

# LGBC

## Laboratoire de génét et biologie cellu

### « LA PROTÉINE PRÉCORE P22 DU VIRUS DE L'HÉPATITE B HUMAINE : ADRESSAGE VERS LE CYTOPLASME ET FONCTIONS » PAR MARION DURIEZ

**Présentée par : Mlle Marion DURIEZ Discipline : biologie cellulaire Laboratoire :  
LGBC**

Les mécanismes impliqués dans l'établissement de l'infection chronique des hépatocytes par le virus de l'Hépatite B humaine (HBV) ne sont que partiellement connus. Plusieurs observations suggèrent que la protéine Précore d'HBV soit impliquée dans ce processus. Cette protéine est adressée à la voie de sécrétion, suite au clivage du peptide signal une protéine de 22 kDa nommée P22 est délivrée dans le lumen du RE avant d'être maturée en antigène HBe. Par ailleurs, différents auteurs ont observé dans le cytoplasme des protéines de 22 kDa reconnues par les anticorps anti-Précore. Cependant cette forme de Précore dite P22 cytoplasmique (P22-Cyto) n'avait pas été caractérisée. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont visé à isoler et caractériser

P22-Cyto ainsi que le mécanisme permettant son existence, puis à tenter de déterminer la fonction de cette protéine dans la biologie d'HBV.

Dans un premier temps, nous avons montré que P22-Cyto est identique à la protéine P22 présente dans le RE. Une fraction de cette dernière (environ 15%) subit un transport rétrograde via la voie ERAD (pour ER-associated degradation) et échappe à la dégradation par le protéasome afin d'atteindre le cytoplasme. Dans un deuxième temps, les conséquences de ce mécanisme sur la cellule ont été étudiées. Nous avons notamment montré que P22 relocalise la protéine chaperon BiP dans le cytoplasme mais que cette relocalisation ne module pas le rôle de BiP dans la réponse à un stress du RE et n'active pas l'UPR (pour Unfolded protein response). Par ailleurs, en induisant la dégradation des CMH-I (Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I), HBV serait capable d'échapper au système immunitaire et d'établir une infection chronique. En conséquence, le rôle de l'expression de Précore sur une diminution des molécules du CMH-I à la surface d'hépatocytes répliquant HBV a aussi été analysé. Dans un troisième temps, la localisation précise de P22-Cyto dans la cellule a été observée par immunofluorescence dans des hépatocytes répliquant HBV. Nous avons mis en évidence que P22-Cyto est adressée au centrosome via un domaine CTRS-like qui lui est spécifique. Enfin, nous avons cherché à déterminer le mécanisme impliqué dans la diminution de la réplication virale par Précore. Il avait été proposé par Scaglioni et coll. que P22-Cyto soit impliquée dans la formation de pseudocapsides dépourvues en ARN pré-génomique, qui limiteraient la production virale et favoriseraient ainsi l'établissement de la persistance. Nos résultats semblent indiquer que l'expression de Précore diminue la quantité d'ARN pré-génomique encapsidé.

### **Abstract:**

Mechanisms involved in the establishment of hepatocytes chronic infection by Hepatitis B virus (HBV) are partially known. Several observations report a role of Precore protein in this process. This protein is addressed to the secretory pathway and after signal peptide cleavage, a 22 kDa protein called P22 is released in the ER lumen before to be processed and give rise to the HBe antigen. Moreover, different groups have observed a 22 kDa protein in the cytoplasm, which is detected by antibodies directed against Precore. However this Precore protein called cytoplasmic P22 (P22-Cyto) has not been yet characterised. Our goal during this thesis was to isolate and characterize P22-Cyto as well as the mechanism allowing its existence, and then to attempt to understand its function in HBV life cycle.

Firstly, we demonstrated that P22-Cyto is identical to the ER P22 protein. A fraction of P22 (almost 15%) is retrotransported through ERAD (for ER-associated degradation) pathway and escape from the proteasome degradation to reach the cytoplasm. Secondly, the consequences of this process have been explored. We have shown notably that the chaperon BiP protein is delocalised into the cytoplasm along with P22 but this relocalisation is not involved in the control of BiP function in the response to an ER-stress and does not induce an UPR (for Unfolded protein response). By inducing MHC-I (class I Major Histocompatibility Complex) molecules degradation, HBV would be able to escape from the immune system and to establish a chronic infection. Thus, the involvement of Precore synthesis on a downregulation of MHC-I molecules has also been analysed at the cell surface of HBV expressing hepatocytes. Thirdly, intracellular P22-Cyto exact localisation has been observed by immunofluorescence in HBV replicating hepatocytes. We point out that P22-Cyto is addressed to the centrosome through its own specific CTRS-like domain. Finally, we attempt to define the mechanism involved in HBV replication downregulation induced by Precore. Years ago, it has been proposed by Scaglioni et al. that P22-Cyto could be involved in the formation of pseudocapsides devoided of pregenomic RNA, and consequently would reduce viral replication and promote the establishment of viral persistence. Our results indicate that Precore synthesis decreases the quantity of encapsidated pregenomic RNA.