DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **28 mai 2020**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Fleur CHAPUS**

Titre de la thèse : «**Rôle des hélicases à motif DEAD DDX5 et DDX17 dans la maturation des ARN du Virus de l'Hépatite B** »

Résumé

La chronicité du virus de l'hépatite B (VHB) repose sur la persistance de l'ADN circulaire et clos de manière covalente (ADNccc) dans le noyau des hépatocytes infectés. Le génome viral présente une structure chromatinisée sujette à des régulations épigénétiques impactant son activité biologique à différents niveaux. Une meilleure connaissance des facteurs cellulaires orchestrant la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'ADNccc est fondamentale dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la persistance du VHB.

Afin d'identifier les acteurs cellulaires impliqués dans la biologie de l'ADNccc, un ambitieux projet de protéomique de l'ADNccc (ChROP) a été réalisé par le Dr. Barbara Testoni. Parmi les candidats identifiés, les hélicases à ARN DDX5 et DDX17 ont particulièrement attiré notre attention. DDX5 et DDX17 jouent un rôle crucial dans la régulation de la transcription et le métabolisme des ARN. Nous avons donc évalué leur rôle dans la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc et le métabolisme des ARN viraux. Afin d'étudier de manière précise les différents transcrits du VHB, une technique de 5' RACE a été mise au point au laboratoire par le Dr. Bernd Stadelmayer, et a fait l'objet d'une publication. Cette technique a permis l'étude des ARN du VHB dans un contexte de déplétion des hélicases DDX5 et DDX17.

Par ailleurs, DDX5/17 appartiennent au complexe insulateur de CCCTC-binding protein (CTCF). Nous avons donc en parallèle étudié le rôle de CTCF dans la biologie de l'ADNccc et le métabolisme des ARN viraux.

Dans des cellules HepG2-NTCP et des hépatocytes primaires humains infectés par le VHB, la répression de DDX5/17 entraine un raccourcissement de tous les ARN viraux. Des séquençages de dernière et troisième génération ont permis l'identification de variants d'épissage alternatif ainsi qu'une utilisation différentielle du site de polyadénylation lors de la transcription des transcrits viraux. Des expériences d'immunoprécipitation de l'ARN ont montré que DDX5 et DDX17 s'associent directement aux ARN viraux et recrutent CPSF6 et NUDT21, deux facteurs impliqués dans le choix du site de polyadénylation. L'ensemble de ces données met donc en lumière un rôle essentiel de DDX5 et DDX17 dans la maturation des ARN viraux, notamment par le recrutement de deux facteurs de terminaison sur les transcrits viraux, entrainant le maintien d'un cycle réplicatif approprié.

Par ailleurs, nous avons identifié des sites de liaison de CTCF sur le génome du VHB et par mutagénèse dirigé, nous avons mis en évidence que la mutation de ces sites impacte le recrutement de CTCF et de DDX5/17 sur l'ADNccc et affecte métabolisme des ARN viraux.

Mots clés : Virus de l'hépatite B, ADNccc, métabolisme des ARN, Hélicases à ARN à motif DEAD, CTCF, 5' RACE, ChROP