of JAK1 depletion on the activity of cellular kinases, we performed a human phospho-kinase array using control and JAK1-KO cells. We had a particular focus on ERK1/2 and p38 α that have been described as major kinases phosphorylating HDAG Ser177.²⁷ As shown in Fig. 8A and in Fig. S6A, among the analyzed kinases, no phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) was detected in JAK1-KO cells, while a slight decrease was observed in phosphorylated p38 α levels. No other major variation between the tested kinases was observed, except AKT1/2/3 in Array B. We then focused on pERK1/2 for further analyses. To link ERK1/2 activity and HDV infection in a JAK1-KO context, we first tested whether interleukin-6 (IL-6) stimulation could rescue pERK1/2 levels, as IL-6 is a documented activator of mitogen-activated protein

kinases.²⁸ As shown in Fig. 8A, IL-6 treatment does restore pERK1/2 levels in JAK1-KO cells, a result confirmed by western blot (Fig. 8B and Fig. S6A), suggesting a regulation of ERK1/2 phosphorylation by JAK1. We then confirmed this result with the JAK inhibitors. Interestingly, upadacitinib, but not fedratinib induced a loss of ERK1/2 phosphorylation in both Huh7-NTCP cells and PHHs (Fig. 8C,D), confirming the importance of JAK1 in the phosphorylation of ERK1/2. More importantly, we showed that the restoration of pERK1/2 levels by IL-6 treatment was associated with a rescue of the HDV infectious phenotype in infected JAK1-KO cells (Fig. 8E,F), suggesting a JAK1-dependent association between pERK1/2 and HDV replication. In line with a previous result linking HDAG Ser177 phosphorylation by ERK1/2 and HDV RNA-RNA polymerase II interaction,²⁷ we observed that a suboptimal dose of upadacitinib (to avoid too pronounced a decrease in HDV RNA levels) was associated with a slight decrease in the interaction between HDV RNA and RNA polymerase II (Fig. S6B-C),

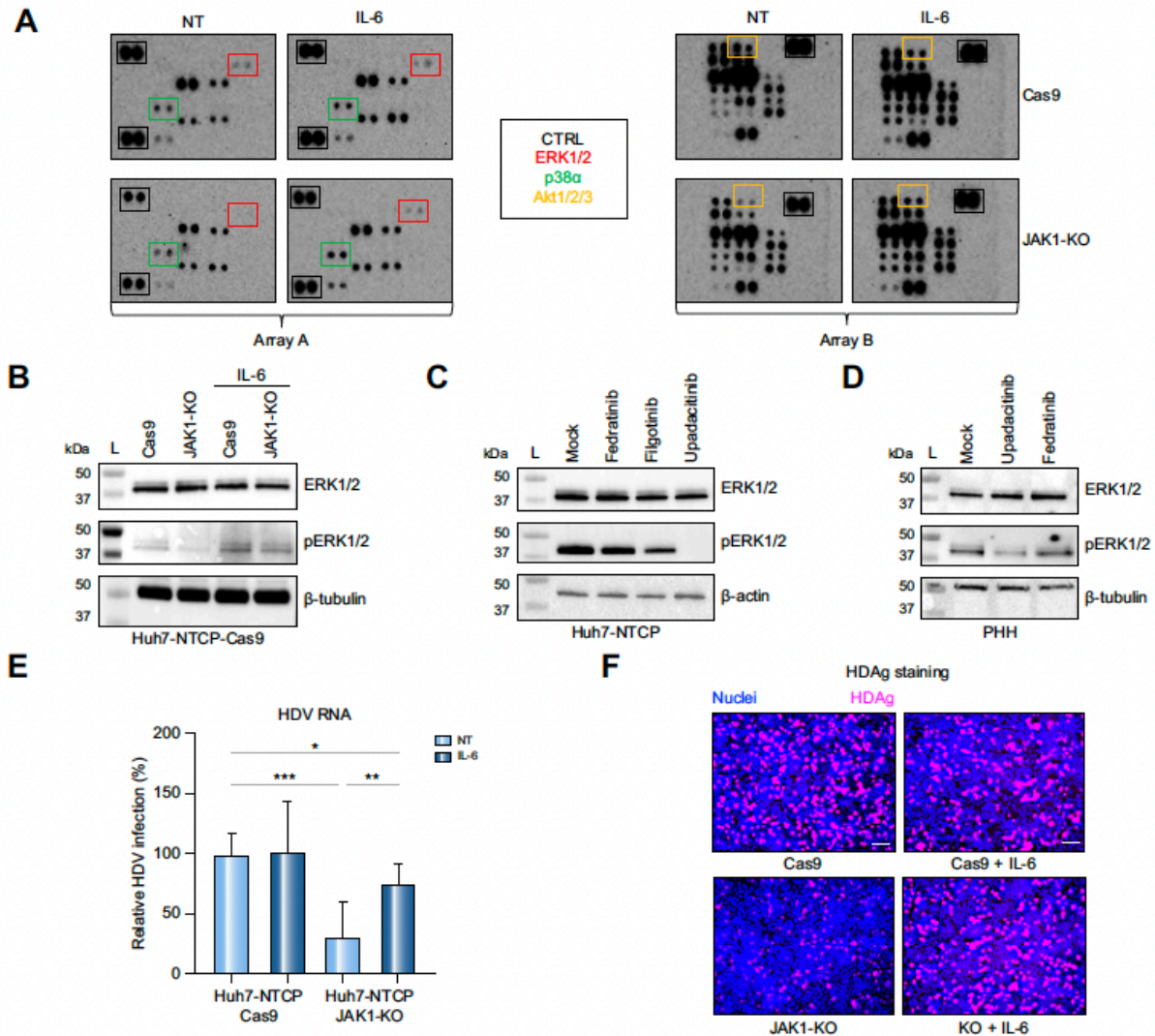


Fig. 8. JAK1 proviral activity is linked to ERK1/2. (A) Human phospho-kinase array in JAK1-KO cells and control cells (Cas9) with or without treatment with IL-6 for 30 min. (B) Validation of pERK1/2 modulation in Cas9 or JAK1-KO cells by western blot. (C-D) Inhibition of JAK1 activity is associated with decreased phosphorylation levels of ERK1/2 *in vitro*. Huh7-NTCP cells (C) or PHHs (D) were treated with 1 μ M of fedratinib, filgotinib or upadacitinib. ERK1/2, pERK1/2 and β -actin or β -tubulin expression levels were assessed by western blot. (E-F) IL-6 treatment restores HDV infection in JAK1-KO cells. Cells were infected with HDV and cultured for 8 days in the absence (NT) or presence of IL-6 (100 ng/ml). HDV infection was assessed by RT-qPCR from three independent experiments (E) or by IF (F) *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U* test). Scale bar: 100 μ m. IF, immunofluorescence; KO, knockout; PHHs, primary human hepatocytes; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative PCR.

although this result would benefit from deeper investigations. Taken together, we demonstrated that the proviral activity of JAK1 is associated with the activation of ERK1/2 and the phosphorylation of S-HDAg, known to be crucial for HDV replication.

Discussion

HDV is responsible for the most severe and aggressive form of chronic viral hepatitis, and currently no treatment results in viral cure in HBV/HDV-coinfected patients. In this context, host-targeting agents have demonstrated great potential as

antivirals for innovative therapy in recent years.²⁹ Previously, we identified a pool of cellular factors important for HDV infection and potential antiviral targets.¹⁸ In this study, we confirmed the importance of one of these candidates, the Janus kinase JAK1 in the HDV life cycle. The unexpected proviral activity of JAK1 was highlighted by: (1) a marked decrease in HDV infection levels upon JAK1 depletion in numerous *in vitro* models including PHHs; (2) the modulation of pERK1/2 and phosphorylated levels of HDV RNA in JAK-KO cells; (3) the efficient antiviral activity of FDA-approved JAK1 inhibitors such as upadacitinib in *in vitro* infection models, including PHHs. Previously, a proviral activity of JAK1 was reported in the context

JAK1 promotes HDV replication

of HIV infection using JAK1-specific siRNA in HeLa-derived cell lines.^{30,31} However, during HIV infection, the proviral role of JAK1 was associated with the activation of STAT1 and STAT3 proteins, which promoted enhanced inflammation and viral replication.³² Thus, our study provides, for the first time, evidence of a virus hijacking a cellular kinase, which is normally involved in the antiviral response, to activate a viral protein and enhance viral replication.

Previous studies demonstrated the importance of S-HDAg in HDV replication.³³ The phosphorylation of S-HDAg mediated by cellular kinases, such as ERK1/2,²⁷ PKR (RNA-activated protein kinase),³⁴ PKC (protein kinase C) or CKII (casein kinase II),³⁵ is essential for the interaction between the RNA polymerase II and HDV RNA. Due to its specific genomic structure, HDV is the only documented virus that hijacks RNA polymerase II activity to synthesize RNA from an RNA matrix.³³ Although it has been demonstrated that S-HDAg participates in the formation of a transcription pre-initiation complex³⁶ and that S-HDAg interacts *in vitro* and *in vivo* with chromatin remodeling complexes, in particular with the bromodomain regulatory protein BAZ2B (bromodomain-associated to zinc finger protein 2B) to recruit the RNA polymerase II on HDV RNA,³³ the mechanisms by which HDAg and cellular factors interact in HDV replication is not yet fully understood. Here, the results of our study demonstrated that JAK1 inhibitors affect the ability of RNA polymerase II to bind HDV RNA, confirming the importance of HDAg phosphorylation in the recruitment of the polymerase for viral replication³⁷ and highlighting a new key cellular factor involved in that process. Interestingly, this result was associated with an apparent decrease in the interaction between HDV RNA and HDAg (Fig. S6). Deeper investigations are needed to determine whether this observation is either due to a lower immunoprecipitation efficacy/lower HDAg expression in the context of upadacitinib treatment or if HDAg phosphorylation status is also important for its interaction with genomic and antigenomic RNA. More generally, additional efforts should be made to determine whether JAK1 is directly responsible for the phosphorylation of ERK1/2 or if other intermediate kinases whose activation can be modulated by JAK1, such as p38- α or Akt1/2/3 (Fig. 8A), are involved in S-HDAg phosphorylation.

JAK1 is a major actor of the innate immune response, which acts as the first line of defense upon viral infection and can be activated in response to several cytokines, notably IFNs.^{38,39} In the case of HDV infection, IFN treatment moderately affects the first stages of the viral life cycle and suppresses HDV RNA amplification during hepatocyte proliferation. Nevertheless, IFN weakly impacts the intra-nuclear HDV replication in resting

cells,⁴⁰ highlighting the complex interaction between HDV and the innate immune response. Notably, the antiviral ISGs targeting HDV replication still need to be identified. So far, only proviral ISGs have been described for HDV (such as MOV10), and our study shed light on another actor of the innate immune response facilitating viral replication, putatively explaining the weak efficacy of IFN treatment in patients and the relative antiviral capacity of both endogenous and exogenous IFN *in vitro*. Interestingly, our results suggest that no activation of JAK1 is required to drive the phosphorylation of HDAg, suggesting the existence of a basal kinase activity of JAK1 in the absence of any stimulation by cytokines.

Recently, JAK inhibitors, already approved in the treatment of rheumatologic, dermatologic, hematologic, and gastrointestinal indications, were tested for the treatment of viral infections, notably for the prevention of cytokine storms during SARS-CoV-2 infection.⁴¹ JAK inhibitors like ruxolitinib and filgotinib have also been proposed as antiviral agents against HIV independently of their original clinical indications.²⁴ Their potential as putative inhibitors of HIV-1 transcription has also been investigated.⁴² Here, the use of such FDA-approved JAK1-inhibitors (upadacitinib, filgotinib), known to be generally safe and effective,²⁴ showed an antiviral potential in different *in vitro* models including PHHs. Our study demonstrated that JAK1 inhibitors are antiviral candidates for pre-clinical studies in the context of HDV infection. However, their investigation in *bona fide in vivo* models is needed to assess their potential for antiviral therapy. Moreover, their interaction with IFN co-treatment should be carefully analyzed, and of note, due to their immunosuppressive properties, JAK1 inhibitors may be associated with increased risk of viral infections in patients.⁴³ Therefore, the antiviral effects of upadacitinib should be evaluated in a meticulous way in the context of HBV/HDV co-infection in preclinical models. Thus, given the existence of intermediate kinases involved in the proviral activity of JAK1, the use of compounds inhibiting downstream pathways, such as mitogen-activated protein kinase inhibitors, should be explored to limit the putative side effects of JAK inhibitors.

In conclusion, by identifying and characterizing JAK1 as a new key host factor for HDV infection, our results significantly improve our understanding of the HDV life cycle and its interactions with the host innate immune response. We also propose a new function of the key innate immunity-related kinase in the absence of apparent stimulation by cytokines. Finally, our findings pave the way to the development of innovative therapeutic strategies to tackle hepatitis D, a global health threat.

Affiliations

¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, Strasbourg, France; ²Institut hospitalo-universitaire (IHU), Service d'hépatogastroentérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ³CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France; ⁴Institut Universitaire de France, Paris, France

Abbreviations

HBsAg, hepatitis B surface antigen; HCC, hepatocellular carcinoma; HDAg, hepatitis delta antigen; IFNs, interferons; IL-6, interleukin 6; IP, immunoprecipitation; ISG, interferon-stimulated genes; JAK1, Janus kinase 1; KD, knockdown; KO, knockout; L-HDAg, large delta antigen isoform; MDA5, melanoma differentiation associated gene 5; PHHs, primary human hepatocytes; RSAD2, radical S-adenosyl methionine domain containing 2; S-HDAg, small delta antigen isoform; siRNA, small-interfering RNA; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Financial support

This work of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), and by SFRI-STRAT*US project (ANR-20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EJRE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. E.R.V. and J.L. acknowledge fundings from Inserm and the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS | Maladies Infectieuses Emergentes, grant numbers ECT2104527, ECT2208589, ECT2102776, and ECT2174555). E.R.V.

acknowledges fundings from the French National Research Agency (ANR, grant number ANR-21-CE15-0035-01 DELTARet). T.F.B acknowledges funding from the European Union (EU ERC-AdG-2014-HEPCIR #671231) and ARC Ther-aHCC2.0 (IHU201901299).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

E.R.V. designed the study and supervised research. M.J.H. performed the functional *in vitro* assays with the support of C.B., L.M.-H., and E.G. for the different technical assays and J.L. for the RIP assay. M.J.H., C.B., L.M.-H., E.G., J.L., C.S., T.F.B., and E.R.V. analyzed the data. E.F., F.G., and P.P. provided human hepatocytes. J.L. provided key material and protocols. M.J.H. and E.R.V. drafted the manuscript and J.L., C.S., and T.F.B. edited it. All the authors approved the manuscript.

Data availability statement

The original data from this study are available through the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

We would like to thank our colleagues Ms. Sarah Durand, Ms. Marine Oudot, and Dr. Emilie Crouchet (Inserm UMR_S1110, Strasbourg, France) for excellent technical support, and Ms. Anne Zeter (Inserm UMR_S1110, Strasbourg, France) for excellent administrative support. We also acknowledge our colleagues Dr. David Durantel (CIRI, Lyon, France) and Dr. Joachim Lupberger (Inserm UMR_S1110, Strasbourg, France) for scientific advice and support. We thank Prof. Olivier Schwartz (Institut Pasteur, Paris, France) for the S-Fuse cells, Dr. Feng Zhang (Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA) for the lentiCRISPR v2 plasmid, Prof. Franck V. Chisary (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) for the Huh7.5.1 cells, Prof. Eberhard Hildt (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Germany) for the HepAD38 cells, and Prof. Stefan Pöhlmann (University of Göttingen, Germany) for the VeroE6-TMPRSS2 cells. We thank Janssen Pharmaceutica (Belgium) for the anti-HDag antibody.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.030>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977;18:997-1003.
- Lucifora J, Delphin M. Current knowledge on hepatitis delta virus replication. *Antivir Res* 2020;179:104812.
- Mentha N, Clément S, Negro F, et al. A review on hepatitis D: from virology to new therapies. *J Adv Res* 2019;17:3-15.
- Wedemeyer H, Negro F. Devil hepatitis D: an orphan disease or largely underdiagnosed? *Gut* 2019;68:381-382.
- Chen H-Y, Shen D, Ji D, et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2019;68:512-521.
- Miao Z, Zhang S, Ou X, et al. Estimating the global prevalence, disease progression, and clinical outcome of hepatitis delta virus infection. *J Infect Dis* 2020;221:1677-1687.
- Niro GA, Ferro A, Cioerchia F, et al. Hepatitis delta virus: from infection to new therapeutic strategies. *World J Gastroenterol* 2021;27:3530-3542.
- Urban S, Neumann-Haefelin C, Lampertico P. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut* 2021;70:1782-1794.
- Heuschkel MJ, Baumert TF, Verrier ER. Cell culture models for the study of hepatitis D virus entry and infection. *Viruses* 2021;13:1532.
- Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: replication and pathogenesis. *J Hepatol* 2016;64:S102-S116.
- Zhang Z, Filzmayer C, Ni Y, et al. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β/λ responses in hepatocytes. *J Hepatol* 2018;69:25-35.
- Williams V, Brichler S, Radjef N, et al. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J Gen Virol* 2009;90:2759-2767.
- Lucifora J, Alfaiate D, Pons C, et al. Hepatitis D virus interferes with hepatitis B virus RNA production via interferon-dependent and -independent mechanisms. *J Hepatol* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.005>. S0168827823000168.
- Lemp FA, Schlund F, Rieble L, et al. Recapitulation of HDV infection in a fully permissive hepatoma cell line allows efficient drug evaluation. *Nat Commun* 2019;10:2265.
- Michelet M, Alfaiate D, Chardès B, et al. Inducers of the NF- κ B pathways impair hepatitis delta virus replication and strongly decrease progeny infectivity *in vitro*. *JHEP Rep* 2022;4:100415.
- Williams V, Brichler S, Khan E, et al. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress: LHDag activates STAT-3 and NF- κ B. *J Viral Hepat* 2012;19:744-753.
- Pugnale P, Pazienza V, Guilloux K, et al. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology* 2009;49:398-406.
- Verrier ER, Weiss A, Bach C, et al. Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* 2020;158-167. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317065>.
- Roca Suarez AA, Van Renne N, Baumert TF, et al. Viral manipulation of STAT3: evade, exploit, and injure. *Plos Pathog* 2018;14:e1006839.
- Raivola J, Haikarainen T, Silvennoinen O. Characterization of JAK1 pseudokinase domain in cytokine signaling. *Cancers* 2019;12:78.
- Verrier ER, Ligat G, Heydmann L, et al. Cell-based cccDNA reporter assay combined with functional genomics identifies YBX1 as HBV cccDNA host factor and antiviral candidate target. *Gut* 2022;2020-323665. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323665>.
- Sehal L, Edwards CJ. Upadacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2019;15:13-25.
- Waksal JA, Tremblay D, Mascarenhas J. Clinical utility of fedratinib in myelofibrosis. *Oncotargets Ther* 2021;ume 14:4509-4521.
- Ezeonwumelu U, Garcia-Vidal E, Ballana E. JAK-STAT pathway: a novel target to tackle viral infections. *Viruses* 2021;13:2379.
- Haussecker D, Cao D, Huang Y, et al. Capped small RNAs and MOV10 in human hepatitis delta virus replication. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:714-721.
- Mu J-J, Chen D-S, Chen P-J. The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication. *J Virol* 2001;75:9087-9095.
- Chen Y-S, Huang W-H, Hong S-Y, et al. ERK1/2-Mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *J Virol* 2008;82:9345-9358.
- Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:241-252.
- Turon-Lagot V, Saviano A, Schuster C, et al. Targeting the host for new therapeutic perspectives in hepatitis D. *J Clin Med* 2020;9:222.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008;319:921-926.
- Zhou H, Xu M, Huang Q, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 2008;4:495-504.
- Appelberg KS, Wallet MA, Taylor JP, et al. HIV-1 infection primes macrophages through STAT signaling to promote enhanced inflammation and viral replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2017;33:690-702.
- Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay J-C, Sureau C, et al. Réplication du génome du virus de l'hépatite delta : un rôle pour la petite protéine delta S-HDag. *médecine/sciences* 2018;34:833-841.
- Chen C-W, Tsay Y-G, Wu H-L, et al. The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. *J Biol Chem* 2002;277:33058-33067.
- Yeh TS, Lo SJ, Chen PJ, et al. Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *J Virol* 1996;70:6190-6198.

JAK1 promotes HDV replication

- [36] Abraham A, Pelchat M. Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis *delta* virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5201–5211.
- [37] Hong S-Y, Chen P-J. 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* 2010;84:1430–1438.
- [38] Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14:315–328.
- [39] Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 2014;505:691–695.
- [40] Zhang Z, Urban S. Interplay between hepatitis D virus and the interferon response. *Viruses* 2020;12:1334.
- [41] Marconi VC, Ramanan AV, de Bono S, et al. Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 2021;9:1407–1418.
- [42] Yeh Y-HJ, Jerike KM, Calvi RM, et al. Filgotinib suppresses HIV-1-driven gene transcription by inhibiting HIV-1 splicing and T cell activation. *J Clin Invest* 2020;130:4969–4984.
- [43] Sunzini F, Mchnes I, Siebert S. JAK inhibitors and infections risk focus on herpes zoster. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2020;12. 1759720X2093605.

Caractérisation de la Janus kinase JAK1 comme facteur d'hôte du virus de l'hépatite D et cible antivirale

Résumé :

L'hépatite D chronique est la forme la plus sévère des hépatites virales chroniques. Elle résulte de la co-infection du foie par le virus de l'hépatite B (HBV) et son virus satellite, le virus de l'hépatite D (HDV). Récemment, l'autorisation en clinique du bulevirtide, un inhibiteur de l'entrée du HBV et du HDV, a démontré le potentiel des molécules ciblant l'hôte pour lutter contre cette infection virale. Dans ce contexte, un criblage de génomique fonctionnelle a identifié 191 facteurs cellulaires proviraux pour le HDV (Verrier et al., Gut 2020), dont la *Janus kinase 1* (JAK1), pourtant acteur majeur de la réponse innée antivirale. Grâce à des expériences de perte de fonction, j'ai validé l'activité provirale inattendue de JAK1 dans le cycle de multiplication du HDV et déterminé son mécanisme d'action à l'aide d'analyses fonctionnelles incluant des expériences de co-immunoprécipitation. Les résultats obtenus ont démontré que l'activité kinase de JAK1 joue un rôle clé dans la réplication du virus. Par ailleurs, les données suggèrent que l'inhibition de JAK1 est associée à une modulation de l'activation des kinases ERK1/2 et de la phosphorylation de la forme courte de l'antigène delta, S-HDAg, cruciale pour la réplication du HDV. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JAK1 déjà approuvés par la FDA, tels que l'upadacitinib, présente un effet antiviral dose-dépendant dans plusieurs modèles *in vitro*, y compris dans les hépatocytes primaires humains (PHH). En conclusion, mes travaux de thèse ont démontré que JAK1 est un facteur cellulaire clé pour l'infection par le HDV et une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'hépatite D.

Mots clés : virus de l'hépatite D, facteur de l'hôte, réplication, traitement antiviral

Abstract:

Chronic hepatitis D is the most severe form of chronic viral hepatitis and results from co-infection of the liver by hepatitis B virus (HBV) and its satellite virus, hepatitis D virus (HDV). The recent clinical approval of bulevirtide, an inhibitor of HBV and HDV entry, demonstrated the potential of host-targeting agents to treat this viral infection. In this context, a functional genomics screen identified 191 proviral cellular factors for HDV (Verrier et al., Gut 2020), including Janus kinase 1 (JAK1), a major actor of the antiviral innate response. Using loss-of-function experiments, I validated the unexpected proviral activity of JAK1 in the HDV life cycle and determined its mechanism of action using several functional analyses, including co-immunoprecipitation experiments. The results demonstrated the key role of JAK1 kinase activity in HDV replication. Furthermore, the data suggest that JAK1 inhibition is associated with modulation of ERK1/2 kinase activation and phosphorylation of the short form of the delta antigen, S-HDAg, crucial for viral replication. Finally, the use of FDA-approved JAK1-specific inhibitors such as upadacitinib shows a dose-dependent antiviral effect in several *in vitro* models, including primary human hepatocytes (PHH). In conclusion, my thesis work demonstrated that JAK1 is a key host factor for HDV infection and a potential therapeutic target for the treatment of hepatitis D.

Keywords: hepatitis D virus, host factor, replication, antiviral therapy