



HAL
open science

Interaction du virus de l'hépatite E avec la réponse interféron de l'hôte.

Eugénie Bagdassarian

► **To cite this version:**

Eugénie Bagdassarian. Interaction du virus de l'hépatite E avec la réponse interféron de l'hôte.. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS266 . tel-02343178

HAL Id: tel-02343178

<https://theses.hal.science/tel-02343178>

Submitted on 2 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Interaction du virus de l'hépatite E avec la réponse interféron de l'hôte

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 19 octobre 2017 par

Eugénie Bagdassarian

Composition du Jury :

Pr. ROQUE-AFONSO Anne-Marie PU-PH, AP-HP, Hôpital Paul Brousse (UMR785)	Présidente du jury
Dr. COCQUEREL Laurence DR2 CNRS, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (U1019-UMR 8204)	Rapporteuse
Dr. GERLIER Denis DR1 CNRS, Centre international de recherche en Infectiologie (U758)	Rapporteur
Dr. ABRAVANEL Florence MCU-PH, CHU de Toulouse (Laboratoire de virologie)	Examinatrice
Dr. BIACCHESI Stéphane CR1 INRA, INRA Jouy en Josas (VIM-UR892)	Examineur
Dr. DOCEUL Virginie CR2 INRA, INRA Jouy en Josas (UMR 1161 Virologie)	Co-encadrante
Dr. JOUVENET Nolwenn CR1 CNRS, Institut Pasteur (UMR 3569 CNRS Paris 7)	Co-encadrante
Dr. PAVIO Nicole DR2 ANSES, ANSES Laboratoire de santé animale (UMR 1161 Virologie)	Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le programme PREDEMICS qui a permis le financement de ce projet ainsi que le DIM Malinf de la région Ile de France qui a financé mes trois années de doctorat.

J'exprime ma gratitude aux membres de mon jury de thèse : les Dr. Laurence Cocquerel et Dr. Denis Gerlier qui ont accepté de relire et apporter des corrections à mon manuscrit de thèse. Merci également aux Dr. Florence Abravanel, Dr. Stéphane Biacchesi et Pr. Anne-Marie Roque-Afonso qui ont accepté d'être examinateurs le jour de ma soutenance de thèse.

Ma reconnaissance va en priorité à mon équipe encadrante. Merci à ma directrice de thèse, Nicole Pavio de m'avoir donné ma chance en master puis en thèse au sein de ton équipe, et de m'avoir encadrée et aidée au cours de ce travail. Merci pour toutes les petites attentions et le temps consacré aux corrections de mon manuscrit y compris pendant tes vacances. Merci à Virginie Doceul, qui m'a encadrée durant mon stage de master et ces trois années de thèse. Le chemin fut difficile mais tu as su me guider tout au long du parcours. Ton aide fut précieuse et notamment ces derniers mois, où tu as consacré beaucoup de temps pour voir aboutir le projet. Ta patience, nos discussions scientifiques autour du projet et ta confiance m'ont permis d'avancer. Merci également à Nolwenn Jouvenet pour m'avoir guidée vers ce laboratoire en master, pour avoir suivi l'évolution de ma thèse avec optimisme et pour tes encouragements.

Je n'oublie pas les autres membres de l'équipe hépatite E qui tous m'ont donné de leur temps au cours de ces trois années. A Antonin, Aurore D. et Martin, merci de toute l'aide que vous avez pu m'apporter. Un grand merci également à Marie Pellerin. Tu es arrivée il y a quelques mois seulement dans l'équipe mais tu es déjà d'une aide très précieuse, que ce soit au niveau des manip de fin de thèse mais aussi pour le moral! Merci pour ta bonne humeur et pour tes blagues (et merci pour le vélo !).

Aux membres de l'équipe I⁵, qui m'ont beaucoup aidé au cours de ces trois années. Merci à Damien pour toute l'aide que tu as pu m'apporter que ce soit au niveau de tout le matériel dont j'ai pu disposer mais également au niveau des discussions scientifiques (ou non !). Merci à Gregory pour tes conseils et ta disponibilité. Merci à Aurore F. pour tous les bons moments passés que ce soit au labo ou en dehors, notamment quand on tournait le film pour la thèse de Julie (Rocky en western blot !).

Aux occupants du bureau des étudiants : Merci à Cindy d'avoir toujours été là pour m'écouter, pour ton soutien permanent, pour toutes les bonnes soirées qu'on a pu passer à boire des « acide passion » et pour nous avoir fait découvrir la « pizza-brioche » ! Merci à Marie Pourcelot pour tous tes précieux conseils qui m'ont été très utiles pendant la rédaction de ma thèse. Merci à Mazigh pour tes blagues (pas forcément très drôles !) et pour les madeleines ! Merci à Manon, mon ancienne voisine de bureau, j'espère que tu trouveras une thèse dans un laboratoire qui te plaît, ou mieux encore, que tu puisses revenir ici. A vous tous merci de votre soutien et vos encouragements, j'ai passé trois années mémorables !

Je remercie également Stephan Zientara et Jennifer Richardson, qui font de ce laboratoire un lieu si convivial ! Merci à Cécile pour ton aide dans les galères administratives de l'université Paris Saclay et de l'école doctorale. Merci à Sandra, Anthony et Kamila, c'est toujours un plaisir d'échanger quelques mots avec vous quand vous passez à Bressou. Merci à Houssam et Fao pour votre gentillesse et vos précieux conseils. Merci à Sophie, Yves, Fleur, Georges, Gaëlle et Steeve pour nos bavardages entre deux manips. Merci à Marine d'avoir réussi pendant quelques temps à me motiver à retourner en salle de sport (oui oui je vais m'y remettre !) et pour toutes nos conversations sur les vélos ! Merci à Rose pour ta bienveillance et ton aide. Merci à Françoise et Pascale pour toute l'aide administrative que vous m'avez apportée pendant toutes ces années.

Merci à tous les membres de l'UMR Virologie, j'ai passé trois années formidables grâce à vous !

Une pensée pour les anciens membres de l'UMR. En particulier à Chloé et Alex, l'ancienne équipe Borna, merci pour tous les fous rires que l'on s'est pris dans le bureau des étudiants et pour toutes les bonnes soirées passées en votre compagnie ! A Annabelle, merci pour ton amitié, ton soutien sans failles et pour ta bonne humeur contagieuse. Les sorties que l'on fait ensemble sont toujours au top (merci de m'avoir fait découvrir les festivals électro !). A Julie, merci pour tous les bons moments que nous avons passés dans le bureau des étudiants, ça a été dur quand tu es partie (on ne s'en est toujours pas remis avec Aurore !), à boire des verres, pendant nos séances de courses à pieds autour du stade ou à la piscine (quand on arrivait à se motiver toutes les deux !) et pour avoir été là pour moi quand j'en avais le plus besoin. Tu as été un exemple pour moi dans ton efficacité pour rédiger ta thèse et tu continues à l'être dans ta recherche d'emploi fructueuse, encore félicitations pour le CDI !

A mes collègues du master Biosciences : A Benjamin, pour tous les bons souvenirs que je garde de notre stage de M1 et surtout notre premier stage (ou vacances ?) de M2 en Floride. Même si on ne se voit plus beaucoup depuis que je suis à Paris, c'est toujours un plaisir de te revoir et d'échanger nos anecdotes de thèse. A Perrine, pour les sorties concert qui m'ont permis de me changer les idées pendant ma thèse. A Alice, nous avons tant partagé ensemble ! Que ce soit les vacances en Grèce avec Myrto, notre super appart à la bnf où on se faisait des bons petits plats (notre colocation me manque), les séances de shopping, les sorties dans les bars ou brasseries et les heures passées au téléphone à échanger sur nos difficultés en thèse.... Merci d'avoir toujours été là pour moi.

A ma famille, vous comptez tous énormément pour moi. A mes parents qui m'ont toujours aidé pour que je puisse faire de bonnes études, je vous remercie du fond du cœur, je n'en serais pas arrivée là sans vous. Merci aussi pour vos encouragements et pour votre amour. Merci à ma grande sœur Michèle, toujours là pour me changer les idées dans les moments difficiles. A mon petit frère Alexandre et ma petite sœur Félicia, j'espère avoir plus de temps pour vous après ma thèse. Merci également à mon beau-frère Nicolas.

A France, Jean-Pierre, Anne-Sophie et Baptiste, merci de m'avoir accueillie dans votre famille et pour toutes les journées agréables passées en votre compagnie.

A Benoît, nous nous sommes rencontrés il y a plus d'un an maintenant, tu m'as soutenue pendant toute ma dernière année de thèse, ça n'a pas toujours été facile mais tu as su être là pour moi. Je t'aime.

Et j'en oublie sûrement, mais du fond du cœur je vous adresse à toutes et à tous mille mercis.

Liste des abréviations

A

Ad5 : Adenovirus 5
ALT : Alanine aminotransferase
AMBP : α 1-microglobulin/bikunin precursor
ANDV : Andes virus
ARNsb : ARN simple brin
ARNdb : ARN double brin
ASFV : African swine fever virus/ Virus de la peste porcine africaine
ASLV : Avian sarcoma leukosis virus/ Virus de la leucose aviaire
ATP : Adénosine Triphosphate

B

BDAC-2 : Blood DC antigen 2
BDV : Borna disease virus/ Virus de la maladie de Borna
BNYVV : Beet necrotic yellow vein virus/ Virus des nervures jaunes nécrotiques de la betterave
BoHV-1 : Bovine herpesvirus 1/ Virus de l'héripès bovin 1
bPIV3 : Bovine parainfluenza virus 3/ Virus parainfluenza bovin 3
BSA : Bovine serum albumine
BTV : Bluetongue virus/ Virus de la fièvre catarrhale ovine
BVDV : Bovine viral diarrhea virus/ Virus de la diarrée virale bovine

C

CARD : Caspase activation and recruitment domain
CCFHV : Crimean-Congo hemorrhagic fever virus/ Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
CDV : Canine distemper virus/ Virus de la maladie de Carré
CHPV : Chapare virus
CHKV : Chikungunya virus/ Virus chikungunya

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CSFV : Classical swine fever virus/ Virus de la peste porcine
CTD : C-terminal domain
CVB3 : Coxsackievirus B3

D

DANV : Dandenong virus
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DC : Cellule dendritique
DCIR : DC immunoreceptor
DENV : Dengue Virus/ Virus de la Dengue
DUB : Déubiquitinase

E

E. coli : Escherichia coli
EAV : Equine arteritis virus/ Virus de l'artérite équine
EBOV : Ebola virus
EBV : Epstein-Barr virus/ Virus de l'Epstein-Barr
ECHOV : Enteric cytopathic human orphan virus/ Echovirus
ECTV : Ectromelia virus/ Virus ectromelia
EGFP : Enhanced green fluorescent protein
ELISA : Dosage immune-enzymatique sur support solide/ Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV : Encephalomyocarditis virus/ Virus de l'encéphalomyocardite
ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment
EV : Enterovirus

F

FMDV : Foot-and-mouth disease virus/ Virus de la fièvre aphteuse

G

GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAS : *IFN-γ-activated site*
GBV-B : *GB virus B*
GE : Génome équivalent
GFP : *Green fluorescent protein*
GPCA : *Gaussia luciefrase princeps complementation assay*
GST : *Glutathione sepharose transferase*
GTOV : *Guanarito virus*

H

HBoV : *Human bocavirus/ Bocavirus humain*
hCMV : *human cytomegalovirus/ Cytomegalovirus humain*
Hel : Helicase
HenV : *Hendra virus*
HFV : *Human foamy virus/ virus foamy humain*
hMPV : *human metapneumovirus/ Metapneumovirus humain*
hPIV2 : *Human parainfluenza virus 2/ Virus parainfluenza Humain 2*
HPV : *Human papillomavirus/ Papillomavirus humain*
HRV : *Human Rhinovirus/ Rhinovirus humain*
Hsp : *Heat shock protein*
HSV-1 : *Herpes simplex virus type 1/ Virus de l'herpès simplex de type I*
HTLV-1 : *Human T-Lymphotropic virus/ Virus T-Lymphotrope humain*
HVR : Région hypervariable

I

IAV : *Influenza virus/ Virus influenza*
IF : Immunofluorescence
IFIT1 : *Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*
IFN : Interféron
IFNAR : *Interferon alpha/beta receptor beta chain*
Ig : Immunoglobuline
IFNGR : *Interferon gamma receptor*

IκB : *Inhibitor of NF-κB*
IKK : *Inductible IκB kinase*
IL : Interleukine
IRAK : *IL-1-receptor associated kinase*
IRES : *internal ribosome entry site*
IRF : *Interferon regulatory factor*
ISG : *Interferon stimulated genes*
ISGF3 : *Interferon-stimulated gene factor 3*
ISRE : *IFN-stimulated response element*

J

JAK1 : *Janus kinase 1*
JEV : *Japanese encephalitis virus/ Virus de l'encéphalite Japonnaise*
JUNV : *Junin virus*

K

KPNA : Karyophérine-α
KSHV : *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/ Virus de l'héropès humain 8*

L

LACV : *La Crosse virus/ Virus de LaCrosse*
LASV : *Lassa virus/ Virus de Lassa*
LATV : *Latino virus*
LCMV : *Lymphocytic choriomeningitis virus/ Virus de la chorioméningite lymphocytaire*
LDV : *Lactate dehydrogenase-elevating virus*
LGP2 : *Laboratory of genetics and physiology 2*
LLOV : *Lloviu virus/ Virus Lloviu*
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LUBAC : *Linear ubiquitin assembly complex*
LVJV : *Lujo virus*

M

MACV : *Machupo virus/ Virus de Machupo*
MAL : *MyD88 adaptator like*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MARV : *Marburg virus*

MAVS : *Mitochondrial antiviral signaling*
MCMV : *Murine cytomegalovirus/*
CytomégaloVirus murin
MCV : *Molluscum contagiosum virus/*
Virus molluscum contagiosum
MDA5 : *Melanoma Differentiation-*
Associated protein 5
MENV: *Menangle virus*
MERS-CoV : *Middle-East respiratory*
syndrome coronavirus/ Coronavirus du
syndrome respiratoire du Moyen-Orient
Met : Methyltransferase
MHV : *Mouse hepatitis virus/* Virus de
l'hépatite murine
MI : Multiplicité d'infection
MMTV : *Mouse mammary tumor virus/*
Virus de la tumeur mammaire de la souris
MPRV : *Mapuera Virus*
MPXV : *Monkeypox virus/* Virus de la
variole du singe
MPyV : *Murine polyomavirus*
MRV : *Mammalian reovirus*
MuV: *Mumps virus/* Virus des oreillons
MV: *Measles virus/* Virus de la rougeole
Mx : *Myxovirus resistant protein*
MyD88 : *Myeloid differentiation primary*
response 88

N

NAP-1 : *NF-κB activating kinase associated*
protein 1
NDV : *NewCastle disease virus/* Virus de la
maladie de NewCastle
NEAA : *Non essential amino acids*
NEMO : *NF-κB essential modulator*
NF-κB : *nuclear factor kappa B*
NiV: *Nipah virus*
NK : *Natural killer*
NKLAM : *Natural killer lytic-associated*
molecule
NLR : *normalized luminescence ratio*
NY-1V : *New-York 1 virus/* Virus New-York
1

O

OAS : *2', 5'-oligoadenylate synthétase*
ORF : *Open reading frame/* phase ouverte
de lecture

P

P/S : *Penicilline/streptomycine*
PAMP : *Pathogen-associated molecular*
pattern
PARP : *Poly(ADP-ribose) polymérase*
PBMCs : *Peripheral blood mononuclear*
cells
PBS : *Phosphate buffered saline*
PCBP : *Poly(rc) binding protein*
PCP : *Papaïne-like cystein protease*
PCRq : *Réaction de polymérisation en*
chaîne quantitative/ quantitative
polymerase chain reaction
pDC : *Cellule dendritique plasmacytoïde*
PDCoV : *Porcine deltacoronavirus/*
Deltacoronavirus porcin
PEDV : *Porcine epidemic diarrhea virus /*
Virus de la diarrhée épidémique porcine
PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
PIAS1 : *Protein Inhibitor of Activated STAT*
1
PIV : *Parainfluenza virus/* Virus
parainfluenza
PKR : *Protein kinase regulated by dsRNA*
poly(I:C) : *Acide polyinosinique-*
polycytidylique
PoRV : *Porcine rubulavirus/* Virus de la
rubéole porcine
PP2A : *Phosphatase 2A*
PRR : *Pattern-recognition receptor*
PRRSV : *Porcine reproductive and*
respiratory syndrome virus/ Virus du
syndrome dysgénésique et respiratoire du
porc
PTP : *Protein tyrosine phosphatase*
PV : *Poliovirus*

R

RABV : *Rabies virus/* Virus de la rage
RACK1 : *Receptor of activated protein*
kinase C

RdRp : *RNA dependent RNA polymerase*
RE : Reticulum endoplasmique
RIG-I : *Retinoic acid-inductible gene I*
RIP-1 : *Receptor-interacting protein 1*
RLR : *RIG-I-like receptor*
RNase L : Ribonucléase L
RPV : *Rinderpest virus/ Virus de la peste bovine*
RSV : *Respiratory syncytial virus/ Virus respiratoire syncytial*
RT : *reverse transcription/ Transcription inverse*
RubV : *Rubela virus/ Virus de la rubéole*
RV : Rotavirus

S

SARS-CoV : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus/ Syndrome respiratoire aigu sévère lié au coronavirus*
SABV : *Sabia virus*
SaIV : *Salem virus*
SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel*
SeV : *Sendai virus*
SFTSV : *Severe fever with thrombocytopenia syndrome/ Syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie*
SFV : *Selmiki forest virus/ Virus de la Forêt de Selmiki*
SHFV : *Simian hemorrhagic fever virus/ virus de la fièvre hémorragique Simien*
SINTBAD : *Similar to NAP-1 TBK1 adaptor*
SIRP α : *Signal regulatory protein α*
SIV : *Simian immunodeficiency virus/ Virus de l'immunodéficience simien*
SNV : *Sindbis virus/ Virus Sindbis*
SOCS : *Suppressor of cytokine signalling*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
SUMO : *Small ubiquitine like modifier*
SVF : *Sérum de veau foetal*
SVV : *Simian varicella virus/ Virus de la varicelle Simien*

T

TA : *Température ambiante*
TAB : *TAK1-binding protein*
TAK1 : *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*
TANK : *TRAF-family member-associated NF-K β activator*
TBEV : *Tick-borne encephalitis virus/ Virus de la méningo-encéphalite à tiques*
TBK1 : *TANK binding kinase 1*
TBS : *Tris buffered saline*
TGEV : *Transmissible gastroenteritis coronavirus*
THOV : *Thogoto virus*
TioPV : *Tioman virus*
TIR : *Tool interleukin-1 (IL-1) receptor*
TIRAP : *TIR-associated protein*
TLR : *Tool-like receptor*
TOSV : *Toscana virus*
TRAF : *Tumor necrosis factor-receptor associated factor*
TRAIL : *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*
TRIF : *TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN- β*
TRIM : *Tripartite motif protein*
TSG101 : *Tumor susceptibility gene 101*
TTV : *Torque teno virus*
TYK2 : *Non-receptor tyrosine-protein kinase 2*

U

Ubc : *Ubiquitin carrier protein*
USP : *Ubiquitin-specific protease*

V

VACV : *Vaccinia virus/ Virus de la vaccine*
VARV : *Variola virus/ Virus de la variole*
VDAC : *Voltage-dependent anion channel*
VEEV : *Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne*
HAV : *Hepatitis A virus/ Virus de l'hépatite A*
HBV : *Hepatitis B virus/ Virus de l'hépatite B*

HCV : *Hepatitis C Virus*/ Virus de l'hépatite C

HDV : *Hepatitis D Virus*/ Virus de l'hépatite Delta

HEV : *Hepatitis E Virus*/ Virus de l'hépatite E

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

HSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

VZV : *Varicella zoster virus*/ Virus de la varicelle-zona

W

WNV : *West-Nile virus*/ Virus de la fièvre occidentale du Nile

WWAV : *Whitewater Arroyo virus*

Y

YFV : *Yellow fever virus*/ Virus de la fièvre jaune

YLDV : *Yaba-like disease virus*

Liste des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique de la famille des Hepeviridae.....	20
Figure 2. Distribution du HEV chez l'homme ⁷	21
Figure 3. Distribution géographique du HEV chez les animaux.	23
Figure 4. Evolution d'une infection aiguë par le HEV ³⁵	25
Figure 5. Région épidémique (Cachemire, 1978) ⁴⁴	26
Figure 6. Modes de transmission zoonotique des HEV-3 et HEV-4. ⁴⁴	29
Figure 7. Organisation du génome du HEV, de l'ARN subgénomique et des ORFs.	34
Figure 8. Structure de la protéine ORF2 (A et B) et de la capside virale (C) ¹³⁵	41
Figure 9. Structure de la protéine ORF3 et domaines d'interactions.	43
Figure 10. Schéma du cycle viral du HEV.	46
Figure 11. Voies de signalisation dépendantes des TLRs.	57
Figure 12. Voies de signalisation dépendante des RLRs.	61
Figure 13. Les voies de signalisation conventionnelle de réponse à l'IFN-I et IFN-II.	63
Figure 14. Régulation par des protéines cellulaires ayant des fonctions d'ubiquitinylation (noire), déubiquitinylation (rouge) et par l'ISGylation.....	70
Figure 15. Régulation de la voie de réponse à l'IFN-I par des mécanismes d'ubiquitinylation/déubiquitinylation et ISGylation des protéines.	72
Figure 16. Les pDCs peuvent être activées par différents mécanismes.	77
Figure 17. Stratégies de blocage des PRRs par les protéines virales.	80
Figure 18. Stratégies de blocage des adaptateurs des voies RLRs par les protéines virales. ..	82
Figure 19. Stratégies de blocage des voies de synthèse de l'IFN-I en aval des adaptateurs par les protéines virales.....	83
Figure 20. Stratégies de blocage de la voie JAK-STAT par les protéines virales.	87
Figure 21. Inhibition des voies de synthèse de l'IFN-I (A) et de réponse à l'IFN-I (B) par les différents domaines de l'ORF1, l'ORF2 et l'ORF3 du HEV.....	93
Figure 22. Construction de vecteurs d'expression codant pour l'ORF1 et ses différents domaines.....	107
Figure 23. L'ORF1 et les domaines PCP et MetPCP présentent une localisation ponctiforme dans la cellule.	109
Figure 24. Les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 sont localisés au niveau du RE ou dans des structures proches.....	111
Figure 25. L'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire.	112
Figure 26. Effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur l'activation du promoteur ISRE.	114
Figure 27. Construction de vecteurs d'expression codant pour les différents domaines du MetPCP et étude de leur effet sur l'activation du promoteur ISRE.....	115
Figure 28. Le domaine MetPCP inhibe l'expression de certains ISGs.	117
Figure 29. Le domaine GFP-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.	121
Figure 30. Le domaine FLAG-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.	124
Figure 31. Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1.	125
Figure 32. Le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1.	126
Figure 33. L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN-β.....	128

Figure 34. Comparaison de la taille des bandes observées après transfection de l'ORF1 dans nos expériences avec les fragments obtenus dans une autre étude.....	131
Figure 35. Schéma du principe de la GPCA.	166
Figure 36. Analyse par GPCA des interactions potentielles entre le domaine MetPCP de l'ORF1 et différentes protéines de la voie JAK-STAT.....	167
Figure 37. Effet des différents domaines de l'ORF1 sur l'activation du promoteur IFN- β	169
Figure 38. Analyse par GPCA des interactions potentielles entre les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 et différentes protéines des voies de synthèse de l'IFN-I.	171
Figure 39. Stratégie de clonage de l'ORF1 du génotype 1 du HEV.	175
Figure 40. Schéma des différents fragments amplifiés.....	176
Figure 41. Schéma de la stratégie expérimentale mise en place.....	182
Figure 42. Protocole de la mise en place des systèmes de culture du HEV en cellules HepaRG ou en cellules HepG2/C3A.....	185
Figure 43. Les cellules HepG2/C3A peuvent être infectées par le HEV mais la présence du virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α	190
Figure 44. Les cellules HepaRG peuvent être infectées par le HEV mais le virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α / β , MxA, ISG56 et ISG15.	191
Figure 45. Evaluation de l'intégrité des voies d'induction (A) et de réponse (B) à l'IFN-I dans les cellules HepaRG.	192
Figure 46. Caractérisation de la réplication virale dans la lignée A549-N5.	193
Figure 47. Le HEV n'affecte pas le niveau d'expression des ARN codant pour l'IFN-I dans les cellules A549-N5 mais est capable d'augmenter le niveau d'expression de certains ISGs. ..	195
Figure 48. Co-culture des cellules HepaRG infectées avec les pBMCs, les pDCs ou les pBMCs déplétées des pDCs.	197
Figure 49. Perspectives sur l'étude de l'activation des pDCs par le HEV.....	203
Figure 50. Modèle proposé de l'effet des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 sur les voies de synthèse de l'IFN-I (A) et de réponse à l'IFN-I (B) basés sur les travaux de cette thèse (en rouge).....	207

Liste des Tables

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunoblot.	104
Tableau 2. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunofluorescence.	105
Tableau 3. Tableau comparatif du pourcentage d'identité en acides aminés entre les différentes souches de HEV décrites ici pour chaque domaine de l'ORF1 étudié.....	174

Table des matières

INTRODUCTION	19
I- LE VIRUS DE L'HEPATITE E	19
A- Classification du HEV	19
B- Situation épidémiologique du HEV	21
1- <i>Distribution du HEV chez l'homme</i>	21
2- <i>Distribution du HEV chez l'animal</i>	22
C- Signes cliniques de l'hépatite E	24
1- <i>Hépatite aiguë/fulminante</i>	24
2- <i>Hépatite chronique</i>	25
3- <i>Manifestations extra-hépatiques</i>	25
D- Transmissions du HEV	26
1- <i>Transmissions interhumaines du HEV</i>	26
a- <i>Transmission via des eaux contaminées</i>	26
b- <i>Transmission directe du HEV</i>	27
c- <i>Transmission par transfusion sanguine</i>	27
d- <i>Transmission verticale de la mère à l'enfant</i>	28
2- <i>Transmission zoonotique du HEV : HEV-3 et -4</i>	28
E- Prévention et traitements	31
F- Le virus de l'hépatite E	32
1- <i>Organisation de la particule virale</i>	32
2- <i>Le génome du HEV</i>	33
a- <i>L'ORF1 du HEV</i>	34
b- <i>L'ORF2 du HEV</i>	40
c- <i>L'ORF3 du HEV</i>	43
d- <i>L'ORF4 du HEV (génotype 1)</i>	44
3- <i>Le cycle viral du HEV</i>	45
G- Les systèmes de culture cellulaire du HEV	47
1- <i>Utilisation de clones infectieux codant pour le génome du HEV</i>	48
2- <i>Infection de lignées cellulaires par le HEV</i>	48
H- Les modèles animaux du HEV	50
II- LE SYSTEME IFN-I	52
A- Les interférons	53
B- Les voies de signalisation du système IFN-I	54
1- <i>L'induction de l'IFN-I</i>	54
a- <i>Les voies de signalisation dépendante des TLRs</i>	54
b- <i>La voie de signalisation RLR</i>	59
2- <i>La signalisation IFN</i>	62
a- <i>La voie de signalisation induite par l'IFN-I</i>	62
b- <i>La voie de signalisation induite par l'IFN-γ</i>	64
c- <i>Fonction des ISGs et mécanismes d'action</i>	64
C- Contrôle des voies de signalisation de l'IFN-I	67
1- <i>Modification post-traductionnelle de protéines</i>	68
a- <i>Ubiquitinylation des protéines</i>	68
b- <i>ISGylation des protéines</i>	73

2-	<i>Contrôle des voies de signalisation par d'autres mécanismes</i>	73
D-	Les cellules dendritiques plasmacytoides	74
1-	<i>Fonctions des pDCs</i>	75
2-	<i>Reconnaissance des acides nucléiques par les pDCs</i>	76
3-	<i>Activation des pDCs par différents mécanismes</i>	76
III-	INTERACTION VIRUS-SYSTEME INTERFERON	78
A-	Modulation des voies de signalisation de l'IFN-I par les virus	78
1-	Contrôle de l'induction de l'IFN-I par les virus	78
a-	<i>Inhibition des PRRs par les virus</i>	79
b-	<i>Inhibition des adaptateurs des voies de signalisation TLR et RLR par les virus</i>	81
c-	<i>Inhibition du complexe IKKε-TBK1 par les virus</i>	83
d-	<i>Inhibition des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 par les virus</i>	84
2-	Contrôle de la réponse à l'IFN-I par les virus	85
B-	Interaction entre système IFN-I et HEV	88
1-	Activation de la réponse immunitaire en réponse au HEV	88
a-	<i>Activation de la synthèse d'IFN-I en réponse au HEV ?</i>	88
b-	<i>Activation de la synthèse des ISGs en réponse au HEV</i>	89
c-	<i>Protéines impliquées dans la reconnaissance et la réponse au HEV</i>	90
2-	Contrôle de la réponse IFN-I par le HEV	91
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	95
	CHAPITRE 1 :	97
	ETUDE DE LA CAPACITE DE L'ORF1 DU HEV A MODULER LE SYSTEME IFN-I	97
I-	INTRODUCTION	99
II-	MATERIELS ET METHODES	99
A-	Plasmides	99
1-	<i>Stratégie de clonage de l'ORF1 et de ces différents domaines</i>	99
2-	<i>Autres plasmides</i>	100
B-	Cellules	101
1-	<i>Culture cellulaire</i>	101
2-	<i>Transfections</i>	101
3-	<i>Stimulation des cellules à l'IFN</i>	101
C-	Analyse de la viabilité cellulaire	102
D-	Tests rapporteurs luciférase	102
E-	Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)	103
F-	Analyse par Immunoblot	103
G-	Immunofluorescence (IF)	105
H-	Analyses statistiques	106
III-	RESULTATS	106
A-	Construction et expression de plasmides codant pour les différents domaines de l'ORF1	106
1-	<i>Expression des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 dans les cellules 293T</i>	106
2-	<i>Etude de la localisation sub-cellulaire de l'ORF1 et de ses différents domaines</i>	107
3-	<i>Etude de l'impact de l'expression de l'ORF1 et de ses différents domaines sur la viabilité cellulaire</i>	112

B-	Etude de la capacité de l'ORF1 du HEV à moduler la voie de réponse à l'IFN-I..	113
1-	<i>Effet de l'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines sur l'activité du promoteur ISRE</i>	113
2-	<i>Construction de vecteurs d'expression codant pour différents fragments du domaine MetPCP</i>	114
3-	<i>Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la synthèse de certains ISGs</i>	116
4-	<i>Le domaine MetPCP de l'ORF1 bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau</i>	117
5-	<i>Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1</i>	124
6-	<i>Le domaine MetPCP de l'ORF1 n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1</i>	126
7-	<i>L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN-β</i>	127
IV-	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	128
V-	Manuscrit de l'article.....	137
	TRAVAUX COMPLEMENTAIRES	165
I-	Recherche des partenaires potentiels du domaine MetPCP parmi les protéines de la voie JAK-STAT par GPCA.....	165
A-	Matériels et méthodes : la technique de la GPCA.....	165
B-	Résultats obtenus	166
C-	Discussion	167
II-	Etude de l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur la voie de signalisation RLR	168
A-	Résultats.....	168
1.	<i>Effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur l'activité du promoteur IFN-β</i>	168
2.	<i>Recherche de partenaires cellulaires potentiels des domaines PCP et MetPCP parmi les protéines de la voie RLR par GPCA</i>	169
B-	Discussion et perspectives	171
III-	Comparaison de l'effet de l'ORF1 du HEV-3 sur les voies de signalisation de l'IFN-I avec l'effet de l'ORF1 du HEV-1	173
A-	Construction des plasmides codant pour les différents domaines de l'ORF1 d'une souche de HEV-1	174
B-	Perspectives	176
	CHAPITRE 2 :	179
	ETUDE DE LA CAPACITE DU HEV A INDUIRE LA PRODUCTION D'IFN-I PAR LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOIDES	179
I-	INTRODUCTION.....	181
II-	STRATEGIE EXPERIMENTALE	181
III-	MATERIELS ET METHODES	182
A-	Cellules	182
B-	Anticorps et réactifs	183
C-	Infections virales.....	184
1-	<i>Infections par le HEV</i>	184
2-	<i>Infections avec le BTV-8</i>	185
D-	Co-culture avec les cellules dendritiques plasmacytoides.....	185
E-	Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)	186
1-	<i>Extraction de l'ARN du HEV et quantification par RT-PCRq</i>	186

2-	<i>Extraction des ARN cellulaires totaux et mesure de l'expression de gènes cellulaires par RT-PCRq</i>	187
F-	Dosage de l'IFN- α par ELISA	187
G-	Analyses statistiques	187
IV-	RESULTATS	188
A-	Préparation de la source de HEV	188
1-	<i>Etude de la production d'IFN-I dans des cellules HepG2/C3A suite à une infection par le HEV</i>	188
2-	<i>Etude de la production d'IFN-I dans les cellules HepaRG suite à une infection par le HEV</i>	189
3-	Réponse des cellules A549 à une infection par le HEV	193
a-	<i>La lignée A549-N5</i>	193
b-	<i>Etude de la production d'IFN-I dans les cellules A549-N5</i>	194
B-	Etude de la stimulation des pDCs par co-culture avec des cellules HepaRG infectées par le HEV	196
V-	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	197
	<i>CONCLUSION</i>	205
	<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	209
	<i>ANNEXES</i>	241

INTRODUCTION

I- LE VIRUS DE L'HEPATITE E

Le virus de l'hépatite E (HEV) est responsable d'une hépatite aiguë à transmission entérique chez l'homme qui peut évoluer en hépatite fulminante dans 1-4% des cas et chez 20% des femmes enceintes.

L'existence du HEV a été mise en évidence pour la première fois en 1978 pendant une épidémie d'hépatite dans le Cachemire en Inde n'étant causée ni par le virus de l'hépatite A (HAV) ni par le virus de l'hépatite B (HBV) ¹. Par la suite, l'infection expérimentale par voie orale d'un volontaire avec des extraits de fèces provenant d'un patient infecté ² permit la mise en évidence de l'excrétion de VLP (pour *virus-like particles*) de 27 à 30nm de diamètre dans les fèces associée au développement d'une hépatite. Le génome de ces particules de HEV fût cloné et séquencé au début des années 90 en utilisant des échantillons provenant de macaques infectés ^{3,4}.

Depuis sa découverte, de nombreuses souches de HEV ont été identifiées : ces souches ont pu être classées chez l'homme en quatre géotypes mais de nombreuses autres souches ont également été retrouvées dans différentes espèces animales comme les porcs domestiques, les sangliers, les cerfs, les lapins, les mangoustes, les furets, les rats, les poulets, les chauves-souris ou la truite fardée. De plus, le HEV est capable de se transmettre de l'animal vers l'homme, ce qui en fait un agent zoonotique. Le HEV a principalement été retrouvé dans les pays en voie de développement, où il infecte la population de manière endémique mais de nombreux cas ont également été recensés dans les pays industrialisés comme la France.

A- Classification du HEV

Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae*. Les différentes souches de HEV se divisent en deux genres : les *Orthohepevirus*, contenant toutes les souches de HEV de mammifères et d'oiseaux, et les *Piscihepevirus* comprenant uniquement la souche retrouvée chez la truite fardée (Figure 1) ⁵. Au sein du genre *Orthohepevirus*, quatre espèces peuvent être distinguées : les *Orthohepevirus A* comprenant les souches présentes chez l'homme, le porc,

le sanglier, le cerf, la mangouste, le lapin et le chameau ; les *Orthohepevirus B* comprenant les souches du poulet, les *Orthohepevirus C* comprenant les souches du rat, du bilby, de la musaraigne d'Asie, et du vison ; et les *Orthohepevirus D* comprenant les souches isolées chez les chauves-souris ⁵. Les quatre principaux génotypes d'*Orthohepevirus A* sont capables d'infecter l'homme (HEV-1 à -4). Les HEV-1 et HEV-2 infectent uniquement l'homme alors que les HEV-3 et HEV-4 sont présents à la fois chez l'homme et d'autres animaux. Le HEV-3 est divisé en 10 sous-types (a à j). Certains isolats du genre *Orthohepevirus* n'ont pas encore été associés à un génotype particulier. C'est le cas de la souche isolée chez l'élan et chez le faucon ⁶. En effet, les séquences analysées ne sont que partielles, limitant ainsi leur attribution à un génotype.

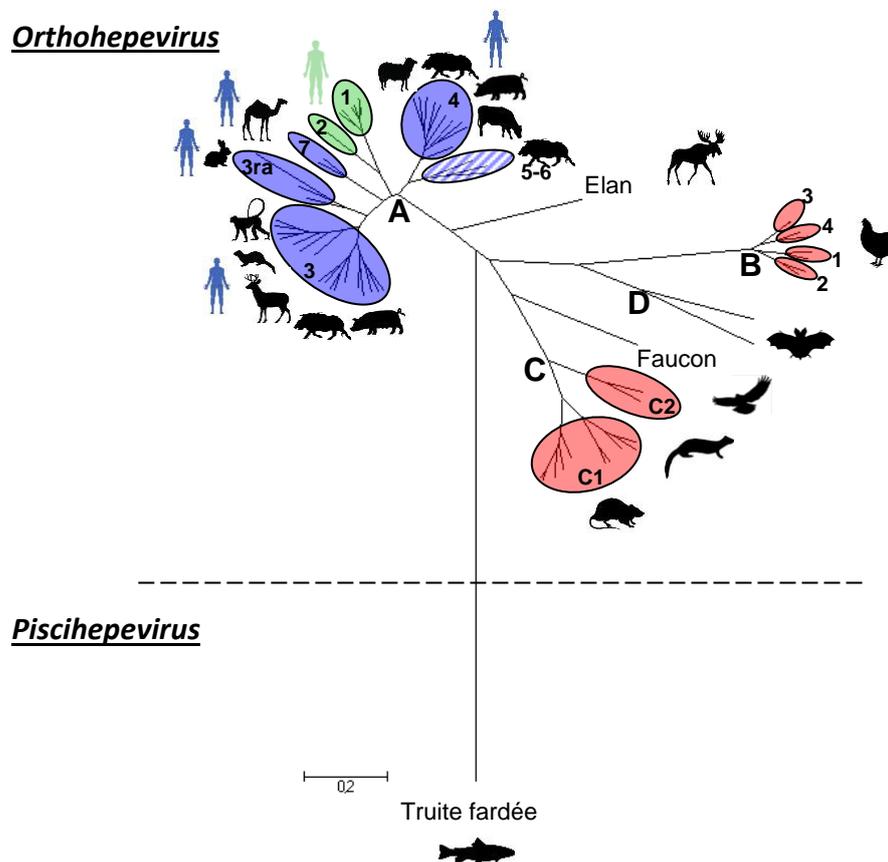


Figure 1. Arbre phylogénétique de la famille des Hepeviridae.

Traduite de « Zoonotic Hepatitis E virus : classification, animal reservoirs and transmission routes » ⁶. En rouge sont représentés les génotypes de HEV non zoonotiques, en bleu les génotypes comprenant les souches de HEV isolées chez l'homme et l'animal, en vert les génotypes qui infectent seulement l'homme et en bleu strié les génotypes infectant le sanglier et qui n'ont pas encore été associés à des infections humaines.

B- Situation épidémiologique du HEV

1- Distribution du HEV chez l'homme

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le HEV est responsable de 20 millions d'infections par an chez l'homme. Cependant, tous les pays ne sont pas touchés de la même manière. On peut distinguer deux principales zones (Figure 2) :

- les pays en voie de développement dans lesquels les virus HEV-1 et HEV-2 infectent la population de manière endémique. Le HEV-1 est retrouvé dans de nombreux pays d'Asie ainsi que d'Afrique du nord et d'Afrique du sud. On le retrouve également dans certains pays d'Amérique latine. Le HEV-2 est retrouvé essentiellement dans certains pays d'Afrique centrale et au Mexique ⁷.

- les pays développés dans lesquels les virus HEV-3 et HEV-4 sont présents uniquement sous forme de cas sporadiques au sein de la population. Le HEV-3 est retrouvé en Amérique du nord, Europe, Australie, Japon et dans certains pays d'Amérique du sud (Chili, Argentine, Pérou). Le HEV-4 est quant à lui retrouvé dans certains pays de l'Est de l'Asie ⁷ et plus occasionnellement en Europe (Italie, France) ⁸.

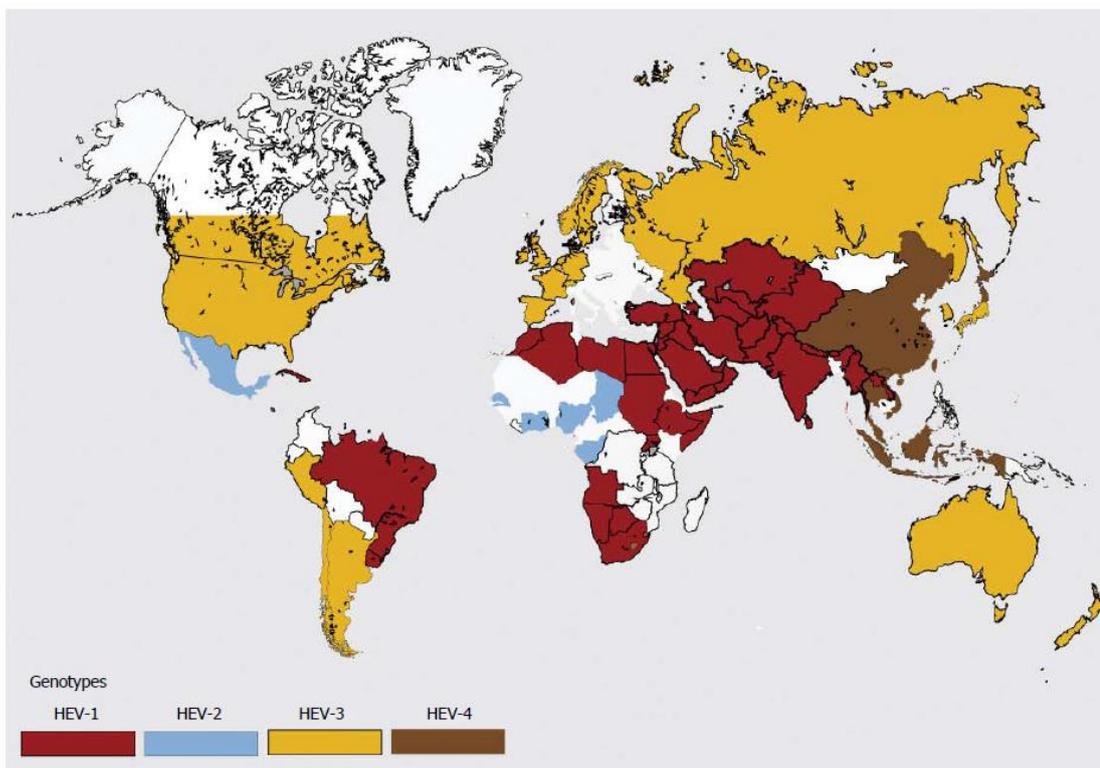


Figure 2. Distribution du HEV chez l'homme ⁷.

2- Distribution du HEV chez l'animal

Le génome du HEV a été détecté à la fois chez des animaux domestiques mais également chez des animaux sauvages (Figure 3). En 1995, des anticorps anti-HEV et de l'ARN viral ont été détectés pour la première fois chez des porcs domestiques au Népal⁹. Deux ans plus tard, le HEV fût détecté dans des élevages de porcs aux Etats-Unis et caractérisé génétiquement¹⁰. Depuis, des anticorps anti-HEV ont été détectés dans 46-100% des élevages porcins à travers le monde, ce qui fait du porc domestique le principal réservoir animal du HEV⁶ (Figure 3). Les souches responsables de l'infection chez le porc sont les HEV-3 et HEV-4⁶. Les HEV-3 et HEV-4 ont également été retrouvés chez le sanglier, qui représente, avec le porc domestique, l'un des principaux réservoirs du HEV⁶. Des virus de génotypes différents, HEV-5 et HEV-6 ont également été retrouvés chez le sanglier au Japon^{11,12}. Le HEV-3 a également été retrouvé dans différentes espèces de cerfs à travers le monde (Figure 3) ainsi que chez la mangouste japonaise^{13,14}. De plus, une souche de HEV-3 de lapin (HEV-3ra) a été identifiée dans des lapins d'élevage en Chine¹⁵, en Mongolie¹⁶, aux Etats-Unis¹⁷, dans des lapins d'élevage et des lièvres en France¹⁸, chez des lapins et des lièvres en Allemagne¹⁹ mais également chez un lapin de compagnie en Italie²⁰. Le HEV-4 a été retrouvé chez des Yaks en chine²¹. Du HEV de génotype 7 (HEV-7) a été retrouvé dans des échantillons fécaux de chameaux au Moyen-Orient²². Une souche de HEV a également été retrouvée dans des élans en Suède mais cette souche n'a pas encore été attribuée à un génotype particulier²³. Récemment une souche de HEV de génotype 8 (HEV-8) a été identifiée dans un chameau de Bactriane²⁴.

D'autres espèces animales infectées par d'autres souches de HEV ont été décrites. Des souches de HEV ont été retrouvées chez les oiseaux (*Orthohepevirus B*; Figure 1). Le HEV aviaire a été décrit pour la première fois en Australie en 1999²⁵ puis aux Etats-Unis, et est associé à une maladie : la splénomégalie hépatique²⁶. Le HEV aviaire est enzootique dans les élevages de poulets aux Etats-Unis avec une séroprévalence de 71%²⁷ et il a également été retrouvé dans des élevages en Espagne, Russie, Corée, Taiwan et en Chine²⁸. Le HEV aviaire a récemment été retrouvé dans des oiseaux sauvages en Hongrie²⁹.

Parmi les *Orthohepevirus C* (Figures 1 et 3), une souche de HEV a été retrouvée chez le rat, avec une séroprévalence variant de 13 à 90% dans de nombreux pays³⁰. D'autres souches de

HEV ont été retrouvées chez les furets aux Pays-Bas et au Japon, chez les visons au Danemark, chez la musaraigne en Chine et chez le renard au Pays-Bas ²⁸.

D'autres souches ont été identifiées dans différentes espèces de chauves-souris en Amérique centrale, Afrique et Europe et ont été classées dans l'espèce des *Orthohepevirus D* (Figure 1) ³¹. Très récemment, une souche a été retrouvée chez le faucon crécerelle et le faucon kobez en Hongrie mais n'a pas encore été attribuée à un génotype particulier ³². Enfin, une souche de HEV a été retrouvée dans la truite fardée aux Etats-Unis (*Piscihepevirus* ; Figure 1) ³³.

De plus, des anticorps anti-HEV ont également été détectés dans de nombreuses autres espèces comme les chiens, chats, moutons, chèvres, chevaux, rongeurs, bovins, canards, pigeons, et chez des primates non-humains. La présence de ces anticorps suggère que ces espèces ont été exposées au HEV ou à un agent similaire ²⁸.

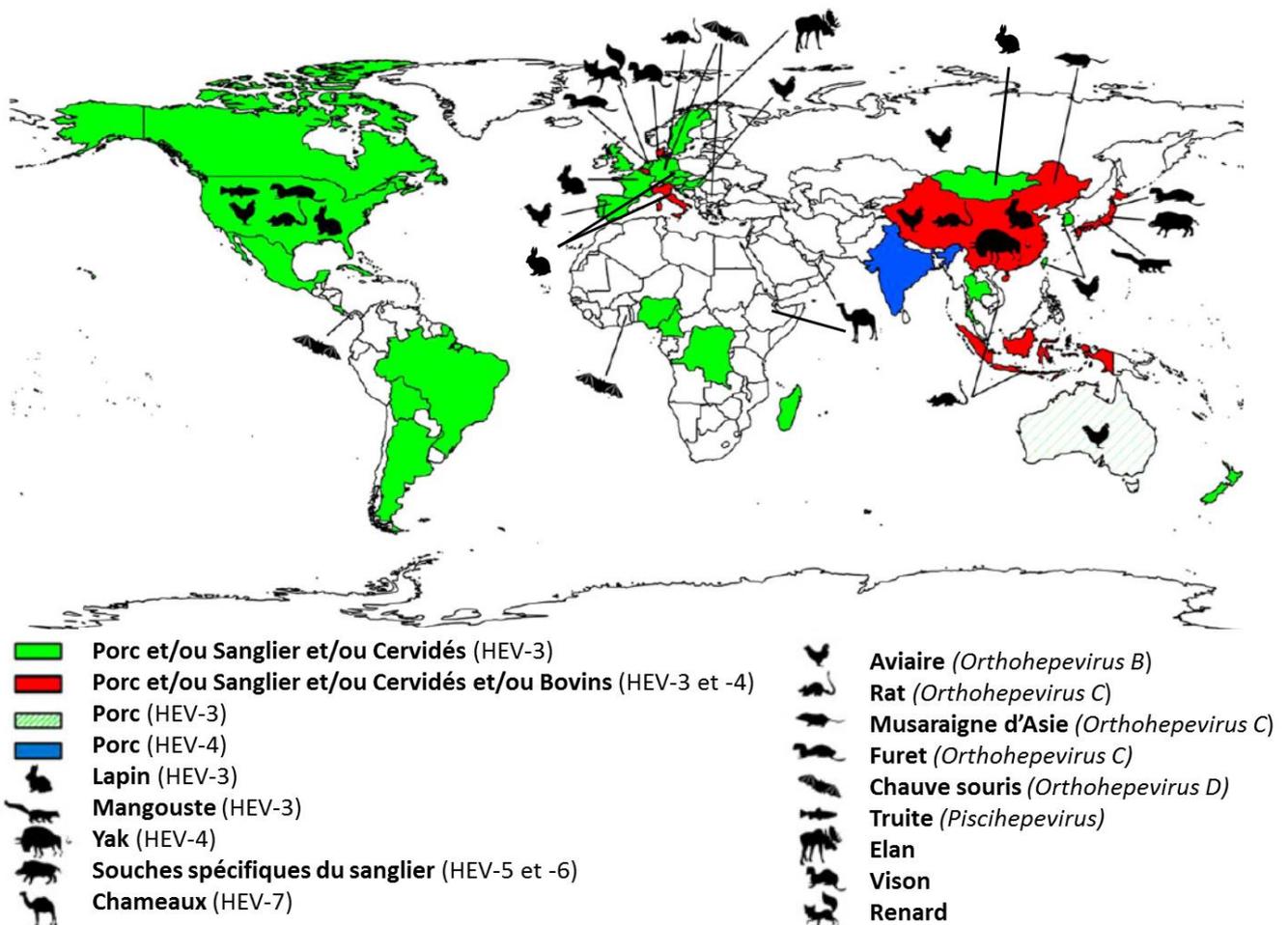


Figure 3. Distribution géographique du HEV chez les animaux.

(Adapté de « hepatitis E virus and related viruses in animals » Thiry, 2017 ²⁸)

C- Signes cliniques de l'hépatite E

Aucune pathologie due à HEV n'a encore été détecté chez la plupart des animaux infectés. La seule souche de HEV pour laquelle une pathologie chez l'animal a été décrite est le HEV aviaire qui est responsable d'un syndrome de splénomégalie hépatique chez le poulet ²⁶.

Chez l'homme, le HEV est le plus souvent asymptomatique (70% des cas) ³⁴ mais peut également présenter différentes formes cliniques d'hépatites : des formes aiguës, fulminantes ou chroniques. De plus, des manifestations extra-hépatiques comme des atteintes neurologiques liées au HEV ont été mises en évidence.

1- Hépatite aiguë/fulminante

La maladie commence après une période d'incubation de 2 à 6 semaines ³⁵. Le pic de virémie a lieu au moment de l'apparition des premiers symptômes et est concomitant avec un pic de transaminases et la mise en place d'une réponse anticorps anti-HEV (Figure 4). Les immunoglobulines M (IgMs) anti-HEV sont détectées dans la phase précoce de la maladie et peuvent persister pendant plusieurs mois. Les immunoglobulines G (IgGs) anti-HEV apparaissent après la réponse IgM et peuvent persister pendant plusieurs années. Vers 6 semaines post-infection, le virus n'est plus détecté dans le sérum alors qu'il ne l'est plus à partir de 8 semaines post-infection dans les fèces (Figure 4).

Les symptômes cliniques durent 1-2 semaines et sont classiquement de la fièvre, de la fatigue, des douleurs musculaires et abdominales, des maux de tête, des nausées, une anorexie, une perte de poids, des diarrhées, une jaunisse (dans 60% des cas), du prurit et des urines noires ³⁶. Le taux de mortalité varie de 0.5 à 4% des cas d'infections symptomatiques ^{1,37}. Cependant, ce taux peut atteindre 30% chez la femme enceinte pendant le troisième trimestre de la grossesse ³⁸. La cause de la mort peut soit venir de complications pendant la grossesse soit d'une insuffisance hépatique aiguë. Ces complications ont été observées uniquement pour le HEV-1. Dans les pays développés, les femmes enceintes ne semblent pas particulièrement touchées lors d'infections par le HEV-3 ³⁵.

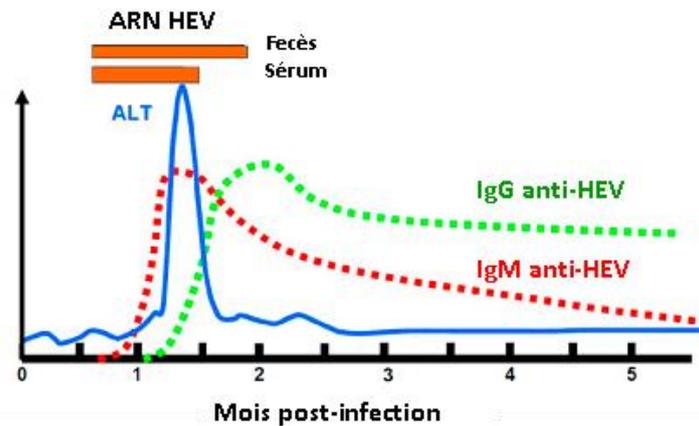


Figure 4. Evolution d'une infection aiguë par le HEV ³⁵.

ALT : Alanine aminotransférase. L'ALT est une enzyme du foie dont l'augmentation dans le sang est le signe d'une cytolysé hépatique.

2- Hépatite chronique

La forme chronique du HEV ne s'observe que chez les populations immunodéprimées telles que chez les receveurs d'organes sous traitement immunosuppresseur, les personnes qui présentent des maladies hématologiques ou les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ⁷. Des cas de formes chroniques ont été rapportés que pour les HEV-3 et HEV-4. Une hépatite devient chronique quand le HEV persiste dans le sang pendant 6 mois après l'infection. L'hépatite chronique peut conduire vers une cirrhose, qui peut entraîner une insuffisance hépatique majeure et le décès du patient.

3- Manifestations extra-hépatiques

Des manifestations extra-hépatiques peuvent survenir chez les patients présentant une hépatite aiguë ou chronique. Des problèmes neurologiques comme des syndromes de Guillain-Barré, de Parsonnage-Turner, une amyotrophie névralgique, une encéphalite, une myosite et une méningo-encéphalite ³⁹ ont été décrits chez des patients infectés. La cause de ces atteintes neurologiques n'est pas encore très claire mais des études récentes semblent indiquer que le HEV pourrait être un virus neurotrope ⁴⁰⁻⁴³. Des atteintes rénales ont également été rapportées. Cependant, la cause de ces atteintes n'est pas encore connue et il n'y a aucune preuve montrant que le HEV pourrait se répliquer dans des cellules rénales

³⁵.

D- Transmissions du HEV

1- Transmissions interhumaines du HEV

a- Transmission via des eaux contaminées



Figure 5. Région épidémique (Cachemire, 1978) ⁴⁴.

L'eau potable est collectée dans un canal dans lequel se déversent les latrines publiques et les déchets. De plus, les ustensiles et le linge sont lavés dans cette eau et le poisson y est pêché.

Le HEV se transmet principalement par voie féco-orale. Dans les pays en développement, la contamination fécale des réserves d'eau a été associée à de nombreuses épidémies de HEV, comme par exemple celle au Cachemire en Inde en 1978 qui toucha 20 083 personnes (Figure 5) ^{1,45-47}. Il a été montré que les sources d'eau de consommation contiennent de nombreuses colonies d'*Escherichia coli* (*E. coli*), suggérant une contamination fécale, et que les communautés qui utilisent d'autres sources d'eau de boisson (comme par exemple de l'eau provenant de puits protégés), avant ou pendant les épidémies, ne développent pas la maladie ¹. De plus, différentes études ont montré que les eaux usées contiennent des souches de HEV similaires à celles responsables des infections animales et humaines ⁴⁸⁻⁵⁰. Par exemple, l'analyse d'échantillons d'eaux usées dans le nord de l'Inde a montré que 41% étaient contaminées par de l'ARN du HEV-1 ⁴⁸.

Différents paramètres vont contribuer à la contamination des eaux : une mousson abondante, des inondations entraînant la stagnation des eaux et la pollution des sources d'eau potable, les eaux usées déversées dans les sources d'eau potable comme les rivières, les fleuves, les puits non protégés mais également via les canalisations d'eau potable fendues passant à travers les égouts ⁷. Ces sources d'eau contaminées vont ensuite être utilisées pour la consommation, se laver, laver le linge et les ustensiles de cuisine (Figure 5), entraînant des épidémies.

b- Transmission directe du HEV

Il n'est pas encore clairement établi si le HEV peut se transmettre directement entre personnes. En général, les épidémies ne sont pas suivies par une deuxième vague de cas d'hépatites secondaires et il y a peu de transmission au sein d'une famille. Cependant, une épidémie de HEV causant 10 196 cas dont 160 morts dans le nord de l'Ouganda en 2007-2008 a été causée par des transmissions directes entre personnes ⁵¹. En effet, pendant cette épidémie, le HEV ne fut pas retrouvé dans les eaux et aucun lien avec une potentielle origine zoonotique ne fut établi. Les personnes infectées avaient été en contact avec des personnes atteintes de jaunisse, avaient assisté à un enterrement d'une personne décédée du HEV ou se lavaient les mains dans une unique bassine familiale avant le repas.

c- Transmission par transfusion sanguine

Les premiers cas de transmission du HEV par transfusion sanguine furent décrits au Cachemire en Inde en 2004. Dans cette étude, 13 infections par le HEV-1 sur 145 sujets transfusés furent détectées ⁵². A la suite de cette étude, de nombreux autres cas de transmission du HEV par transfusion sanguine furent décrits dans différents pays. Parmi eux, des cas de transmission du HEV-3 ont été décrits, notamment en Angleterre où 18 patients sur 42, transfusés avec du sang contaminé, avaient contracté une infection par le HEV-3 ⁵³. L'étude de la virémie chez les donneurs de sang a été réalisée dans différents pays et un don sur 672 en Allemagne et un sur 8416 en Autriche sont positifs pour le HEV. De même, il a été estimé qu'il y a eu entre 80 000 et 100 000 infections par le HEV associées à une transfusion

sanguine en Angleterre en 2013, et que sur les 7.4 millions de dons annuels en Allemagne, entre 1600 et 5900 sont associés à une infection par le HEV ⁷. Récemment, une étude a montré que sur 10 569 donateurs de sang en France, 22.4% présentaient des Immunoglobulines G (IgG) anti-HEV et 1% présentait des IgM anti-HEV ⁵⁴. Toujours en France, la présence d'ARN viral a été détectée dans un don sur 2218 dans une étude réalisée en 2014 ⁵⁵ et un don sur 744 en 2017 ⁵⁶. Au vu de ces données, un dépistage systématique des dons de sang devrait être réalisé dans les pays à forte prévalence pour le HEV.

d- Transmission verticale de la mère à l'enfant

Le HEV peut être transmis de manière verticale de la mère infectée au fœtus. Dans une étude au Cachemire en Inde, 6 mères infectées sur 8 ont transmis le virus à leur enfant ⁵⁷. Dans une autre étude sur 26 femmes enceintes infectées par le HEV-1, 5 d'entre elles sont mortes avant l'accouchement et 4 ont eu un enfant prématuré. Parmi les 19 nouveau-nés suivis, 15 ont été infectés par le HEV pendant la grossesse et ont développé des symptômes de la maladie, conduisant à une mort prématurée pour 7 d'entre eux ⁵⁸. Par la suite, de nombreux autres rapports ont montré une transmission intra-utérine du HEV-1 associée à un fort taux de mortalité pour la mère et le fœtus ⁴⁴. Récemment, il a été montré que le HEV est capable de se répliquer dans le placenta de mères infectées ⁵⁹. En ce qui concerne le HEV-3, un cas de femme infectée pendant la grossesse et présentant une hépatite aiguë a été observé en France, mais l'infection n'a pas eu de conséquence sur la mère ni sur le fœtus ⁶⁰. Le cas d'une femme infectée par le HEV-3c et présentant des symptômes d'hépatite aiguë a été décrit en Allemagne et là aussi, l'infection n'a eu aucune conséquence sur la grossesse ou la santé du nouveau-né ⁶¹.

2- Transmission zoonotique du HEV : HEV-3 et -4

Le HEV est un virus zoonotique ayant pour principaux réservoirs les porcs domestiques et les sangliers. La comparaison entre des séquences de virus d'origine humaine ou porcine ont montré plus de 99% d'identité, suggérant que le virus n'a pas besoin d'adaptation pour passer la barrière d'espèce ⁶². Il existe trois principaux modes de transmission de l'animal vers l'homme : la consommation de viande infectée, un contact direct avec les animaux infectés et

indirectement via la consommation de fruits ou légumes cultivés ou fruits de mer produits dans des eaux contaminées par les selles d'hommes ou d'animaux infectés (Figure 6).

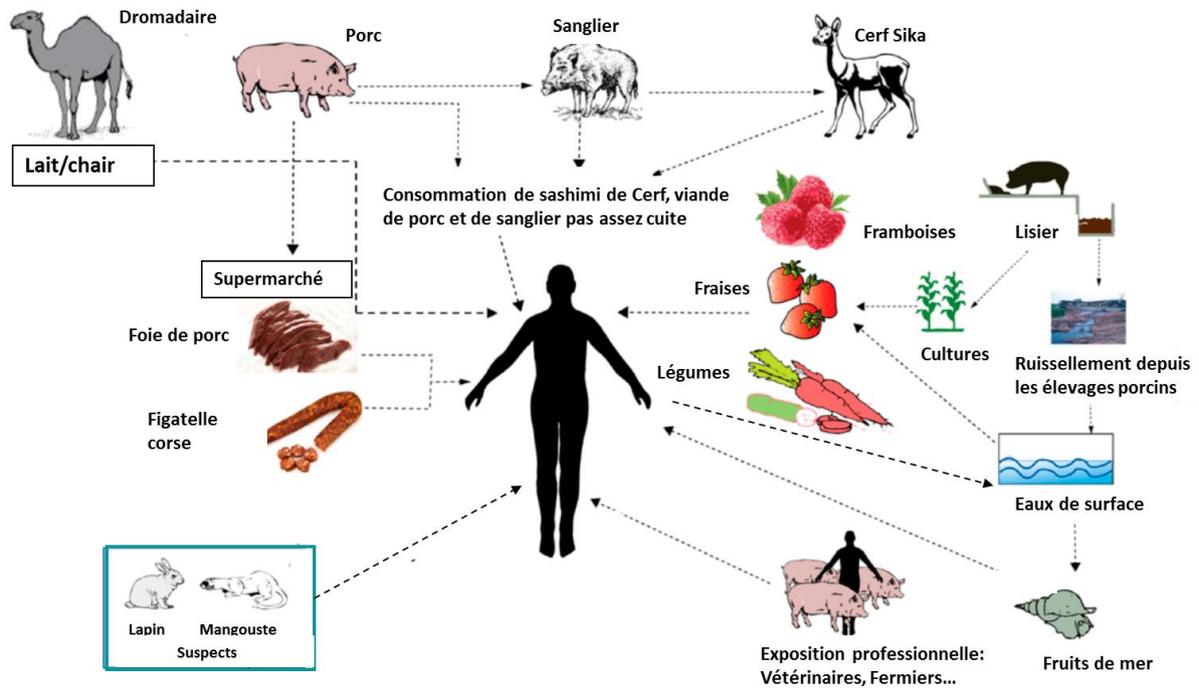


Figure 6. Modes de transmission zoonotique des HEV-3 et HEV-4. ⁴⁴
(Voir texte pour explications détaillées).

Des cas de contamination de l'homme via la consommation de viande de porc, de sanglier ou de cerf ont été rapportés dans plusieurs publications. La transmission zoonotique du HEV à l'homme a été décrite pour la première fois en 2003 après la découverte de cas d'infection par le HEV chez des patients ayant consommés des sashimis de cerf Sika (tranches de viande crue) ⁶³. La séquence du HEV était identique entre la viande de cerf et celle retrouvée chez les patients. Par la suite, d'autres publications ont mis en évidence la transmission du HEV via la consommation de viande infectée: de la viande de sanglier grillée au Japon, de la viande de porc en Espagne ainsi que de la figatelle en Corse ⁶. De nombreux autres rapports ont montré un lien entre des cas de HEV et la consommation de produits alimentaires à base de porc ou de sanglier crus ou pas assez cuits (viande, foie, pâté de foie, figatelle ou tout autre produit à base de foie) ⁶. Une étude récente a également montré un lien entre la consommation de viande de porc ou de sanglier et de produits à base de foie de porc et la présence d'anticorps anti-HEV dans le sang des donneurs en France ⁵⁴. De plus, l'ARN des

HEV-3 et -4 est présent dans la chaîne alimentaire à travers le monde : 3-11% des foies de porcs sont positifs pour le HEV à l'abattoir ⁶. L'ARN du HEV a également été détecté dans différents aliments à base de foie de porc dans de nombreux pays ⁶. Par exemple, en France, une étude a montré que 30% des figatelles, 25% des pâtes à quenelles, et 29% des saucisses de foie disponibles dans le commerce étaient positives pour l'ARN du HEV ⁶⁴. De nombreuses études ont montré que l'ARN viral retrouvé dans la chaîne alimentaire pouvait être infectieux. Notamment, aux Etats-Unis, l'inoculation de porcs par voie intraveineuse, d'une préparation contenant des foies de porcs contaminés a entraîné une infection ⁶⁵. De plus, le HEV a été cultivé avec succès dans des cellules humaines en utilisant des extraits de figatelles produites en France ⁶⁶ ou du foie de porc cru vendu au Japon ⁶⁷.

D'autres aliments peuvent être contaminés par le HEV et être responsables de transmissions zoonotiques. Le HEV a notamment été retrouvé dans différents fruits de mer tels que des mollusques bivalves et des moules ⁶. La transmission zoonotique via la consommation de fruits de mer n'a pas encore été clairement démontrée mais un lien a été établi entre la consommation d'huîtres et une épidémie de HEV lors d'une croisière ⁶⁸ et un cas d'hépatite E chez un patient qui avait voyagé au Vietnam ⁶⁹.

Par ailleurs, l'ARN du HEV a été retrouvé dans des fraises au Canada, dans des framboises surgelées ou des légumes vendus en Europe, suggérant que les fruits et légumes peuvent aussi être contaminés par le HEV ⁶. La présence du HEV dans les fruits de mer, les fruits et légumes serait due à la contamination, par les eaux usées, de l'eau utilisée pour leur culture (Figure 6).

Enfin, des études de séroprévalence ont suggéré que le contact direct avec les animaux infectés était un facteur de risque d'infection par le HEV. En effet, une séroprévalence plus élevée a été retrouvée chez les vétérinaires et personnes travaillant dans les élevages porcins dans de nombreux pays, chez des bouchers au Burkina faso et aussi chez des personnes travaillant dans les forêts en France et en Allemagne, que dans les populations témoins respectives ⁶.

Cependant, pour d'autres animaux comme le lapin ou la mangouste, il n'est pas encore très clair si le virus peut, ou non, passer la barrière d'espèce et infecter l'homme. L'infection de singes cynomolgus avec une souche de HEV de lapin ⁷⁰ ainsi que l'identification d'une souche humaine présentant 80.3%-85% d'identité nucléotidique avec différentes souches de lapin ⁷¹

suggèrent que la transmission du HEV-3 du lapin vers l'homme est possible. Dans une étude récente, 5 patients sur 919 infectés par le HEV en France avaient été infectés par une souche de HEV de lapin ⁷². Cependant, aucun des patients n'avait été en contact avec un lapin, suggérant une transmission via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Récemment, la découverte d'un cas humain qui consommait régulièrement de la viande et du lait de chameau suggère fortement que le HEV-7 serait transmissible du chameau à l'homme ⁷³. Une autre étude a récemment montré la présence de HEV-4 dans du lait de vaches infectées ⁷⁴ et que l'ingestion du lait contaminé entraînait l'infection de macaques rhésus. Cette étude suggère que le lait pourrait aussi être responsable d'une transmission zoonotique du HEV, cependant cette étude reste unique et ces résultats restent à confirmer.

E- Prévention et traitements

La présence de HEV dans la chaîne alimentaire et l'augmentation du nombre de cas d'hépatite E détectés en France ces dernières années fait du HEV un véritable problème de santé publique. Un vaccin, basé sur l'expression de la protéine de capsid tronquée du HEV (Heoclin®), confère une protection complète chez l'homme contre le virus après trois injections et est commercialisé en Chine depuis 2012 ⁷⁵. Cependant, l'utilisation de ce vaccin n'a pas encore été approuvée dans les autres pays.

Chez les personnes immunocompétentes, seul le traitement des symptômes est prescrit. Lorsque la maladie devient plus sévère, des thérapies appropriées peuvent être proposées comme un traitement de 3 semaines avec de la Ribavirine qui permet une amélioration rapide des fonctions hépatiques ⁷⁶. Chez les patients transplantés, l'hépatite chronique peut être traitée en diminuant l'immunosuppression, permettant ainsi une guérison chez 30% des patients ⁷⁷. Chez les patients atteints d'une hépatite chronique, il existe généralement deux autres traitements : l'interféron pégylé ⁷⁸ et la ribavirine, qui est le traitement le plus administré ⁷⁹. Cependant, ces deux thérapies ont de nombreux effets secondaires et sont contre-indiquées chez la femme enceinte. D'autres traitements sont donc nécessaires pour le HEV. Le sofosbuvir, un analogue nucléotidique développé dans le traitement contre le HCV, entrave la réplication du HEV *in vitro* ⁸⁰. Récemment, l'efficacité du sofosbuvir a été montrée

chez un patient atteint d'une hépatite chronique ⁸¹. Cependant, une autre étude récente a montré l'absence d'effet du sofosbuvir chez un autre patient atteint d'une hépatite chronique ⁸². Il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique du HEV disponible.

La prévention de la transmission du HEV dans les pays en développement consiste en l'approvisionnement en eau potable propre, des sanitaires adéquats et l'amélioration de l'hygiène.

La prévention de la transmission zoonotique repose principalement sur la recommandation de cuire à cœur les produits à base de foie de porc et d'éviter de les consommer crus ou peu cuits. Une étude a montré qu'une inactivation thermique du HEV est efficace dans les produits contenant du foie de porcs infectés avec une cuisson à 71°C pendant 20 minutes ⁸³. Une autre étude a montré que le HEV était inactivé après 1 min à 80°C ⁸⁴. Cependant, l'inactivation a été réalisée ici sur du surnageant de culture alors que, dans la première étude, l'inactivation avait été réalisée directement sur un produit alimentaire.

Par ailleurs, des mesures d'hygiène appropriées, comme le lavage des mains et nettoyage des surfaces et ustensiles doivent être respectées après manipulation de la viande crue. De plus, les effluents provenant des élevages de porcs doivent être éliminés de manière appropriée. L'utilisation de lisier de porc comme engrais pour les cultures doit être contrôlée afin d'éviter tout risque de contamination des sols ou de l'eau.

F- Le virus de l'hépatite E

1- Organisation de la particule virale

Le HEV est un petit virus quasi-enveloppé, possédant une capsidie icosaédrique et dont la taille fait 27 à 34nm de diamètre. La capsidie virale est composée d'une seule protéine, la protéine ORF2, et chaque capsidie est constituée de 180 copies de l'ORF2 arrangées en icosaèdre avec une symétrie T=3 ⁸⁵. La capsidie virale contient le génome du HEV, un ARN simple brin de polarité positive. Il fait partie de la superfamille de virus « alpha-like » qui comporte de nombreux virus à ARN positif de plantes et d'animaux tels que le virus de la forêt de Semliki (SFV) et le virus Sindbis (SNV).

Le HEV a longtemps été considéré comme un virus non enveloppé, car les particules retrouvées dans les fèces sont nues. Cependant, il a été récemment montré que les particules circulantes dans le sang ou présentes dans les surnageants de culture possèdent une membrane lipidique dérivée de la cellule hôte ⁸⁶. Le HEV est depuis qualifié de virus « quasi-enveloppé ». La composition de l'enveloppe du HEV a été caractérisée très récemment dans des cellules HepG2/C3A ⁸⁷. Elle contiendrait plus de cholestérol, de phosphatidylsérine (PS), de sphingomyéline et de céramides que la membrane des cellules HepG2/C3A mais moins de phosphoinositides et d'acides gras polyinsaturés. Il a été suggéré que la membrane protégerait les particules de la réponse immunitaire de l'hôte.

2- Le génome du HEV

Le génome du HEV est composé d'un ARN simple brin de polarité positive de 7.2kb comprenant une coiffe methylguanine à son extrémité 5' et une queue polyA à son extrémité 3' ⁸⁸ (Figure 7). Le génome possède 3 cadres ouverts de lecture (ORFs) : L'ORF1, codée par l'ARN génomique, correspond à une protéine possédant des motifs de fonctions non structurales ; L'ORF2 et l'ORF3, codés à partir d'un ARN subgénomique, vont respectivement coder pour la protéine de capsid et une phosphoprotéine ayant à la fois des fonctions structurales et non structurales. L'ARN subgénomique présente une taille de 2.2kb, une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. C'est un ARN bicistronique, c'est-à-dire qu'il va permettre la traduction de l'ORF2 et l'ORF3 à partir de deux cadres de lectures différents ⁸⁹. Récemment, une protéine supplémentaire, ORF4, a été décrite mais uniquement au sein du génotype 1 du HEV. L'expression de l'ORF4 n'est pas dépendante de la coiffe mais d'un promoteur interne similaire à un IRES (pour *internal ribosome entry site*) situé entre les nucléotides 2701 et 2787 du génome du HEV-1 ⁹⁰.

Récemment, un crible double hybride a été réalisée sur l'interactome intravirale du HEV ⁹¹. Ce crible a montré que les différents domaines de l'ORF1, ainsi que l'ORF3, sont capables d'interagir entre eux, suggérant que les différents domaines et protéines composant le génome du HEV coopéreraient pour leurs activités.

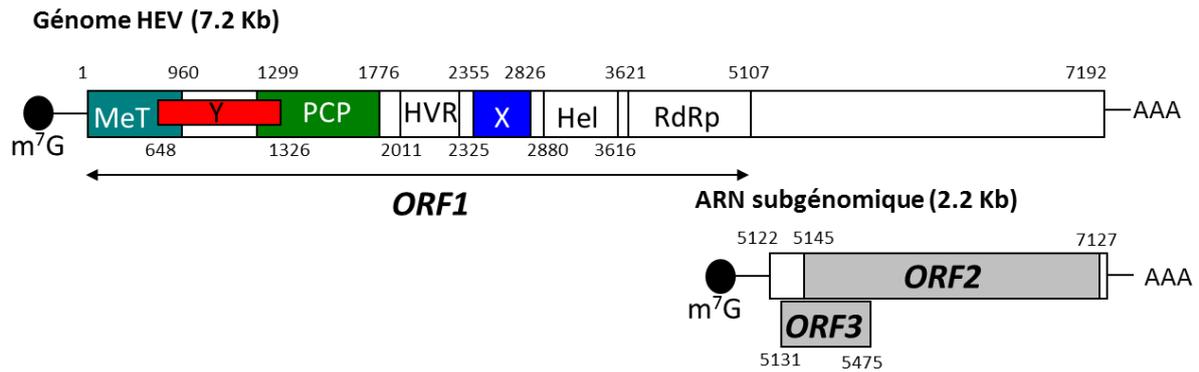


Figure 7. Organisation du génome du HEV, de l'ARN subgénomique et des ORFs.

Met : domaine méthyltransférase ; PCP : Protéase à cystéine similaire à la papaïne ; HVR : domaine hypervariable ; Hel : hélicase ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante. Les nombres indiquent les positions nucléotidiques des ORFs ou domaines d'ORFs sur le génome.

α- L'ORF1 du HEV

L'ORF1 code pour une polyprotéine de 1693 acides aminés possédant les fonctions non structurales. Des domaines fonctionnels ont été identifiés (Figure 7): un domaine méthyltransférase (Met), un domaine protéase similaire à la papaïne (PCP), un domaine X ou macrodomaine, une hélicase (Hel) et une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). D'autres domaines n'ont pas encore une fonction connue : c'est le cas du domaine Y et de la région hypervariable (HVR).

Cependant, il n'est pas encore très clair si l'ORF1 est présent au sein des cellules infectées comme une polyprotéine entière ou si elle est clivée en différentes sous unités fonctionnelles, comme c'est le cas pour les autres virus à ARN positif. Certaines études ont montré que la polyprotéine n'était pas clivée. Il a été montré, dans des cellules 293T exprimant l'ORF1, d'une souche de HEV-3 de porc fusionnée avec des étiquettes FLAG et HA aux extrémités amino- (N-) et carboxy- (C-) terminales, que seul un produit de 185kDa était détecté ⁹². De même, en infectant des cellules HeLa ou Huh7 avec un virus de la vaccine (VACV) exprimant la polymérase T7, suivi d'une transfection avec un plasmide codant pour l'ORF1 complète, il n'a été rapporté aucun clivage significatif ⁹³.

Au contraire, d'autres études ont rapporté un clivage en plusieurs fragments de tailles différentes dans d'autres systèmes d'expression. Dans des cellules HepG2 transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome complet du HEV, des bandes correspondant aux domaines Met (~35kDa), Hel (~38kDa) et RdRp (~36kDa) furent détectées après

immunoprécipitation ⁹⁴. Dans une étude utilisant un système d'expression en baculovirus, la protéine ORF1 était clivée en différents peptides correspondant aux différents domaines fonctionnels décrits ^{95,96}. Parmi eux, un fragment de 35KDa a été caractérisé comme étant la protéine Met par spectrométrie de masse. Plus récemment, l'expression du domaine protéase en système *E. coli* était capable d'induire le clivage de l'ORF1 en un domaine Met de ~35KDa et un domaine réplicase de ~35KDa ⁹⁷. Dans des cellules Huh7-S10, l'expression de l'ORF1 a conduit à la détection de produits clivés de ~35 KDa du côté N-terminal et ~78KDa du côté C-terminal ⁹⁸. D'autres études doivent encore être menées pour confirmer ou non le clivage de l'ORF1.

Le domaine méthyltransférase (Met)

Le domaine le plus N-terminal de l'ORF1, situé entre les résidus 60 à 240, est la méthyltransférase virale ⁹⁹. La méthyltransférase catalyse le coiffage de l'ARN viral à son extrémité 5'. L'activité méthyltransférase a été mise en évidence dans une étude portant sur l'enzyme de coiffage du HEV. En effet, il a été montré grâce à un système d'expression en baculovirus, qu'une protéine de 110KDa, exprimée à partir des 979 premiers acides aminés de l'ORF1, possédait une activité guanine-7-methyltransferase et guanyltransferase ⁹⁵.

Le domaine Y

La fonction du domaine Y est encore peu caractérisée. Très récemment, il a été montré que des mutations de sites nucléotidiques très conservés dans le domaine Y des 4 génotypes humains du HEV, mais également chez d'autres virus « alpha-like », réduisait drastiquement la réplication de l'ARN viral et l'infectivité, suggérant que le domaine Y jouerait un rôle critique dans la réplication du HEV ¹⁰⁰.

Le domaine protéase (PCP)

Le domaine PCP du HEV est situé en aval du domaine Y entre les acides aminés 433 à 592. Ce domaine présente des similarités avec le domaine PCP du virus de la rubéole (RubV) ⁹⁹ mais également avec d'autres virus de la superfamille « alpha-like », ainsi que de la famille des coronavirus et les artérovirus. La protéine codée par le domaine PCP du RubV est capable de cliver en aval du domaine PCP, au niveau d'une séquence de 3 glycines ¹⁰¹. Cependant, l'activité protéase du domaine PCP du HEV a d'abord été mise en doute. En effet, dans un

système d'expression utilisant le VACV, une mutation au sein du domaine catalytique potentiel du PCP (Cys483) n'a induit aucun effet sur le clivage de l'ORF1¹⁰². Plus récemment, des études ont montré que le domaine PCP de l'ORF1 possédait bien une activité cystéine-protéase. En exprimant différents mutants de l'ORF1 dans des cellules Huh7-S10-3⁹⁸, 6 mutants Cys→Ala (C457A, C459A, C471A, C481A, C483A) et 3 mutants His→Leu (H443L, H497L, H590L) étaient capables de bloquer la réplication de l'ARN viral. Parmi eux, les résidus C483 et H590 ont été prédits comme étant les résidus catalytiques potentiels⁹⁹. Dans la même étude, une séquence, similaire à celle du site de clivage présente dans le génome du RubV, a été identifiée comme site de clivage potentiel du domaine PCP du HEV (G815-G816-G817). De plus, des mutations au niveau des résidus G816 et G817 inhibent complètement la réplication virale, suggérant que le clivage jouerait un rôle important pour l'activité des différents domaines. Dans une autre étude, un modèle 3D du domaine PCP a été proposé, suggérant la présence d'un site catalytique C434-H443, d'un domaine de liaison au zinc et d'un domaine de liaison à la calmoduline dépendant du Ca²⁺, similaires aux domaines retrouvés dans le domaine PCP du RubV¹⁰³. L'activité enzymatique du domaine PCP du HEV a été démontrée directement en exprimant et purifiant le domaine PCP en système *E. coli*⁹⁷. Le clivage de l'ORF1 et de l'ORF2 par la PCP a été montré par un test de digestion enzymatique. En utilisant différents inhibiteurs, le domaine PCP a été caractérisé comme étant une protéase similaire à la chymotrypsine. Enfin, une analyse par mutagenèse dirigée a permis d'identifier les sites actifs de la PCP au niveau des acides aminés H443, C472, C481 et C483, confirmant ainsi les études précédentes. Ces différentes études suggèrent donc que le domaine PCP du HEV est bien une protéase fonctionnelle permettant le clivage de l'ORF1.

D'autres activités ont été attribuées au domaine PCP du HEV. Notamment, le domaine PCP, en association avec les domaines Met et Y (domaine « MetPCP ») possède une activité de déubiquitinylation et de déISGylation des protéines¹⁰⁴. L'ISG15 est une molécule similaire à l'ubiquitine qui va modifier la fonction d'une protéine cible via un mécanisme d'ISGylation (voir paragraphe II-C-1-b-).

Le domaine hypervariable (HVR)

La fonction de la région HVR n'est pas encore clairement établie. Cependant, différentes études semblent indiquer que cette région aurait un rôle dans la réplication et l'infectivité

du génome viral. Une atténuation de l'infectivité du HEV chez le poulet a été observée après inoculation intrahépatique d'un ARN infectieux dans lequel une délétion de la région HVR avait été introduite ¹⁰⁵. Le même phénomène a été observé chez le porc après inoculation intrahépatique d'un ARN infectieux dans lequel la majorité de la région HVR avait été délétée ¹⁰⁵. De plus, des délétions au sein de la région HVR réduisaient la répllication du virus dans des cellules Huh7 ¹⁰⁶.

Il a été suggéré que l'insertion de séquences dans la région HVR pourrait jouer un rôle dans l'adaptation du virus. En effet, des insertions de séquences dans la région HVR ont été retrouvées chez des patients infectés, et ces insertions ont permis l'adaptation du virus à la culture cellulaire. Notamment, l'insertion d'un fragment de 174 nucléotides codant pour une partie de la sous-unité S17 du ribosome dans une souche de HEV-3 (Kernow-C1), isolée d'un patient présentant une hépatite chronique, a permis l'adaptation du virus à la culture dans des cellules HepG2/C3A ¹⁰⁷. De plus, l'insertion expérimentale de cette séquence dans la région HVR d'une souche de HEV-1 a permis l'infection de différentes lignées cellulaires animales, suggérant un rôle dans le passage de la barrière d'espèce ¹⁰⁸. De la même façon, l'insertion d'un fragment de l'ORF1 a été retrouvée dans la région HVR du génome d'un virus provenant d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3c), et cette insertion a permis l'adaptation du HEV à la lignée A549 ¹⁰⁹.

Le domaine X ou Macrodomaine

Le domaine X, ou macrodomaine, est localisé entre les acides aminés 785 à 942 de l'ORF1. Sa fonction reste cependant méconnue. Le macrodomaine est conservé dans de nombreux organismes : il est retrouvé chez les archaées, les bactéries, les invertébrés (*Drosophila melanogaster*), les amphibiens, les mammifères (homme, souris) et les plantes ¹¹⁰. On l'appelle « macrodomaine » du fait de sa similarité avec le domaine non-histone de l'histone macroH2A chez l'homme. Le macrodomaine est également retrouvé chez d'autres virus à ARN positif tels que les coronavirus et les alphavirus.

Chez les organismes eucaryotes, les macrodomaines joueraient un rôle dans les mécanismes d'ADP-ribosylation des protéines. En effet, le macrodomaine est un module d'une sous-classe de poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs), appelée macroPARPs. Ce module permettrait de lier les molécules d'ADP-ribose et de les transférer à leurs protéines cibles. Ce mécanisme de poly(ADP) ribosylation ou PARylation est une modification post-

traductionnelle impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, l'interférence ARN, l'inactivation du chromosome X, le remodelage de la chromatine et la division cellulaire ¹¹¹. Il a également été montré que les macrodomaines chez l'homme avaient un rôle important dans le développement et présentaient un rôle anti-apoptotique ¹¹⁰.

Au contraire, le rôle des macrodomaines viraux reste encore peu compris. En dehors de la famille des coronavirus, seuls le RubV, les alphavirus et le HEV possèdent un macrodomaine. Certains macrodomaines viraux lient efficacement le poly(ADP)-ribose et sont capables d'hydrolyser l'ADP-ribose-1-phosphate (ADPR-1-P), suggérant une implication potentielle dans les voies de signalisation dépendantes du poly(ADP)-ribose ^{112,113}. Cependant, les macrodomaines viraux présentent une forte affinité pour le poly(A) et une faible affinité pour l'ADP-ribose monomérique, au contraire des macrodomaines présents chez l'homme ¹¹³, suggérant qu'ils seraient plus impliqués dans des voies de signalisation impliquant l'ARN plutôt que des dérivés d'ADP-ribose.

Des liens entre macrodomaine et immunité innée ont été décrits ces dernières années. Dans le cas du virus MHV (pour *mouse hepatitis virus*/ virus de l'hépatite murine), le macrodomaine est responsable d'une induction excessive de cytokines pro-inflammatoires, ce qui augmenterait la virulence du virus dans le foie ¹¹⁴. Il a également été rapporté que le macrodomaine de la protéine nsP3 du virus Sindbis (SNV) était important pour la réplication virale dans les neurones et pour la neurovirulence chez la souris ¹¹⁵. Une autre étude a mis en évidence que des mutations au niveau du macrodomaine du coronavirus humain 229E et du SARS-CoV (syndrome respiratoire aigu sévère lié au coronavirus) induisent une augmentation de la sensibilité aux effets antiviraux de l'interféron- α (IFN- α) ¹¹⁶, suggérant que l'activité ADPR associée au macrodomaine aurait un rôle dans l'échappement viral à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le macrodomaine du HEV posséderait un site catalytique ADP-ribose-1-monophosphatase, essentiel à la réplication virale ¹¹⁷. Il serait également capable d'hydrolyser les protéines ADP-ribose afin de supprimer les mono(ADP-ribose) et les chaînes de poly(ADP-ribose) des protéines mono- ou poly(ADP)-ribosylées, respectivement ¹¹⁸. De plus, la présence de l'hélicase en *cis* augmente de façon importante l'attachement du macrodomaine aux poly(ADP-ribose) et stimule l'activité de dé-PARylation ¹¹⁸. Enfin, en introduisant des mutations au niveau des acides aminés impliqués dans les mécanismes de dé-MARylation

(mono(ADP) ribosylation) et dé-PARylation, il a été observé une diminution de la réplication virale, suggérant que ces activités sont essentielles à la réplication du HEV ¹¹⁸. Des expériences de double-hybride ont montré que le macrodomaine X interagissait directement avec le domaine Met et la protéine ORF3, suggérant un rôle important du domaine X dans le cycle cellulaire du HEV ¹¹⁹. Dans une autre étude, il a été montré que le macrodomaine interagissait directement avec la chaîne légère de la ferritine humaine. Ces résultats suggèrent qu'en se liant à la ferritine, le macrodomaine l'empêcherait d'entrer dans la circulation sanguine, permettant ainsi une atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte ¹²⁰. En effet, chez les personnes infectées, l'augmentation du taux de ferritine dans le sang, due à la cytolyse hépatique, induirait une augmentation de la réponse inflammatoire, qui serait alors diminuée par le macrodomaine.

Le domaine hélicase (Hel)

Le génome du HEV possède un domaine hélicase, qui est essentiel pour la réplication virale. Les hélicases sont des protéines capables de dérouler les brins d'acides nucléiques en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (activité ATPase). Il a été proposé après analyse de la séquence que l'hélicase du HEV aurait un domaine NTPase, permettant l'hydrolyse des nucléotides triphosphate, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN ⁹⁹. Ces activités NTPase et de déroulement de l'ARN ont été confirmées par la suite en système *E. coli* ¹²¹. De plus, après introduction de mutations dans les motifs Ia et III, caractéristiques des hélicases, il a été montré une diminution majeure des activités ATPase et de déroulement de l'ARN, suggérant que ces motifs joueraient un rôle crucial dans les fonctions enzymatiques de la protéine ¹²². L'hélicase possède également une activité 5'-triphosphatase, c'est-à-dire qu'elle permet le clivage des γ -phosphates de l'extrémité 5' des transcrits d'ARN, étape essentielle au coiffage des ARN ¹²³.

Le domaine de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp)

Le domaine à l'extrémité C-terminale de l'ORF1 est le domaine codant pour la polymérase virale. Tous les virus à ARN positif codent pour une ARN polymérase ARN dépendante, enzyme nécessaire à leur réplication. Elle permet la réplication de l'ARN génomique en un ARN anti-génomique intermédiaire. La comparaison de la séquence du RdRp du HEV avec celle d'autres virus a montré une homologie avec les polymérase du RubV et BNYVV (pour

Beet necrotic yellow vein virus)⁹⁹. On retrouve bien dans l'enzyme codée par le HEV les 8 domaines conservés (I-VIII) décrits chez les autres virus à ARN positif, notamment la séquence GDD permettant la liaison avec le Mg²⁺ qui est nécessaire à l'activité de la polymérase.

Une étude en système d'expression *E. coli* a montré que le domaine RdRp est capable de se lier à l'extrémité 3' du génome du HEV¹²⁴ et que deux structures tiges-boucles ainsi que la queue poly(A) seraient requises pour cette liaison. La polymérase serait aussi capable de s'associer au promoteur subgénomique putatif et à la région 5' non codante, mais l'affinité à la région 3' serait meilleure¹²⁵. De plus, la protéine RdRp serait capable d'utiliser l'extrémité 3' du HEV comme matrice pour synthétiser l'ARN complémentaire *in vitro*¹²⁴ et *in vivo*¹²⁶. En utilisant une protéine RdRp fusionnée à la GFP (pour *green fluorescent protein*), il a été montré que la RdRp était localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (RE), suggérant que, comme pour d'autres virus à ARN, le RE pourrait être le site de réplication du HEV¹²⁶.

Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence l'apparition d'une mutation G1634R dans la RdRp, chez des patients atteints d'une hépatite chronique et sous traitement par la ribavirine. Cette mutation, sélectionnée par la pression de sélection exercée par la ribavirine, entraîne une augmentation de la capacité répliquative du HEV et serait responsable de l'échec du traitement chez les patients transplantés¹²⁷⁻¹²⁹.

b- L'ORF2 du HEV

Expression et glycosylation

L'ORF2 du HEV code pour la protéine de capsid, de 660 acides aminés (Figure 8) : elle va permettre l'encapsulation de l'ARN génomique. L'ORF2 existe à la fois sous forme de glycoprotéine de 88 kDa et sous une forme non-glycosylée de 72 kDa. Elle est exprimée dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique¹³⁰ et peut former des homodimères¹³¹. Une étude récente a également montré une localisation nucléaire de l'ORF2 dans des biopsies de foie provenant de patients infectés¹³².

La protéine contient une séquence hydrophobe en N-terminale (appelé peptide signal) qui va permettre sa translocation dans le RE¹³³. Le clivage du peptide signal va conduire à la formation d'une protéine mature qui serait ensuite glycosylée au niveau de 3 sites de

glycosylation Asn-X-Thr/Ser¹³⁰ (Figure 8A). La translocation dans le RE entrainerait un stress au niveau du RE, ce qui induirait la retranslocation de la protéine dans le cytoplasme en passant par la voie de dégradation des protéines associée au RE (ERAD pour *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*). Cependant, contrairement à la plupart des protéines qui suivent cette voie de dégradation, la protéine ORF2 n'est pas dégradée par le protéasome mais reste stable dans le cytoplasme¹³⁴.

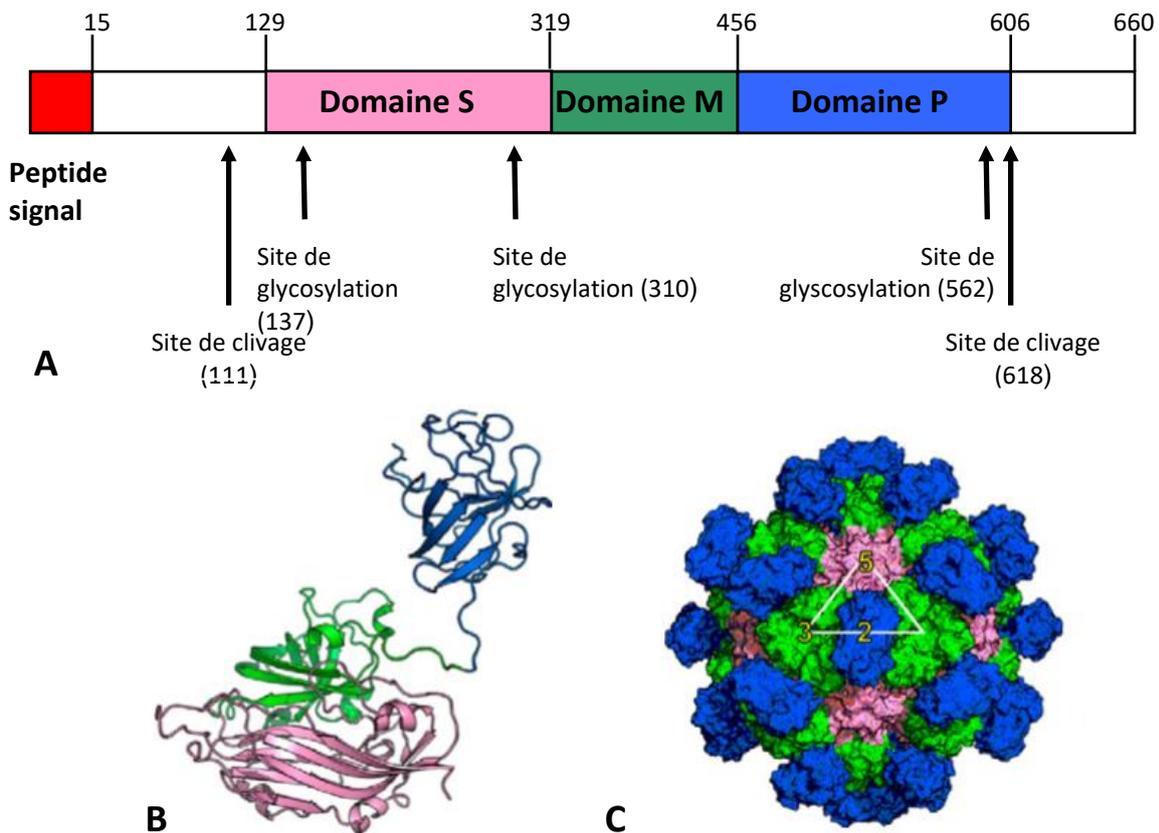


Figure 8. Structure de la protéine ORF2 (A et B) et de la capsid virale (C)¹³⁵. Les domaines S, M et P sont respectivement représentés en rose, vert et bleu.

La glycosylation de la capsid n'étant pas quelque chose de commun chez les virus non enveloppés, la pertinence biologique de cette modification pour l'infection par le HEV n'est pas encore clairement établie. Il semblerait que la glycosylation ne soit pas requise pour son expression à la membrane plasmique¹³³, ni pour son expression au niveau du cytoplasme¹³⁶. De plus, en utilisant des mutants au niveau des trois sites de glycosylation, il a été montré que ces mutations n'affectaient ni la répllication virale ni la synthèse de la protéine de capsid¹³⁷. Cependant, les mutations au niveau des deux premiers sites ont empêché la formation des virions et la mutation du troisième site a induit la formation de particules non

infectieuses. De plus, aucun des mutants générés n'a pu infecter des macaques rhésus ¹³⁷, suggérant que la glycosylation est tout de même une étape importante pour la formation et l'infectiosité des virions.

Des études en cellules d'insectes ont mises en évidence des sites de clivages, au niveau des acides aminés 111 et 618 (Figure 8A), permettant la génération d'une forme complète insoluble de 72 kDa et d'une forme soluble de 50 kDa, gardant sa capacité à former des VLPs ^{138,139}. De plus, les 111 premiers acides aminés ne sont pas retrouvés dans les virions ¹³⁵.

Auto-assemblage de la capsid virale

L'ORF2 a trois domaines distincts : le domaine S (« shell » ou coquille), le domaine M (« middle » ou milieu), et le domaine P (« protruding » ou saillant) (Figure 8). Le domaine S est formé de 8 feuillets β antiparallèles engagés de manière icosaédrique pour former la couche basale de la capsid virale. Le domaine P permet la formation d'homodimères qui vont former des protubérances à la surface de la particule virale ^{140,141}. L'ORF2 interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN viral ¹⁴². Cette interaction pourrait jouer un rôle dans l'encapsulation de l'ARN viral.

La forme non-glycosylée de la protéine ORF2 interagirait avec la forme phosphorylée de la protéine ORF3 ¹⁴³, suggérant que l'ORF3 pourrait être impliquée dans l'assemblage de la capsid virale.

Interaction de l'ORF2 avec des protéines cellulaires

L'ORF2 est capable d'interagir avec différentes protéines cellulaires, notamment avec des protéines de surface impliquées dans l'attachement de la capsid virale (voir le paragraphe II-F-3-). D'autres études ont montré que l'ORF2 est capable d'interagir avec des voies de signalisation cellulaire mais également d'activer l'expression du gène pro-apoptotique C/EBP homologous protein (CHOP) et des protéines chaperon et donc anti-apoptotiques Hsp72, Hsp70B' et Hsp40 ¹⁴⁴, suggérant que le HEV aurait un rôle modulateur sur l'apoptose de son hôte avant d'avoir complété son cycle de réplication.

c- L'ORF3 du HEV

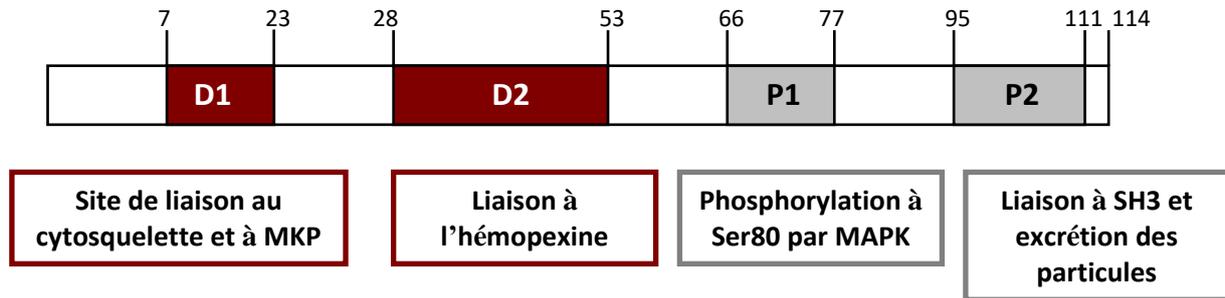


Figure 9. Structure de la protéine ORF3 et domaines d'interactions.

Copié d'Ahmad et al. 2011⁸⁸.

Expression et localisation subcellulaire

Une première étude sur l'ORF3 en système d'expression en levure a mis en évidence la formation d'une protéine de 123 acides aminés, non glycosylée, qui ne subit aucun clivage^{130,145}. En exprimant la protéine ORF3 dans des cellules COS-1 et Huh7, il a été montré que l'ORF3 est une phosphoprotéine, phosphorylée au niveau de la serine 80 par la protéine MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*)¹⁴⁶, suggérant que l'ORF3 est phosphorylée en réponse à des signaux de croissance extracellulaire. De plus, la protéine possède deux domaines très hydrophobes à l'extrémité N-terminale (les domaines D1 et D2, Figure 9). Par des expériences de fractionnement subcellulaire, il a été montré que l'ORF3 est retrouvée dans la fraction correspondant au cytosquelette et que cette association est perdue si le domaine D1 est supprimé¹⁴⁶.

Les domaines protéiques et leurs effets sur différentes fonctions cellulaires

Par son domaine C-terminal (domaine P1 et P2, Figure 9) riche en résidus proline (motifs PXXP), l'ORF3 est capable de se lier à de nombreuses protéines cellulaires : aux protéines possédant un domaine SH3 (pour *src homology 3*)¹⁴⁷ et à la protéine Pyst1, une phosphatase qui régule négativement les protéines MAPK, permettant ainsi l'activation de la protéine ERK, un membre de la superfamille des protéine MAPK¹⁴⁸. L'ORF3 est également capable d'interagir avec l'AMBP (pour *α1-microglobulin/bikunin precursor*), permettant ainsi son clivage en α1-microglobuline et bikunine dans les hépatocytes¹⁴⁹. L'interaction entre le motif PSAP présent à l'extrémité C-terminale de l'ORF3 et la protéine TSG101 (pour *tumor susceptibility gene 101*) permettrait l'excrétion de l'α1-microglobuline via le système ESCRT

¹⁵⁰, qui aurait des effets inhibiteurs sur le système immunitaire. De plus, l'ORF3 interagit par sa région C-terminale avec le deuxième produit de clivage de l'AMBP, la Bikunine ¹⁵¹. La Bikunine est un inhibiteur de protéase spécifique du foie, ayant également des fonctions inhibitrices sur le système immunitaire. L'ORF3 est également capable de s'homodimériser via son domaine C-terminal ¹⁵².

Par son domaine D2, l'ORF3 interagit avec l'hémopexine, une glycoprotéine permettant le transport de l'hème dans le sang ¹⁵³.

L'expression de l'ORF3 induit la surexpression de la protéine de la membrane externe de la mitochondrie VDAC (pour *voltage-dependent anion channel*) ainsi que de l'hexokinase I, qui interagit directement avec VDAC ¹⁵⁴. Cette interaction permet de préserver l'intégrité de la mitochondrie et empêche le relargage du cytochrome c, suggérant que l'ORF3 aurait un rôle dans la survie cellulaire.

L'ORF3 est également capable d'interagir avec des protéines des voies de signalisation antivirales (voir chapitre III-B-2-).

Rôle dans la morphogénèse virale et l'excrétion des particules

En utilisant un clone infectieux codant pour le génome du HEV et muté au niveau de l'ORF3, une première étude a montré que l'ORF3 du HEV n'est pas requise pour la réplication, l'assemblage du virion et l'infectivité dans des cellules Huh7 ¹⁵⁵. Cependant, l'ORF3 est nécessaire à l'infection *in vivo*, suggérant qu'il aurait un rôle dans la sortie des virions de la cellule. Cette hypothèse fut confirmée par la suite en infectant des cellules PLC/PRF/5 avec un clone infectieux présentant une délétion de l'ORF3, réduisant ainsi de 99% le nombre de virions dans le surnageant ¹⁵⁶. De plus, l'ORF3 est présente à la surface des particules virales, participant ainsi à la morphologie de la particule virale. L'ORF3 présente à la surface de la particule serait associée à des lipides ¹⁵⁶. Enfin, l'ORF3 formerait également des complexes multimériques similaires à des viroporines, permettant le relargage des particules virales ¹⁵⁷.

d- L'ORF4 du HEV (génotype 1)

Très récemment, il a été montré que le stress du RE induisait la traduction d'une quatrième ORF, située entre les nucléotides 2832 et 3311 du HEV-1, nommée ORF4 (158 acides aminés). L'expression de cette ORF n'est pas dépendante de la coiffe mais d'une séquence similaire à

un IRES situé entre les nucléotides 2701 et 2787⁹⁰. De façon intéressante, l'ORF4 a été retrouvée dans différentes souches de HEV-1 et des anticorps anti-ORF4 ont été détectés dans le sérum d'un patient infecté. Au contraire, l'ORF4 n'a pas été retrouvée dans les autres génotypes. L'ORF4 interagit avec un complexe de protéines virales et cellulaires constitué de l'hélicase, la RdRp, X, eEF1 α 1 (pour *eukaryotic elongation factor 1 isoform-1*) et la β -tubuline, permettant la stimulation de la réplication du HEV⁹⁰.

3- Le cycle viral du HEV

Par manque de système de culture cellulaire efficace, le cycle viral du HEV a été peu étudié et reste hypothétique à plusieurs étapes. Le HEV présente un cycle viral exclusivement cytoplasmique. Les différentes étapes du cycle sont représentées figure 10.

La première étape du cycle constitue en l'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire. La capsid virale serait capable d'interagir avec les protéoglycanes de type héparan-sulfate membranaires dans des cellules Huh7¹⁵⁸, mais aussi avec l'ectodomaine du récepteur à l'asialoglycoprotéine 1 et 2, un récepteur exprimé spécifiquement au niveau du foie, dans des cellules PLC/PRF/5¹⁵⁹. Ensuite, la particule virale s'associe à un récepteur n'ayant pas encore été identifié (étape 2), suivi d'une étape d'internalisation de la particule (étape 3) qui semble s'effectuer par la voie dépendante des clathrines et de la dynamine-2^{160,161}. Dans le cas des particules quasi enveloppées, le trafic endosomal et l'acidification seraient des étapes critiques à l'entrée et l'enveloppe serait dégradée dans des endolysosomes avant la décapsidation virale¹⁶². Il semblerait donc que les particules non enveloppées pénètrent au niveau de la membrane plasmique alors que les particules enveloppées pénètrent au niveau des endolysosomes. Le génome du HEV est ensuite décapsidé par un mécanisme également inconnu.

Certaines protéines cellulaires joueraient un rôle dans le transport intracellulaire de la capsid virale. C'est le cas de la heat-shock protein 90 (HSP90)¹⁶³. En effet, il a été montré qu'une inhibition spécifique de l'HSP90 induit un blocage du transport de la capsid virale. L'HSP90 est une protéine chaperonne normalement impliquée dans le transport de différents récepteurs membranaires. Cela suggère que l'HSP90 permettrait le transport des protéines de capsides vers la membrane cytoplasmique ou une destination cytoplasmique

spécifique. L'interaction entre ORF2 et une autre protéine chaperonne, Grp78 (pour *Glucose regulated protein 78*) ou HSP70 a également été démontrée ¹⁶⁴. Cette protéine étant présente à la fois au niveau de la membrane plasmique et du RE, il a été suggéré qu'elle pourrait être impliquée dans l'endocytose du HEV ¹⁶⁴. Une interaction avec l' α -tubuline a également été montrée ¹⁶³, suggérant que la capside utilise le réseau de microtubules pour se déplacer.

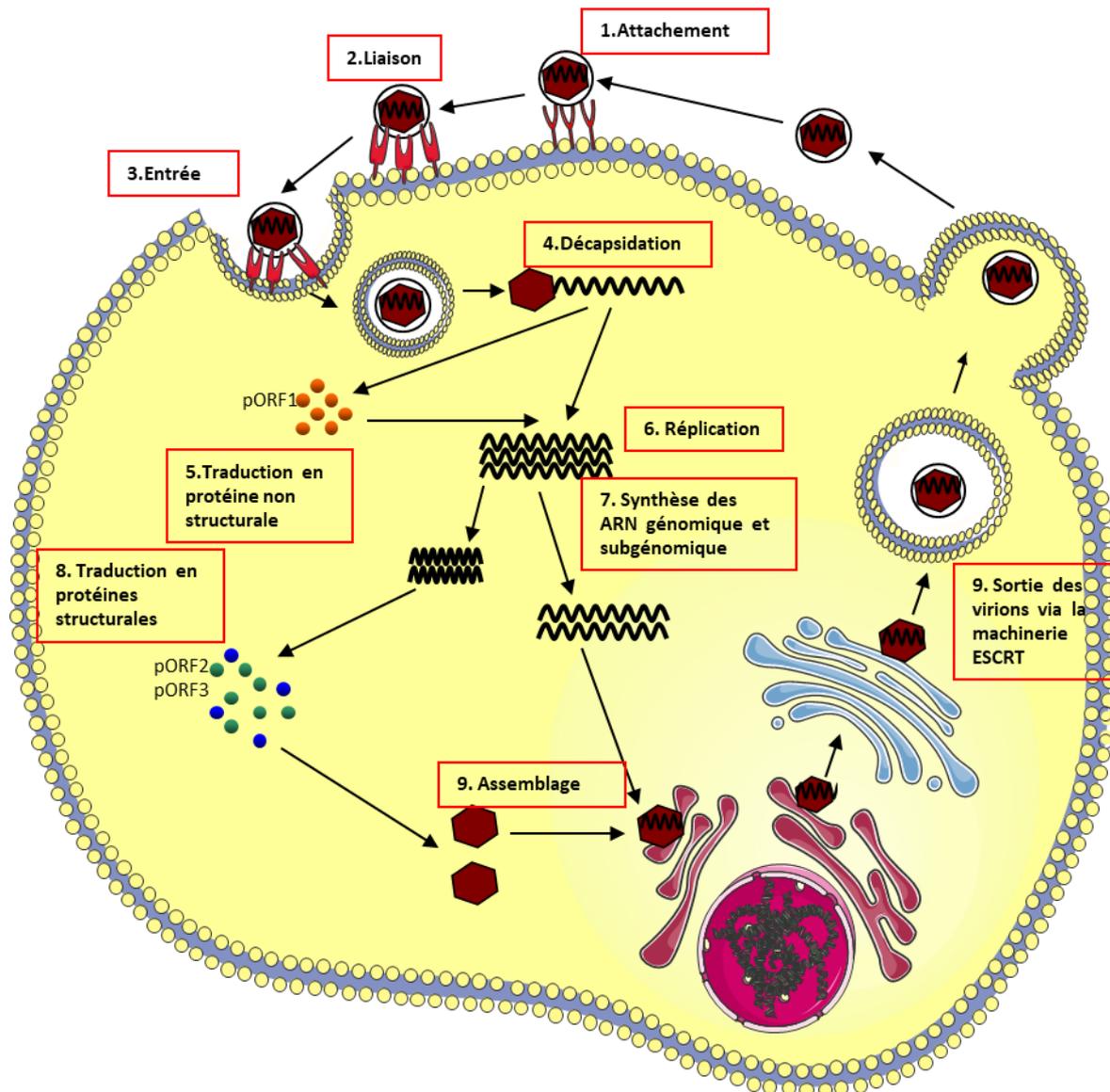


Figure 10. Schéma du cycle viral du HEV.
(Voir texte pour explications détaillées).

Après l'étape de décapsidation et du relargage du génome viral dans les cellules, la coiffe de l'ARN viral recrute la sous unité 40S du ribosome pour initier la traduction de la protéine non structurale, l'ORF1 (étape 5). La RdRp codée par l'ORF1 va permettre la réplication de l'ARN

viral (étape 6). Un intermédiaire ARN de polarité négative va être produit par la RdRp ¹⁶⁵ et va servir de matrice à la production des ARN génomiques de polarité positive et des ARN subgénomiques (étape 7). L'ARN subgénomique va ensuite être traduit en protéines ORF2 et ORF3 (étape 8).

L'ORF2 va ensuite permettre l'assemblage de la particule virale et l'encapsidation de l'ARN génomique. L'ORF3 va être impliquée dans la sortie des particules. En effet, le domaine C-terminal de l'ORF3 contient un domaine PSAP conservé (proline-sérine-alanine-proline) avec lequel il interagit avec la protéine Tsg101 ^{166,167}, un composant de la machinerie d'export cellulaire ESCRT. Cette interaction induit l'assemblage des virions dans des corps multivésiculaires, qui vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique ¹⁶⁸. D'autres composants des voies de sécrétions exosomales ont été montrés comme étant requis pour la sortie du HEV des cellules. C'est le cas des protéines Rab27 et Hrs ¹⁶⁹, ainsi que de la protéine Vps4 (pour *vacuolar protein sorting-associated protein 4*), une ATPase qui désassemble les composants de la machinerie ESCRT ¹⁶⁷. De plus, la protéine CD63, un marqueur des exosomes, colocalise avec les protéines ORF2 et ORF3.

L'origine de l'enveloppe du HEV n'est pas encore claire. Il a été suggéré que les membranes proviendraient du réseau trans-golgi (TGN) car elles contiennent la protéine TGOLN2 (pour *trans-golgi network protein 2*) ¹⁷⁰. Enfin, il a été montré que l'ORF3 est capable d'interagir avec les microtubules et augmente leur stabilité ¹⁷¹. Cette interaction nécessite la présence d'une protéine motrice, la dynéine, et les deux domaines N-terminaux hydrophobes de l'ORF3 sont requis pour cette interaction. Cela suggère que le HEV utiliserait le réseau de microtubules pour se déplacer dans la cellule.

G- Les systèmes de culture cellulaire du HEV

Le HEV a été pendant longtemps un virus difficile à étudier du fait de l'absence de système de culture cellulaire efficace. Cependant, différents systèmes de culture ont commencé à être mis en place ces dernières années. D'une part en utilisant des clones infectieux codant pour le génome complet du HEV, d'autre part en cultivant des virus provenant de fèces ou de sang de patients infectés par le HEV.

1- Utilisation de clones infectieux codant pour le génome du HEV

Du fait de l'absence de système de culture cellulaire efficace, des clones infectieux codant pour le génome du HEV-1^{94,172}, HEV-3¹⁷³⁻¹⁷⁵, HEV-4^{176,177}, HEV aviaire^{178,179} et HEV de rat^{180,181} ont été développés. L'avantage de l'utilisation de ce système de génétique inverse est qu'elle permet, via des mutations au niveau de gènes d'intérêts, d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réplication du HEV ainsi que la fonction de protéines virales pendant le cycle de réplication. Des mutations dans la région HVR d'un clone infectieux de génotype 1 ont permis de mettre en évidence son rôle dans la réplication^{105,106}. De plus, la transfection des ARN transcrits *in vitro* permet de contourner les étapes d'entrée et de décapsidation, étapes qui peuvent restreindre le tropisme viral à un type cellulaire particulier. En effet, une étude a montré que parmi 4 types cellulaires dans lequel l'ARN de HEV-1 pouvait se répliquer (PLC/PRF/5, Huh7, Caco-2 et HepG2/C3A), seules les cellules HepG2/C3A étaient capable d'être infectées¹⁸². Dans certaines cellules comme les cellules Huh7, la formation, l'excrétion des particules virales, et donc la réalisation d'un cycle viral complet ne sont pas observés¹⁸². Les clones infectieux peuvent donc être utiles pour mieux comprendre les mécanismes de réplication du HEV mais ne sont pas de bons modèles pour étudier les mécanismes d'entrée et de propagation, d'où la nécessité d'avoir des modèles de cellules infectées.

2- Infection de lignées cellulaires par le HEV

L'infection directe de lignées cellulaires avec du virus isolé de sang ou de fèces de patients infectés a pendant longtemps posé problème. Des tentatives de modèles de culture *in vitro* du HEV ont été réalisées dans des hépatocytes primaires de macaques cynomolgus^{183,184}. Par la suite, des titres viraux élevés, de l'ordre de 10^7 à 10^8 copies/ml, ont été obtenus suite à l'infection de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5 ainsi que de la lignée pulmonaire A549 par des souches de HEV-3 et HEV-4 provenant de fèces de patients présentant respectivement une hépatite aiguë et fulminante^{185,186}. La propagation réussie des virus dans ces deux lignées était due au titre viral élevé de l'inoculum de départ. En effet, comme les virus à ARN existent sous forme de quasi espèce, un échantillon avec un titre viral élevé a une plus forte

probabilité de contenir des variants possédant des mutations avantageuses leur permettant d'infecter les cellules en culture. L'infection de la lignée A549 avec du virus provenant d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3c) a également été un succès, permettant la mise en place d'une lignée A549 infectée de manière persistante par le HEV ^{109,187}. Une insertion d'un fragment de l'ORF1 a été retrouvée dans la région HVR du génome. Une des limites du modèle en cellules PLC/PRF/5 est qu'elles contiennent des gènes du HBV intégrés, ce qui pourrait affecter la réplication du HEV. Quant aux cellules A549, ce ne sont pas des cellules d'origine hépatique, elles ne représentent donc pas un modèle pertinent pour l'étude du HEV.

Une souche de HEV-3 (Kernow-C1), isolée d'un patient présentant une hépatite chronique, a été utilisée pour infecter des cellules HepG2/C3A. Après analyse de la séquence du virus adapté au 6^{ème} passage, une insertion de 58 acides aminés a été retrouvée dans la région HVR de l'ORF1, correspondant à un fragment d'un gène codant pour la sous-unité S17 du ribosome ^{107,188,189}. Cette découverte, de paire avec l'étude portant sur l'insertion d'un fragment de l'ORF1 dans la région HVR, semble indiquer que l'adaptation du HEV en culture pourrait nécessiter une insertion dans cette région HVR.

Des cellules hépatocytaires humaines HepaRG, isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 développée consécutivement à une hépatite C chronique, ont été infectées avec succès par le HEV dans le laboratoire ¹⁹⁰. Ces cellules représentent un très bon modèle d'infection par le HEV. En effet, elles sont capables de se différencier en hépatocytes et cellules biliaires, présentent une activité cytochrome P450 et ont une expression des gènes similaires aux hépatocytes primaires humains (PHHs pour *primary human hepatocytes*).

Récemment, des cellules souches pluripotentes ont été utilisées ⁴¹. Ces cellules ont été différenciées en hépatocytes, cellules mésodermes et neuroprogéniteurs puis infectées avec la souche Kernow-C1. Dans cette étude, seul les hépatocytes permettait la réalisation d'un cycle de réplication complet et la production de virions infectieux, faisant de ces cellules un bon modèle pour l'infection par le HEV. Au contraire, les cellules mésodermes et les neuroprogéniteurs permettaient la réplication du HEV seulement après transfection d'un clone infectieux, suggérant que le virus est bloqué au niveau des étapes d'entrée dans ces cellules. De plus, une autre étude sur différentes lignées neuronales dont des cellules neuronales humaines dérivées de cellules souches pluripotentes a montré que ces cellules étaient permissives à une infection par la souche Kernow-C1 et permettaient une

réplication du virus sur le long terme et la production de virions ⁴³. Ces lignées sont donc de bons modèles pour l'étude des pathologies neuronales induites par le HEV.

Différents modèles ont donc été mis en place ces dernières années, permettant plus d'études sur la biologie du virus et notamment son interaction avec l'immunité innée.

H- Les modèles animaux du HEV

Au cours des dernières années, différentes espèces animales ont été utilisées comme modèles d'infection du HEV, mais lors de sa découverte dans les années 90, seuls des modèles de primates avaient été utilisés. Les macaques cynomolgus et rhésus sont sensibles à l'infection par les 4 génotypes humains (HEV-1 à HEV-4), conduisant à la sécrétion de VLPs, observées par microscopie électronique, et au développement d'une hépatite, caractérisée par une élévation des enzymes hépatiques, une virémie et une séroconversion ⁶. Cependant, du fait de ressources limitées pour la production de ces animaux, des problèmes éthiques pour leur utilisation, des procédures expérimentales difficiles et chères, peu de données ont été finalement collectées sur la pathogénèse du HEV en utilisant ces modèles.

Depuis l'identification de souches de HEV-3 et HEV-4 naturellement présentes chez les suidés domestiques et sauvages, des porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) ont été infectés avec succès avec des souches provenant de patients infectés par des HEV-3 ou -4 ⁶. Les porcs infectés présentent une virémie, une séroconversion et excrètent des particules de HEV infectieuses dans les fèces, tout en restant asymptomatique ¹⁹¹. Il n'y a aucune preuve de maladie, ni d'élévation des enzymes hépatiques dans ce modèle, toutefois des sites de réplication extra hépatiques du HEV ont été mis en évidence ^{192,193}. Par ailleurs, le modèle porcin a permis de montrer que les porcs sont résistants à l'infection par des souches de HEV-1 ou HEV-2. Ce modèle animal est donc très utile pour étudier la réplication du HEV et les infections inter-espèces. Plus récemment, un modèle d'infection du HEV a été développé dans des porcs miniatures. Ces porcins peuvent être infectés par les HEV-3 et HEV-4 et présentent les mêmes caractéristiques que l'infection chez le porc domestique ¹⁹⁴. Les porcs miniatures sont plus petits (3 Kg) que les porcs conventionnels (20 Kg) et sont plus faciles à manipuler, ils représentent donc un modèle alternatif au modèle porcin standard.

Grâce à l'identification des souches de HEV aviaires, un modèle de poulet infecté par le HEV a été développé. Le HEV aviaire est associé à une maladie hépatique chez la volaille, le syndrome d'hépatosplénomégalie. Des poulets EOPS, infectés par voie orale, présentent des lésions hépatiques, caractéristiques du syndrome d'hépatosplénomégalie, faisant du poulet un modèle animal pour l'étude de la pathogénèse du HEV ⁶. Des sites de réplication extra hépatiques ont également été identifiés ¹⁹⁵.

Depuis l'identification de souches de HEV chez les lagomorphes, l'infection de lapins EOPS par des souches HEV3ra conduit à l'excrétion du virus dans les fèces, une virémie et le développement d'une hépatite, caractérisée par des modifications histologiques du foie et l'augmentation du taux d'ALT dans le sérum ⁶. De plus, le développement d'une infection chronique, accompagnée d'une inflammation et d'une fibrose hépatique, a été observé ¹⁹⁶. Des antigènes du HEV et l'ARN viral ont été retrouvés dans des tissus extra hépatiques de lapins infectés ¹⁹⁷. Une transmission verticale du virus et une forte mortalité chez des lapines gestantes ont été observées ¹⁹⁸. Ce modèle peut être utile pour étudier l'infection par le HEV, la pathogénèse causée par les souches de HEV3ra mais également pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins.

Les rongeurs étant faciles à produire et à manipuler, ils sont fréquemment utilisés en recherche. L'infection de rat Wistar avec du HEV provenant de rats sauvages, induisit une séroconversion et l'excrétion du virus dans les fèces ¹⁹⁹. Cependant, les résultats d'infections obtenus après inoculation de rats avec des souches de HEV-1, -2, -3 et -4 restent contradictoires ⁶ et l'utilité du rat comme modèle pour l'infection par le HEV reste donc encore à démontrer.

Très récemment, des furets ont été inoculés par voie orale avec une souche de HEV de furet, conduisant à une infection caractérisée par la présence d'ARN viral dans les fèces, une virémie, une séroconversion et une élévation significative du niveau d'ALT dans le sang. Ces résultats suggèrent que les furets pourraient être utilisés comme modèles animaux de l'infection par le HEV ²⁰⁰.

La gerbille de Mongolie pourrait être un modèle prometteur pour l'étude de la réplication et de la pathogénèse des HEV-1 et HEV-4. En effet, des gerbilles ont été infectées avec succès avec une souche de HEV-4 provenant d'un échantillon de foie de porc ou avec une souche de HEV-1 isolée d'un patient présentant une hépatite aiguë ⁶. Dans ce modèle, il a été montré que le HEV-4 porcin était capable de passer la barrière hématoencéphalique et se répliquer

dans le cerveau et la moelle épinière. Cela suggère que les gerbilles de Mongolie pourraient constituer un modèle d'étude des troubles neurologiques associées à l'infection par le HEV ²⁰¹.

La souris est aussi un modèle animal très utilisé pour étudier les infections par de nombreux virus. Dans une étude, des souris balb/c nude ont été inoculées avec une souche porcine de HEV-4 et des antigènes viraux ont été détectés au niveau du foie et dans d'autres sites extra hépatiques ²⁰². De plus, des modifications histologiques au niveau du foie et de la rate et une augmentation du niveau des enzymes hépatiques ont été observées. De plus, très récemment, un modèle de souris chimérique possédant un foie humanisé a été développé. Pour cela, le foie de souris UPA/SCID a été repeuplé avec des hépatocytes primaires humains puis les animaux ont été inoculés avec des souches de HEV-1 ou HEV-3 ²⁰³. Une excrétion du virus dans les fèces et une virémie ont été observées. Dans ce modèle, une transmission naturelle a été observée entre une souris infectée et trois souris humanisées naïves hébergées dans la même cage. L'exposition au HEV par voie orale ou micro lésions a permis de transmettre l'infection. De plus, les souris humanisées peuvent également développer des infections chroniques et être traitées avec succès avec de la ribavirine ^{204,205}. Ce modèle de souris humanisé semble donc être un bon outil pour étudier les infections chroniques et pour l'évaluation de traitements. Cependant, ce modèle ne permet pas les études d'immunopathogénèse impliquant des réponses immunitaires adaptatives. Des améliorations, telles que le transfert de cellules immunitaires, pourrait permettre de passer outre ces limitations dans le futur.

II- LE SYSTEME IFN-I

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme face à des infections virales. Elle est basée sur des récepteurs cellulaires appelés PRR (*pattern-recognition receptors*) qui détectent des motifs spécifiques des pathogènes appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*), conduisant à la production de cytokines, comme les interférons de type I (IFN-I), qui vont jouer un rôle important dans la lutte antivirale en activant plusieurs voies de signalisation.

A- Les interférons

L'interféron (IFN) a été décrit pour la première fois en 1957 par Isaacs et Lindenmann comme une substance produite par les cellules et capable d'interferer avec l'infection par le virus Influenza (IAV) ^{206,207}. Par la suite, il apparut que l'IFN n'était pas qu'une seule molécule mais représentait toute une famille de molécules. Il existe trois grands types d'IFN : les IFN de type I (IFN-I), les IFN de type II (IFN-II) et les IFN de type III (IFN-III).

Les IFN-I comprennent de nombreux sous types chez l'homme: l'IFN- α (qui peut être lui-même divisé en 13 sous-types différents : IFN- α 1,- α 2, - α 4,- α 5, - α 6,- α 7, - α 8,- α 10, - α 13,- α 14, - α 16,- α 17, - α 21), IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ et IFN- ω . Tous les IFN-I vont s'associer à un récepteur commun, le récepteur IFNAR (pour *Interferon alpha/beta receptor beta chain*). Les IFN-I sont induits suite à une infection par des microorganismes tel que les virus, bactéries, parasites. Ils présentent une expression différente en fonction des tissus, de l'espèce et n'ont pas tous la même affinité au récepteur IFNAR. Ils vont présenter des activités biologiques variées telles qu'une activité antivirale, antiproliférative, stimulatrice de l'activité cytotoxique de nombreuses cellules du système immunitaire, inductrice de gènes pro-apoptotiques et inhibitrice de gènes anti-apoptotiques ²⁰⁸.

Au contraire il n'existe qu'un seul type d'IFN-II, l'IFN- γ , qui va s'associer à un récepteur spécifique au niveau de la cellule, le récepteur IFN γ R (pour *Interferon gamma receptor*). L'IFN- γ est principalement produit par les lymphocytes T (LT) après stimulation par des antigènes spécifiques et va jouer un rôle crucial dans la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative ²⁰⁹.

Enfin la famille des IFN-III comprend l'IFN- λ 1 (aussi connu comme interleukine-29 (IL-29)), - λ 2 (connu aussi sous le nom d'IL-28A), - λ 3 (aussi connu sous le nom d'IL-28B) et l'IFNL4. Ces différents sous-types vont s'associer à un troisième type de récepteur composé de deux chaînes : IFNLR1 (pour *IFN- λ receptor 1*) et IL-10R β , induisant ainsi des signaux similaires à ceux des IFN-I ²¹⁰.

B- Les voies de signalisation du système IFN-I

1- L'induction de l'IFN-I

Les PRRs peuvent permettre de détecter des acides nucléiques et sont divisés en deux grandes catégories en fonction de leur localisation subcellulaire. Le premier groupe comprend de nombreux membres de la famille des TLRs (pour *Toll-like receptors*) qui sont localisés au niveau des membranes cellulaires et endosomales. Le deuxième groupe est présent au niveau du cytoplasme et comprend à la fois des PRRs qui vont détecter de l'ADN cytoplasmique, tels que le facteur l'ARN polymérase III, DAI (pour *DNA dependent activator of IRFs*), IFIT16 (pour *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 16*) et DDX41 (pour *DEAD-box helicase 41*) mais aussi des membres de la famille RLR (pour *RIG-I-like receptor*) qui vont détecter de l'ARN dérivé de pathogènes dans le cytosol.

α- Les voies de signalisation dépendante des TLRs

Les TLRs sont des protéines très conservées que l'on retrouve chez différentes espèces. Chez l'homme, 10 TLRs ont été identifiés. Ils sont présents dans les cellules immunitaires mais également dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Cependant, leur expression varie en fonction du type cellulaire. Les récepteurs TLR7 et TLR9 sont par exemple principalement exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Les TLRs sont des protéines transmembranaires composées d'un ectodomaine N-terminal permettant la reconnaissance du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique C-terminal appelé TIR (pour *toll interleukin-1(IL-1) receptor*), responsable du signal envoyé à des adaptateurs situés en aval ²¹¹. Parmi les 10 TLRs identifiés chez l'homme, 6 sont impliqués dans la reconnaissance des virus : Les TLR2 et 4 permettent la reconnaissance des virus au niveau de la membrane plasmique alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 permettent la reconnaissance des acides nucléiques au niveau des endosomes.

Détection des PAMPs viraux par les TLRs

TLR2 et TLR4 vont permettre la reconnaissance de glycoprotéines virales à la membrane cellulaire. TLR4 a été initialement identifié comme le ligand des lipopolysaccharides (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries gram positives. Cependant, il a également été montré que TLR4 est impliqué dans la reconnaissance de nombreux virus notamment de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV) ²¹², de la protéine d'enveloppe du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) ²¹³, du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ²¹⁴, du virus Ebola (EBOV) ²¹⁵ ou de la protéine NS1 du virus de la Dengue (DENV) ²¹⁶. De la même manière, TLR2 permet la reconnaissance de l'enveloppe de certains virus : la protéine hémagglutinine du virus de la rougeole (MV) ²¹⁷, le cytomégalovirus humain (hCMV) ²¹⁸, le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) ²¹⁹, le virus Epstein-Barr (EBV) ²²⁰, la protéine nsp4 du rotavirus (RV) ²²¹, et les protéines Core et NS3 du HCV ²²².

Au contraire, TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés au niveau de la membrane des endosomes. Trois mécanismes peuvent être impliqués dans le transfert des acides nucléiques viraux vers les compartiments endosomaux : l'entrée de certains virus par endocytose et la dégradation des virions par des protéases pour libérer le génome viral ²²³, l'entrée par un mécanisme de fusion membranaire conduisant à l'autophagie et à la dégradation des particules virales ²²⁴ et le transfert d'acide nucléique viral depuis la cellule infectée vers les pDCs via la formation d'exosomes ²²⁵. L'autophagie consiste en la dégradation par la cellule d'une partie du matériel présent dans le cytoplasme par ses lysosomes. Une fois les acides nucléiques au niveau des endosomes, ils vont être reconnus par des TLRs différents en fonction de leur nature : ADN, ARN simple brin (ARNsb) ou ARN double brin (ARNdb).

TLR3 permet la reconnaissance des ARNdb ²²⁶, pouvant correspondre au génome du virus ou à des intermédiaires réplicatifs. Il reconnaît notamment les ARNs du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) ²²⁷, de HSV-1 ²²⁸ mais également l'ARN double brin synthétique poly(I :C) (pour *Polynosinic acid-cytidylic acid*) ²²⁶.

TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARNsb. Ils sont notamment capables de détecter les ARNsb du VIH, du IAV, du VSV ²²⁹, du HCV ²³⁰ et du DENV ²³¹.

TLR9 reconnaît des motifs cytosine-guanosine non méthylés (CpG) souvent présents sur l'ADN des micro-organismes mais rares sur les génomes de mammifères, permettant ainsi la distinction hôte-pathogène. Ce récepteur est capable de reconnaître des virus à ADNdb comme le parapoxvirus ovis ²³², le cytomégalovirus murin (MCMV) ²³³, HSV-1 et HSV-2 ²³⁴ et

EBV ²³⁵. Quelques études ont également suggéré un rôle de ce TLR dans la détection du parvovirus, un virus à ADNsb ^{236,237}.

Voies de signalisation activées par les TLRs

La stimulation des TLRs par leurs différents ligands va activer des cascades de signalisation, conduisant à l'induction de gènes impliqués dans la défense de l'hôte contre les micro-organismes. La liaison du ligand au TLR va induire leur dimérisation et entraîner un changement conformationnel conduisant au recrutement des adaptateurs contenant un domaine TIR qui se lie au domaine TIR du récepteur TLR. Il existe 4 molécules adaptatrices recrutées au niveau des TLRs : MyD88 (pour *Myeloid differentiation primary response 88*), TIRAP/MAL (pour *TIR-associated protein/MyD88 adaptator like*), TRIF/TICAM1 (pour *TIR-domain containing adaptator protein inducing IFN- β /TIR-domain containing molecule 1*) et TRAM (pour *TRIF-related adaptator molecule*). MyD88 et TRIF sont responsables de l'activation de différentes voies de signalisation, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'IFN-I. Alors que TLR3 va induire l'activation de l'adaptateur TRIF, les TLR2, TLR7, TLR8 et TLR9 vont activer MyD88. TLR4 va quant à lui pouvoir activer les deux adaptateurs MyD88 et TRIF. Les deux adaptateurs vont conduire à l'activation de la voie NF- κ B (pour *nuclear factor kappa B*) alors que IRF3 (pour *interferon regulatory factor 3*) va être seulement activé par la voie dépendante de TRIF ²³⁸. Les principales protéines impliquées dans les voies de signalisation activées par les TLRs et conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la production d'IFN-I sont représentées figure 11.

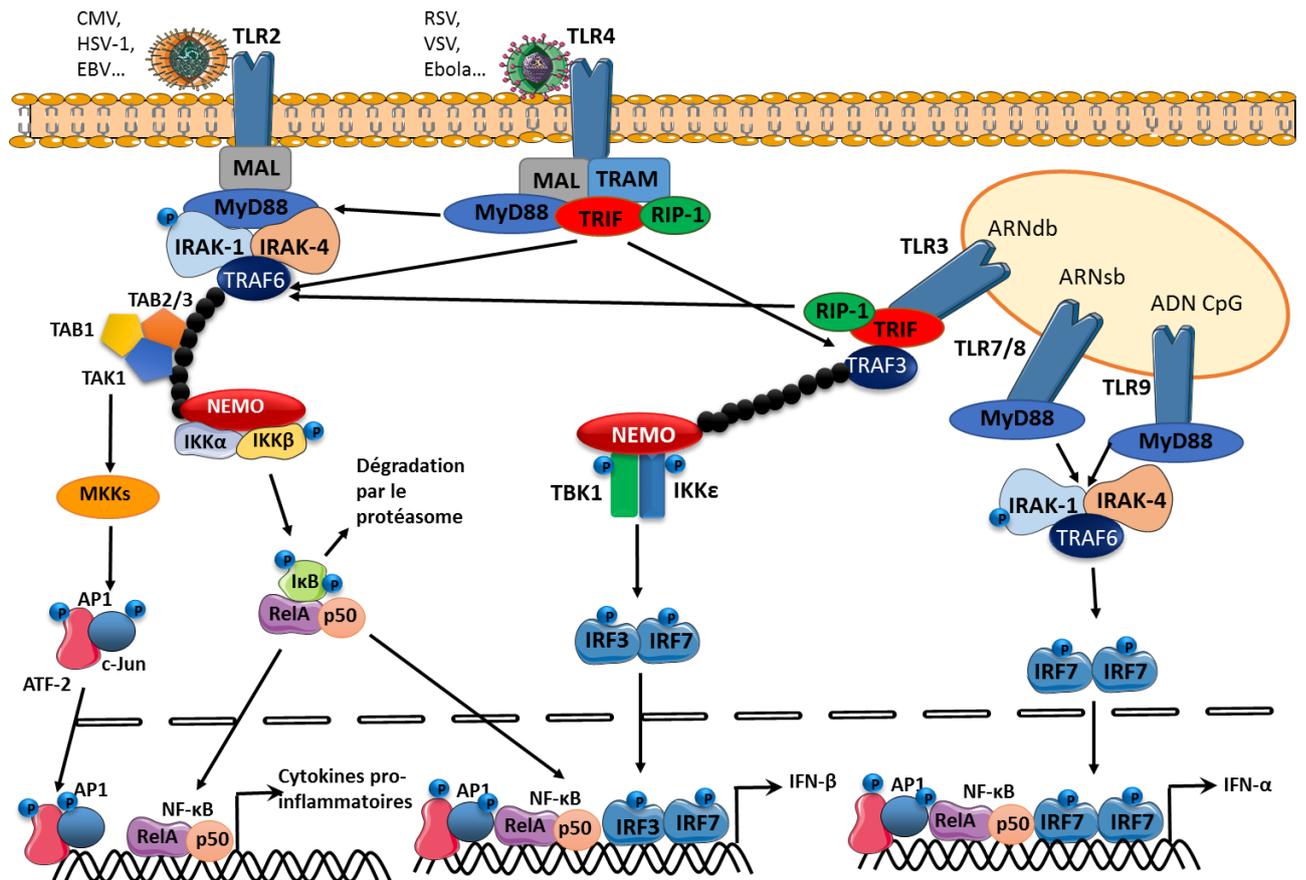


Figure 11. Voies de signalisation dépendantes des TLRs.
(Voir texte pour explications détaillées).

- Production de cytokines pro-inflammatoires

MyD88 est un adaptateur critique pour la signalisation via tous les TLRs sauf TLR3. Après une stimulation, MyD88 s'associe avec le domaine cytoplasmique des TLRs et recrute les protéines IRAK1 et IRAK4 (pour *IL-1-R associated kinase 1 et 4*) qui vont s'associer de manière homotypique. Dans la signalisation TLR2 et TLR4, un autre adaptateur TIRAP/MAL est requis pour le recrutement de MyD88 au récepteur²³⁹⁻²⁴². Après l'association de IRAK1 avec MyD88, IRAK1 est phosphorylé par IRAK4, puis s'associe à TRAF6 (pour *TNF-R associated factor 6*), qui est une E3-ubiquitine ligase²⁴³. TRAF6, en association avec un complexe d'enzymes d'ubiquitylation, conduit à la polyubiquitylation de TRAF6 lui-même et de la protéine NEMO (pour *IKK-γ/NF-κB essential modulator*), conduisant à leur activation²⁴⁴. Un complexe comprenant TAK1 (pour *TGF-β-activated kinase 1*), et les protéines associées à TAK1 nommées TAB1, TAB2 et TAB3 (pour *TAK1-binding protein*) est alors recruté²⁴⁵. TAK1 phosphoryle IKK-β (pour *inductible IκB kinase β*), qui, en association avec IKKα, va phosphoryler la protéine IκB. Cette phosphorylation va induire l'ubiquitylation en

K48 de I κ B, qui est alors dirigé vers le protéasome. NF- κ B, constitué des sous-unités RelA (également appelée p65) et p50, va être libre d'entrer dans le noyau pour induire l'activation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire ²⁴⁶. TAK1 va également induire la phosphorylation des kinases MAPK (pour *Mitogen-activated protein kinase*), conduisant à la phosphorylation du facteur de transcription AP1 (pour *activator protein 1*), aussi appelé ATF-2/c-Jun, qui va alors migrer dans le noyau pour activer l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

- Production d'IFN-I

La stimulation des récepteurs TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 induit la production d'IFN-I en plus de signaux pro-inflammatoires.

La stimulation de TLR3 et TLR4 induit l'activation d'une voie de signalisation initiée par l'adaptateur TRIF ^{247,248}. TRAM, un autre adaptateur, est spécifiquement impliqué dans la voie de signalisation TLR4 ^{249,250}. TRAM s'associe avec TLR4 et TRIF, suggérant que TRAM est un adaptateur entre TLR4 et TRIF. D'un côté, TRIF interagit avec RIP-1 (pour *receptor-interacting protein-1*), qui est responsable de l'activation de la voie NF- κ B ²⁵¹. D'un autre côté, TRIF active la protéine TBK1 (pour *TRAF-family member-associated NF- κ B activator (TANK) binding kinase 1*) via TRAF3 ^{252,253}. TBK1 s'associe avec IKK- ϵ et ces kinases phosphorylent directement IRF3 et IRF7 ^{254,255}. IRF3 et IRF7 phosphorylés forment des hétérodimères et sont transférés dans le noyau pour s'associer au promoteur IFN- β et induire la production d'IFN- β . Le promoteur IFN- β contient également un site de liaison au facteur de transcription NF- κ B et un site de liaison au facteur de transcription ATF-2/c-Jun, formant ainsi, avec les facteurs de transcription IRF3-IRF7, un complexe appelé « enhanceosome » qui joue un rôle crucial dans les phases précoces de l'induction de l'IFN- β ^{256,257}. L'expression de l'IFN- α est au contraire principalement dépendante du facteur de transcription IRF7. Or l'expression basale de l'IRF7 est très faible dans la plupart des types cellulaires. La production initiale d'IFN- β permet la production d'IRF7, qui permet dans un second temps la production d'IFN- α .

TLR7 et TLR9 sont très exprimés dans les pDCs et induisent la production d'IFN- α . Par ailleurs, la sécrétion d'IFN- α , dépendante de TLR9, est dépendante de MyD88 mais n'implique pas TBK1 au contraire des signalisations par TLR3 et TLR4. Dans les pDCs, IRF7 présente un niveau d'expression basale plus élevé que dans les autres types cellulaires, permettant ainsi

une forte production d'IFN- α dès l'activation primaire des TLRs. Après stimulation, un complexe comprenant MyD88, IRAK-4, IRAK-1, TRAF6 et IRF-7 est formé et recruté au TLR7/9 ^{258,259}. TLR8 est physiologiquement proche de TLR7 et active des voies de signalisation similaires.

b- La voie de signalisation RLR

Les trois membres de la famille des récepteurs cytoplasmiques RLR sont RIG-I (pour *retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (pour *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) et LGP2 (pour *laboratory of genetics and physiology 2*). Ces trois RLRs contiennent des structures très conservées, notamment une région centrale hélicase de la famille des DExD/H-box et une région C-terminale (CTD pour *C-terminal domain*) qui confère la spécificité au ligand. Du côté N-terminal de RIG-I et MDA5 on trouve deux domaines CARD (pour *caspase activation and recruitment domain*) qui permettent la signalisation vers les adaptateurs situés en aval. LGP2 ne possédant pas de domaine CARD, il a pendant longtemps été considéré comme un régulateur négatif de la voie de signalisation RLR. Cependant, des études plus récentes ont montré que LGP2 pourrait avoir un rôle activateur sur MDA5 ²⁶⁰. En effet, LGP2 agirait en synergie avec MDA5 pour détecter les acides nucléiques étrangérés et ainsi induire la réponse antivirale cellulaire.

Détection des PAMPs viraux par les RLRs

Les récepteurs RIG-I et MDA5 ne reconnaissent pas forcément les mêmes virus. RIG-I permet la reconnaissance de virus de la famille des *Paramyxoviridae* comme le virus Sendai (SeV) et le virus de la maladie de Newcastle (NDV), des virus de la famille des *Flaviviridae* comme le virus de l'encéphalite Japonnaise (JEV) et le HCV et des virus de la famille des *Rhabdoviridae* comme le VSV. MDA5 détecte quant à lui des virus de la famille des *Picornaviridae* comme le virus de la Polio (PV) et EMCV. Certains virus, comme le Reovirus, le DENV et le virus West Nile (WNV) ²⁶¹ sont reconnus par les deux récepteurs. Les deux récepteurs reconnaissent des ARNdb mais de tailles différentes : les longs fragments (>4kb) sont préférentiellement reconnus par MDA5 alors que les petits fragments (~300pb) présentant une extrémité 5'-triphosphate ou 5'-diphosphate sont reconnus par RIG-I ²⁶²⁻²⁶⁴. Les ARNm présents dans les cellules présentent une coiffe en 5'. Ils n'ont donc pas d'extrémité 5'-triphosphate libre, ce

qui permet de les discriminer. RIG-I permet également la reconnaissance des ARN cappés mais dont la position 2'-ribose du premier nucléotide n'est pas méthylée^{265,266}. Une autre structure essentielle pour la reconnaissance des acides nucléiques par RIG-I est la présence d'une courte séquence d'ARNdb, d'au moins 10pb²⁶⁷. De plus, une autre catégorie d'ARN permet l'activation de RIG-I : les ARN courts présentant des extrémités 5'-hydroxyl (5'-OH) et 3'-monophosphoryl qui sont produits par le clivage d'ARNsb par la ribonucléase L (RNase L)^{268,269}. En effet, La RNase L, activée pendant la réponse IFN-I, clive les ARNsb viraux ou cellulaires, permettant la génération de petits fragments d'ARN²⁶⁸. Ces petits fragments d'ARN peuvent être reconnus par RIG-I et MDA5, permettant ainsi l'amplification de la réponse immunitaire. Les ligands de RIG-I peuvent donc être, en fonction du type cellulaire et des conditions, soit le génome viral complet, soit des intermédiaires de la réplication, soit des transcrits viraux ou soit de l'ARN clivé par la RNase L.

Au contraire, les ligands de MDA5 ne sont pas très bien caractérisés. MDA5 reconnaît les longs fragments d'ARNdb^{263,270}. Certains virus peuvent produire des ARN de hauts poids moléculaire pendant la réplication. Ces ARN de hauts poids moléculaires, composés d'ARNsb et d'ARNdb, formant des structures en réseau, sont reconnus par MDA5²⁷¹.

Signalisation des RLRs

Les voies de signalisation induites par RIG-I et MDA5 sont représentées figure 12. RIG-I possède des domaines CARD qui permettent l'activation de la voie de signalisation RLR. Sans la présence d'un ligand au niveau de la région CTD, les domaines CARD sont dans une conformation d'auto-répression ou la région N-terminale du domaine CARD2 interagit avec la région C-terminale du domaine CARD1²⁷². La reconnaissance d'un ARN étranger entraîne un changement de conformation du récepteur qui permet la libération des domaines CARDS. Les domaines CARDS sont alors disponibles pour la polyubiquitinylation par les protéines E3-ubiquitine ligases TRIM25 (pour *tripartite motif protein 25*) et Riplet²⁷³⁻²⁷⁵. La liaison aux chaînes de polyubiquitine est une étape requise pour l'activation des domaines CARDS²⁷⁶ (voir partie II-C-1-a-).

L'activation des domaines CARDS permet l'activation de l'adaptateur MAVS²⁷⁷⁻²⁸⁰ (pour *mitochondrial antiviral signaling*, également connu sous le nom IPS-1, CARDIF et VISA). MAVS comporte un domaine CARD à son extrémité N-terminale, suivi d'un domaine riche en proline et d'une région transmembranaire à son extrémité C-terminale qui permet la

localisation de MAVS sur la membrane externe de la mitochondrie. L'interaction homotypique entre le domaine CARD de MAVS et les domaines CARDS de RIG-I et MDA5 est requise pour l'activation de MAVS.

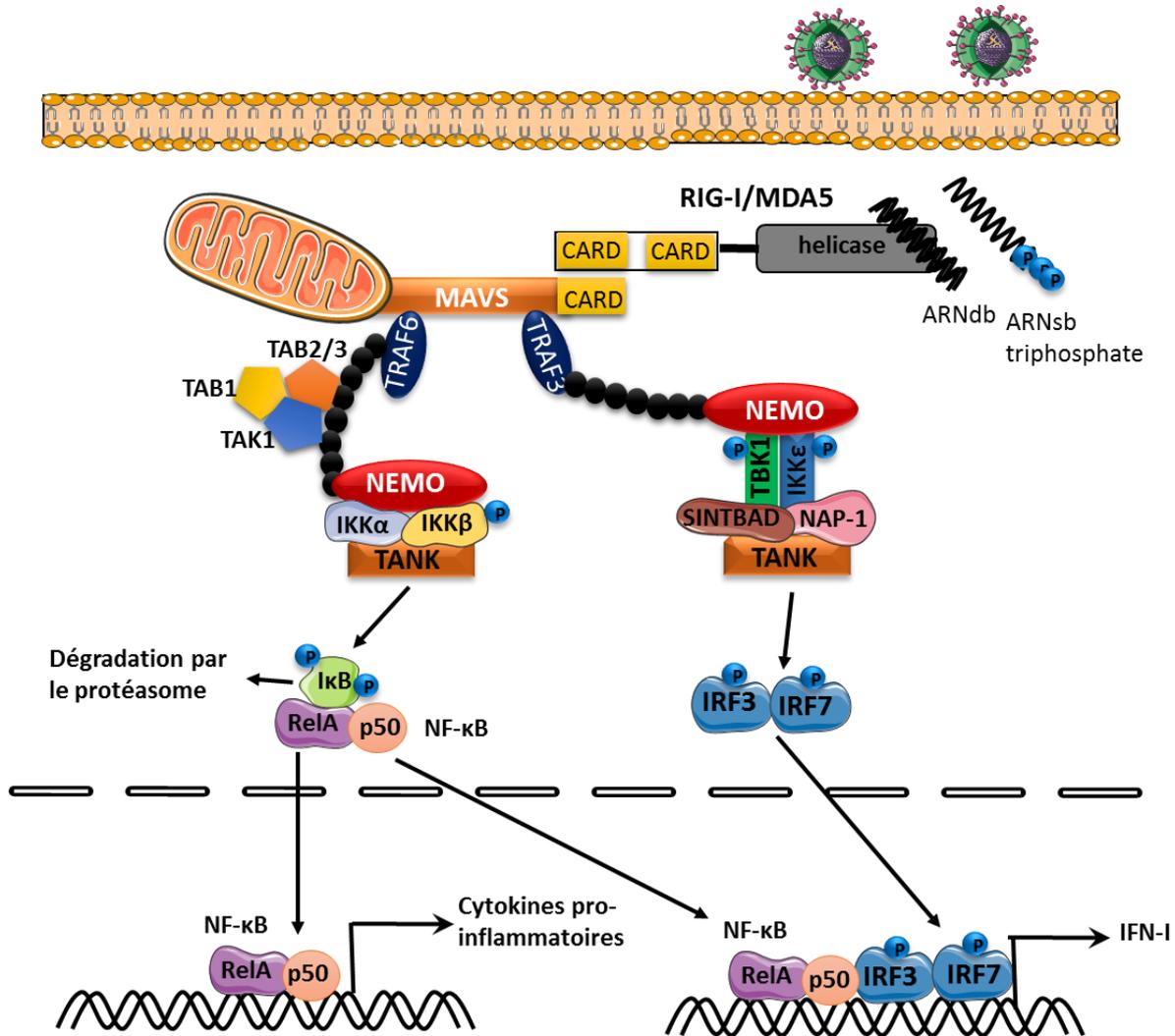


Figure 12. Voies de signalisation dépendante des RLRs.
(Voir texte pour explications détaillées.)

MAVS va servir de plateforme pour le recrutement de nombreuses protéines TRAF, notamment TRAF2, TRAF3, TRAF5 et TRAF6 ²⁸¹. Les protéines TRAF sont des E3-ubiquitine ligases, elles vont induire le recrutement de NEMO au niveau de MAVS via des réactions d'ubiquitinylation. NEMO active les complexes IKK α /IKK β et TBK1/IKK ϵ , conduisant respectivement à l'activation de la voie NF- κ B et IRF3/IRF7 ²⁸¹. D'un côté, l'engagement de TRAF3 va permettre l'activation des protéines kinase TBK1 et IKK ϵ . Le complexe, composé également des protéines NEMO, NAP-1 (pour *NF- κ B activating kinase associated protein 1*) et SINTBAD (pour *similar to NAP-1 TBK1 adaptor*) ²⁸² va alors phosphoryler IRF3 et IRF7

induisant un changement de conformation, leurs dimérisation, leur translocation dans le noyau et la transcription des gènes codant pour l'IFN- β . D'un autre côté, l'engagement de TRAF6, en s'associant avec la kinase TAK1 et les protéines TAB1, TAB2 et TAB3 conduit, par l'intermédiaire de la protéine TANK (pour *TRAF-family member-associated NF- κ B activator*), au recrutement du complexe IKK composé d'IKK α et IKK β . Cela va conduire à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, conduisant à la production de cytokines pro inflammatoires.

2- La signalisation IFN

Une fois l'IFN produit, il va s'associer à son récepteur présent à la surface des cellules. Le récepteur IFNAR va permettre la réponse aux IFN- α et β (IFN-I) alors que le récepteur IFNGR va permettre la réponse à l'IFN- γ (IFN-II). Les voies de signalisation induites par les IFN-I et IFN-II sont représentés figure 13.

α - La voie de signalisation induite par l'IFN-I

Le récepteur à l'IFN-I est composé des deux sous unités IFNAR-1 et IFNAR-2, exprimées dans la plupart des tissus ²⁸³. En fonction des tissus, les récepteurs IFNAR n'ont pas le même niveau d'expression au niveau de la membrane plasmique et les différents types d'IFN n'ont pas tous la même affinité pour les récepteurs IFNAR-1 et 2. En l'absence de stimulation, les sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 sont respectivement associées aux protéines kinases TYK2 (pour *non-receptor tyrosine-protein kinase 2*) et JAK1 (pour *Janus kinase 1*) ^{284,285}. L'association de l'IFN-I (principalement l'IFN- α ou l'IFN- β) à l'une des sous unités IFNAR1 ou 2 induit le recrutement de l'autre ²⁸⁶, leur dimérisation et un changement de conformation ²⁸⁷, conduisant au rapprochement de JAK1 et TYK2. TYK2 est ensuite phosphorylé sur les tyrosines 1054 et/ou 1055 par un mécanisme dépendant de JAK1 ²⁸⁸⁻²⁹⁰. TYK2 phosphoryle ensuite JAK1 sur la tyrosine 1022/1023. Les kinases activées vont phosphoryler les queues cytosoliques des récepteurs IFNAR1 (Tyr 466) et IFNAR2 (Tyr 510) ^{289,291-294}. Ceci va induire le recrutement de STAT2 (pour *signal transducer and activator of transcription 2*) sur IFNAR1, qui va être à son tour phosphorylé sur la tyrosine 690. STAT1 est ensuite recruté et phosphorylé au niveau de la tyrosine 701 (Tyr701) ^{289,295,296}. Les protéines STAT1 et STAT2 activées vont ensuite s'associer entre elles, et s'associer à une troisième protéine, IRF9, ce

qui va former le complexe ISGF3 (pour *interferon-stimulated gene factor 3*). Le complexe va ensuite être transféré dans le noyau et s'associer au promoteur ISRE (pour *IFN-stimulated response element*), ce qui va induire la transcription de plus de 300 gènes cibles, les ISGs (pour *interferon stimulated genes*), dont les produits sont des effecteurs de la réponse antivirale ²⁹⁷.

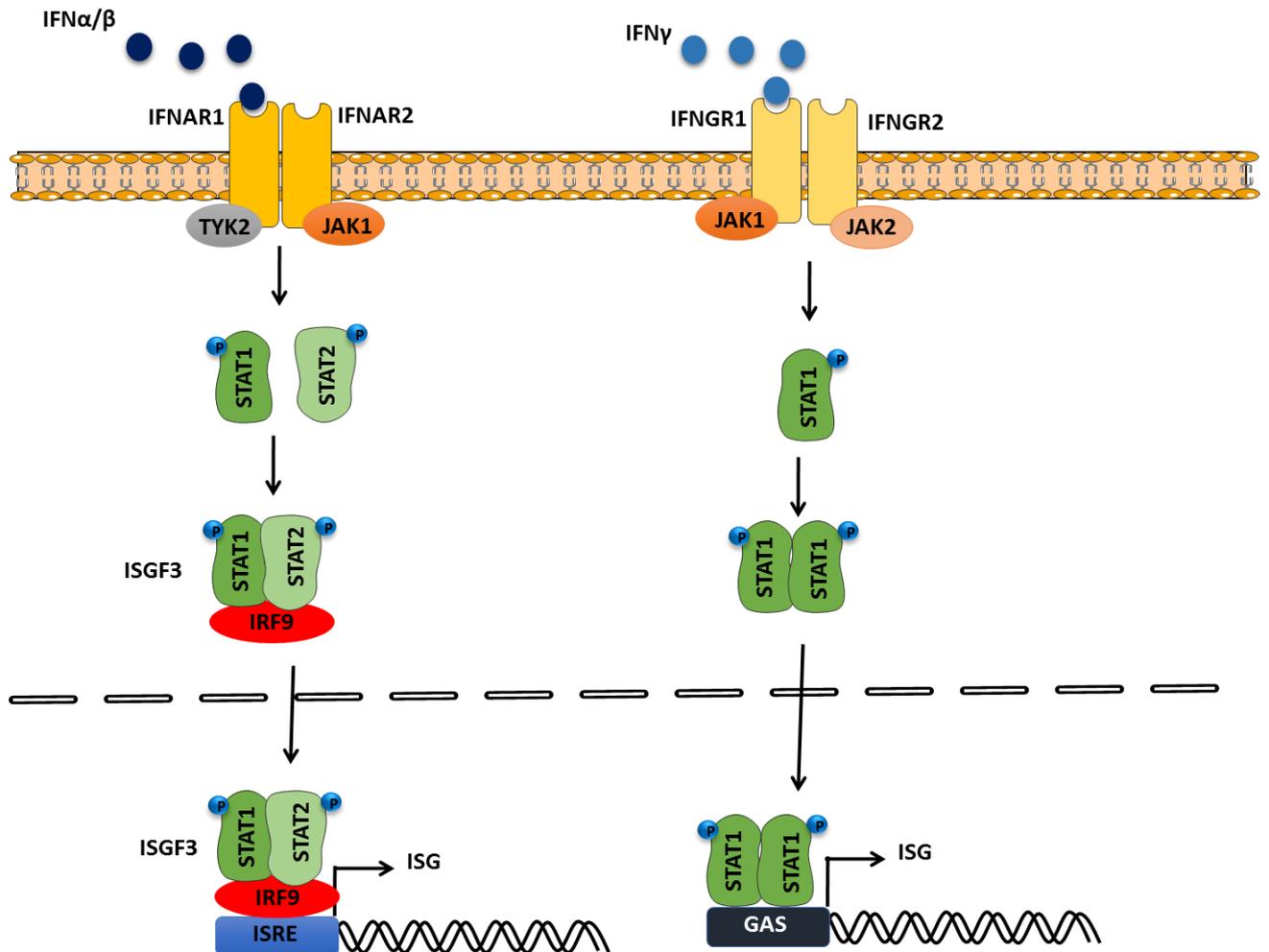


Figure 13. Les voies de signalisation conventionnelle de réponse à l'IFN-I et IFN-II.

D'autres protéines STATs peuvent être impliquées dans la signalisation IFN-I, notamment les protéines STAT3, STAT4, STAT5 et STAT6. En fonction du type cellulaire, différents complexes peuvent être formés entre ces différentes STATs : Des homodimères STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5, STAT6-STAT6 mais également des hétérodimères STAT1-STAT3, STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3 et STAT5-STAT6 ^{298,299}. Des études ont suggérées que différentes combinaisons de STATs induisent la transcription de différentes ISGs ²⁹⁹.

De plus, d'autres voies de signalisation sont induites par l'IFN-I, notamment les voies MAPK et PI3K/AKT/mTOR²⁹⁹. Ces voies joueraient un rôle antiviral en régulant la différenciation et la croissance cellulaire.

b- La voie de signalisation induite par l'IFN-γ

La voie de signalisation induite par l'IFN-γ est représentée figure 13. L'activation des récepteurs à l'IFN-γ IFNGR1 et IFNGR2 induit l'activation des protéines kinases JAK1 et JAK2, constitutivement associée à IFNGR1 et IFNGR2, respectivement. L'activation des protéines kinases conduit à la phosphorylation de STAT1, et à la formation d'homodimères qui vont être relocalisés dans le noyau et s'associer au promoteur GAS (pour *IFN-γ-activated site*). Certains ISGs ne sont régulés que par ISRE ou GAS alors que d'autres sont régulés par les deux promoteurs. GAS active également l'expression d'autres gènes, autres que les ISGs.

c- Fonction des ISGs et mécanismes d'action

Les gènes induits par l'IFN, ou ISGs, jouent un rôle prédominant dans l'immunité innée. En effet, ils codent des protéines qui vont avoir de nombreux rôles antiviraux. Des centaines de protéines codées par les ISGs sont induites par l'IFN-I³⁰⁰. Certaines sont directement impliquées dans les voies de signalisation de l'IFN : c'est le cas par exemple de RIG-I, MDA5 ou STAT1, dont l'expression est augmentée suite à la stimulation IFN-I. D'autres ISGs permettent la modulation de ces voies de signalisation, c'est le cas de l'ISG15. Certaines vont également avoir une activité antivirale intrinsèque, comme la protéine PKR. Nous avons choisi ici de parler des protéines Mx, IFIT, OAS, PKR et de l'ISG15 car elles ont été bien caractérisées.

Les protéines Mx

La famille des protéines Mx (pour *Myxovirus resistant protein*) est très conservée chez les vertébrés. Chez la plupart des mammifères, il existe deux membres de la famille Mx, appelés MxA et MxB chez l'homme (Mx1 et Mx2 chez la souris). La protéine MxA a été identifiée dans un premier temps comme une protéine contenant une résistance au IAV^{301,302}. Depuis, il a été montré que MxA et MxB sont capables d'inhiber de nombreux virus³⁰³. Les protéines

Mx sont des GTPases (pour *guanosine triphosphatase*) et cette fonction est le plus souvent requise pour leur activité antivirale ³⁰⁴. Les protéines Mx peuvent avoir des activités antivirales différentes en fonction du virus ciblé. MxA séquestre la nucléocapside des virus Thogoto et IAV dans le cytoplasme, empêchant ainsi leur transport nucléaire ^{305,306}. Elle séquestre la protéine virale N du virus La Crosse (LACV) ³⁰⁷ et la protéine de capsid du HBV ³⁰⁸ dans des compartiments périnucléaires. Elle inhibe également la synthèse de l'ARNm viral du VSV ^{309,310}. MxB cible la capsid du VIH-1 pour bloquer l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte ³¹¹.

Les protéines codées par la famille de gènes *IFIT*

La famille des protéines IFIT (pour *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*) est composée de 4 membres chez les mammifères : IFIT1 (également appelé ISG56), IFIT2 (ou ISG54), IFIT3 (ou ISG60) et IFIT5 (ou ISG58). Elles sont induites principalement par l'IFN-I et l'IFN-III et ont de nombreux rôles antiviraux ³¹². En s'associant avec eIF3, IFIT1 et IFIT2 diminuent de 60% la traduction (coiffe dépendante et indépendante) des protéines virales ³¹². IFIT1 et IFIT3 inhibent la réplication de nombreux virus à ADN et à ARN tels que le HBV, HCV, et le papillomavirus humain (HPV) ³¹². De plus, les ARN présentant une extrémité 5'-triphosphate, ainsi que ceux présentant une coiffe non méthylée en position 2'O du premier ribose sont spécifiquement reconnus par IFIT1, suggérant un rôle dans la reconnaissance des virus ³¹³⁻³¹⁵.

Les protéines de la famille IFIT ont également des rôles dans la régulation des voies de signalisation de l'IFN-I. En effet, IFIT3, en interagissant avec TBK1, le redirige vers MAVS à la mitochondrie ³¹⁶. IFIT5 régule positivement la voie NF-κB en interagissant avec TAK1 et IKK, permettant ainsi le recrutement du complexe IKK au niveau de TAK1 ³¹⁷. IFIT5 est également capable de s'associer directement à RIG-I et MAVS pour réguler positivement la voie ³¹⁸. Au contraire, IFIT1 semble être un régulateur négatif en inhibant l'interaction de MAVS et TBK1 ³¹⁹.

Les protéines OAS

Les protéines OAS (pour *2',5'-oligoadenylate synthétase*) permettent également l'inhibition de différents types de virus ³²⁰. Les OAS peuvent être considérées comme des PRRs. En effet, elles permettent la reconnaissance des ARNdb dans le cytoplasme. Les OAS s'associent

directement avec l'ARNdb, entraînant son activation et la synthèse de 2',5'-oligoadenylates, conduisant à la dimérisation et l'activation de la RNase L ³²¹.

La protéine PKR

La protéine kinase PKR (pour *protein kinase regulated by RNA*) est également une protéine induite par l'IFN-I ³²². C'est une sérine/thréonine kinase composée d'un domaine N-terminal régulateur permettant la liaison aux ARNdb et d'un domaine C-terminal possédant une fonction catalytique ³²³. En réponse à la stimulation par un ARNdb viral ou synthétique ou d'un autre stimulus (stress oxydatif, facteurs de croissances, cytokines, protéines cellulaires.... ³²⁴), PKR se dimérise et s'autophosphoryle, ce qui induit un changement conformationnel conduisant à son activation. PKR va ensuite phosphoryler eIF2 α (pour *eukaryotic initiation factor 2 α -subunit*), ce qui induit un blocage de la traduction des ARN cellulaires et viraux ³²⁵.

Des études ont également suggéré que PKR pourrait avoir un rôle dans l'amplification de la réponse IFN. En effet, l'activation de PKR corrèle avec la phosphorylation de l'IRF3 ³²⁶. Pour de nombreux virus à ARN positif, il a été montré que PKR est requise pour la production d'IFN- β en réponse à l'infection virale et pour l'intégrité des ARNm codant pour l'IFN- β ³²⁷⁻³²⁹. De plus, PKR interagit avec des membres de la famille de protéines TRAF ³³⁰ et permet l'activation des voies NF- κ B ³³¹ et MAPK ³³². Les fonctions de PKR dans la détection des ARNdb et dans l'induction des voies de signalisation de l'IFN-I suggèrent que PKR reconnaîtrait directement des infections virales.

L'ISG15

L'ISG15 est une petite protéine de 15kDa similaire à l'ubiquitine qui est rapidement induite après stimulation par l'IFN-I. L'ISG15 joue un rôle antiviral important contre différents virus par différents mécanismes.

L'ISG15 s'associe à de nombreuses protéines cellulaires pour moduler leur activité (processus d'ISGylation). La liaison de l'ISG15 à sa protéine cible nécessite l'intervention de 3 enzymes : E1 Ube1L ³³³, E2 UbcH8 ³³⁴ et E3 Herc5 ^{335,336}. Par ailleurs, USP18 (pour *ubiquitin-specific protease 18*) est une enzyme permettant d'enlever l'ISG15 de sa cible (processus de déISGylation) ³³⁷. La plupart des cibles sont des protéines impliquées dans l'épissage des ARN, le remodelage de la chromatine, la transcription, l'organisation du cytosquelette, la

réponse au stress cellulaire et la traduction ³³⁸. L'ISG15 s'associe également à des protéines impliquées dans la lutte antivirale (voir paragraphe C-1-b).

En plus de réguler les voies de signalisation, l'ISG15 s'associe également à des protéines virales. L'ISG15 s'associe à la protéine Gag de HIV-1 ainsi qu'à la protéine Tsg101 du système ESCRT, compromettant ainsi l'assemblage de nouvelles particules virales ³³⁹. L'ISG15 s'associe également à l'ubiquitine ligase Nedd4 pour inhiber l'ubiquitinylation de la protéine VP40 du EBOV, empêchant ainsi son association avec le complexe ESCRT ^{340,341}. L'ISG15 inhibe également le relargage des particules d'ASLV (pour *avian sarcoma leukosis virus*) ³⁴². De plus, l'association de l'ISG15 à la protéine NS1 du virus IAV-A empêche la propagation du virus, en inhibant la liaison du virus avec l'importine- α et donc le transport de l'ARN viral au noyau ^{343,344}. La protéine de capsid de HPV est également ISGylée, et cette ISGylation corrèle avec une diminution du nombre de particules relargées et une diminution de l'infectiosité ³⁴⁵.

De plus, l'ISG15 peut être également retrouvée sous forme libre dans le cytoplasme ou être relarguée dans le milieu extracellulaire où elle aurait une activité de cytokine ³⁴⁶ en stimulant la prolifération des cellules NK (pour *Natural killers*), en augmentant l'activité des cellules LAK (pour *lymphokine-activated killer*) et en stimulant la production d'IFN- γ ³⁴⁶⁻³⁴⁹. D'autre part, des études récentes semblent indiquer que l'ISG15 aurait un effet régulateur sur le système IFN-I. En effet, un déficit en ISG15 chez des patients ³⁵⁰ ou dans des lignées cellulaires induit une augmentation de la production d'IFN-I et donc une plus grande résistance aux infections virales ³⁵¹.

C- Contrôle des voies de signalisation de l'IFN-I

Les réponses immunitaires non contrôlées pouvant être fatales pour l'hôte, la régulation de ces voies de signalisation est essentielle pour maintenir la réponse immunitaire à un niveau approprié. Ces dernières années, de nombreux régulateurs positifs et négatifs ont été identifiés. Ils permettent le contrôle des voies de signalisation de l'IFN à de nombreux niveaux et par différents mécanismes. Alors que certains régulateurs vont permettre l'amplification de l'activation des voies de signalisation, d'autres vont permettre un rétrocontrôle négatif sur l'activation de ces voies. Ces régulations incluent notamment des modifications post-traductionnelles de protéines.

1- *Modification post-traductionnelle de protéines*

Les protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IFN-I peuvent subir des modifications post-traductionnelles permettant la régulation positive ou négative de leur fonction. Ces modifications comprennent des phosphorylations, acétylations, méthylations, ubiquitylations, et d'autres modifications similaires à l'ubiquitylation tels que la SUMOylation (SUMO pour *Small ubiquitin-like modifier*) et l'ISGylation. L'ubiquitylation des protéines est un des mécanismes les plus étudiés. De plus, l'ISGylation semble être un mécanisme important dans la réponse antivirale de l'hôte.

α- Ubiquitylation des protéines

L'ubiquitine, une petite protéine de 8,5KDa, a été caractérisée dans un premier temps comme un signal de dégradation par le protéasome³⁵². L'ubiquitylation se fait selon un processus enzymatique dépendant de l'ATP. Les enzymes réalisant l'ubiquitylation sont appelées E1 (enzyme activatrice), E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) et E3 (ligase) et permettent la formation d'une liaison isopeptidique stable entre le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine cible^{353,354}. L'ubiquitylation est un processus réversible et le mécanisme inverse est réalisé par des enzymes de déubiquitylation (DUBs)³⁵⁵. L'ubiquitine contient 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63), ce qui permet la conjugaison de plusieurs ubiquitines et donc la formation de chaînes de polyubiquitines. Les différentes chaînes de polyubiquitine formées n'ont pas toutes la même fonction. La polyubiquitylation en K48 est reconnue par la sous unité 26S du protéasome et est un signal pour la dégradation de la protéine ubiquitylée. Au contraire, la polyubiquitylation en K63 est un signal d'activation de la protéine cible. De même, l'ubiquitylation linéaire, qui correspond à la liaison de la molécule d'ubiquitine par son extrémité N-terminale à un résidu lysine de la protéine cible, régule positivement les voies de signalisation. Cependant, les fonctions des autres chaînes de polyubiquitine ne sont pas encore très claires.

L'ubiquitine module de nombreux processus cellulaires, notamment la régulation du trafic vésiculaire et la réparation de l'ADN mais également les voies de signalisation dépendantes

de l'IFN-I. Au vu de leur importance dans la régulation de nombreuses voies de signalisation, la régulation des enzymes réalisant l'ubiquitinylation est elle-même finement contrôlée afin d'éviter l'activation ou la dégradation inappropriée des protéines cibles. Des niveaux de régulation supplémentaires peuvent être mis en jeu, telles des modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter leur activation ³⁵⁶. De plus, de nombreuses enzymes d'ubiquitinylation et de déubiquitinylation affectant les voies de signalisation de l'IFN-I sont induites par la stimulation IFN-I, permettant ainsi une amplification ou une inhibition de l'activation des voies en fonction des conditions.

Régulation de l'induction de l'IFN-I

Régulation des RLRs et de l'adaptateur MAVS

Les RLRs et l'adaptateur MAVS sont hautement régulés par différentes enzymes d'ubiquitinylation et de déubiquitinylation (Figure 14A). L'ubiquitinylation en K63 de RIG-I et MDA5 étant nécessaire à leur activité, de nombreuses E3 ubiquitine ligase catalysent cette réaction ³⁵⁷. Au contraire, trois DUBs cellulaires enlèvent les ubiquitines en K63 liées à RIG-I pour réguler négativement la voie ont été identifiés ³⁵⁷. Certains régulateurs vont induire une polyubiquitinylation de RIG-I et MDA5 en K48, conduisant à leur dégradation par le protéasome ^{357,358}. Cette polyubiquitinylation en K48 peut être également bloquée par une DUB USP4.

MAVS jouant une position centrale dans l'activation de la voie RLR, de nombreuses enzymes d'ubiquitinylation vont également le cibler ³⁵⁷. La polyubiquitinylation en K63 permet le recrutement d'IKKε à la mitochondrie, son activation, et donc l'activation des voies de signalisation en aval. Au contraire, 7 E3 ubiquitine ligases ciblent MAVS pour la dégradation, via la polyubiquitinylation en K48 (Figure 14A). Cette polyubiquitinylation en K48 peut être ciblée par des DUB, telles que TRIM44, stabilisant ainsi MAVS.

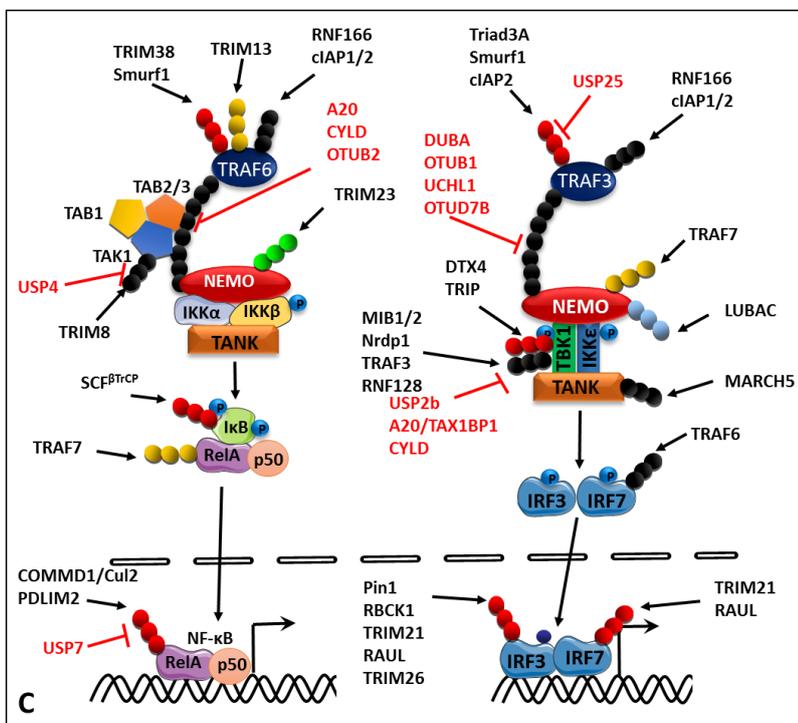
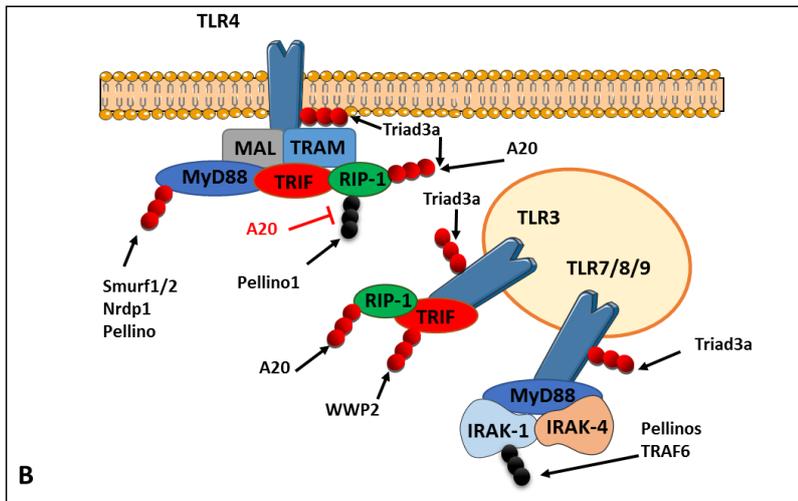
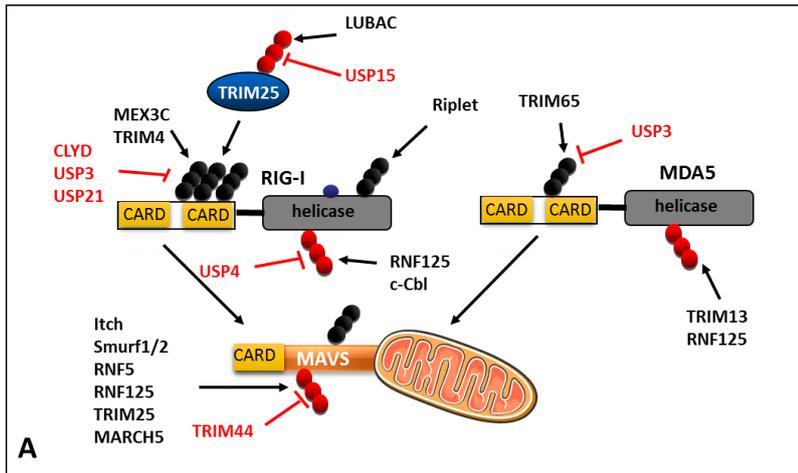


Figure 14. Régulation par des protéines cellulaires ayant des fonctions d'ubiquitylation (noire), déubiquitylation (rouge) et par l'ISGylation.

(A) Régulation des RLRs et de leur adaptateurs. **(B)** Régulation des TLRs et de leur adaptateurs. **(C)** Régulation des protéines des voies de signalisation en aval des RLRs et des TLRs. Figure réalisée en utilisant différentes revues

335,336,344,345

Régulation des TLRs et de leurs adaptateurs

Les TLRs sont peu touchés par des processus d'ubiquitylation/déubiquitylation (Figure 14B). TLR3, 4 et 9 sont ciblés par l'ubiquitine ligase Triad3A qui les polyubiquitylent en K48 pour entraîner leurs dégradation, permettant ainsi la régulation négative des voies de signalisation dépendantes des TLRs ³⁵⁹. Les adaptateurs en aval des TLRs sont plus souvent touchés (Figure 14B).

Régulation en aval des PRRs et des protéines adaptatrices

Les protéines TRAFs sont la cible d'ubiquitine ligases (Figure 14C). En effet, l'auto-ubiquitylation en K63 des protéines TRAFs est un mécanisme clé pour leur activation. De plus, il a récemment été montré que TRAF6 peut être polyubiquitylé en K29 par TRIM13 et que cette polyubiquitylation régule positivement les voies de signalisation en aval de TRAF6 ³⁶⁰. Au contraire, certaines E3 ubiquitine ligases catalysent une polyubiquitylation en K48, induisant ainsi la dégradation des protéines TRAFs. TRAF3 et TRAF6 peuvent également être déubiquitylés par différentes DUBs cellulaires qui enlèvent les chaînes de polyubiquitine en K63 ³⁵⁷. Au contraire, USP25 régule positivement TRAF3 en enlevant spécifiquement les chaînes de polyubiquitine en K48 ³⁶¹. Tous ces mécanismes permettent d'orienter l'activité des TRAFs. Les TRAFs activés vont ensuite permettre l'ubiquitylation d'autres protéines de la voie. TRAF6 activée va induire la polyubiquitylation en K63 de IRF7 et NEMO, induisant leur activation ²⁵⁹. NEMO subit une polyubiquitylation linéaire par LUBAC (pour *linear ubiquitin assembly complex*), et cette polyubiquitylation est indispensable pour l'activation de la voie NF- κ B, alors qu'elle régule négativement la synthèse d'IFN- α ³⁵⁷. TRIM23, en catalysant une réaction de polyubiquitylation en K27 sur NEMO, est importante pour l'activation de IRF3 et NF- κ B ³⁶². TRAF7 est un autre régulateur qui va entraîner une polyubiquitylation en K29 de NEMO, altérant son activation et résultant en sa dégradation lysosmale ³⁶³.

TBK1 est une autre cible importante des polyubiquitylation en K63 et K48 (Figure 14C). L'ubiquitylation en K63 de TBK1 est requise pour son activité enzymatique ³⁶⁴. Au contraire, la polyubiquitylation en K48 va entraîner la dégradation de TBK1. Différentes DUBs enlèvent les chaînes de polyubiquitine en K63 de TBK1, ce qui bloque sa signalisation ³⁵⁷.

Les facteurs de transcription IRF font partie des protéines des voies de signalisation de l'IFN- α les plus contrôlées par les modifications post-traductionnelles, notamment par les

mécanismes d'ubiquitinylation/déubiquitinylation (Figure 14C). L'ubiquitinylation d'IRF7 par TRAF6 semble être un pré-requis pour son activation ³⁶⁵. Au contraire, de nombreuses enzymes vont cibler IRF3 et IRF7 pour polyubiquitinylation en K48 et donc entraîner leur dégradation ³⁵⁷.

Régulation de la voie JAK-STAT

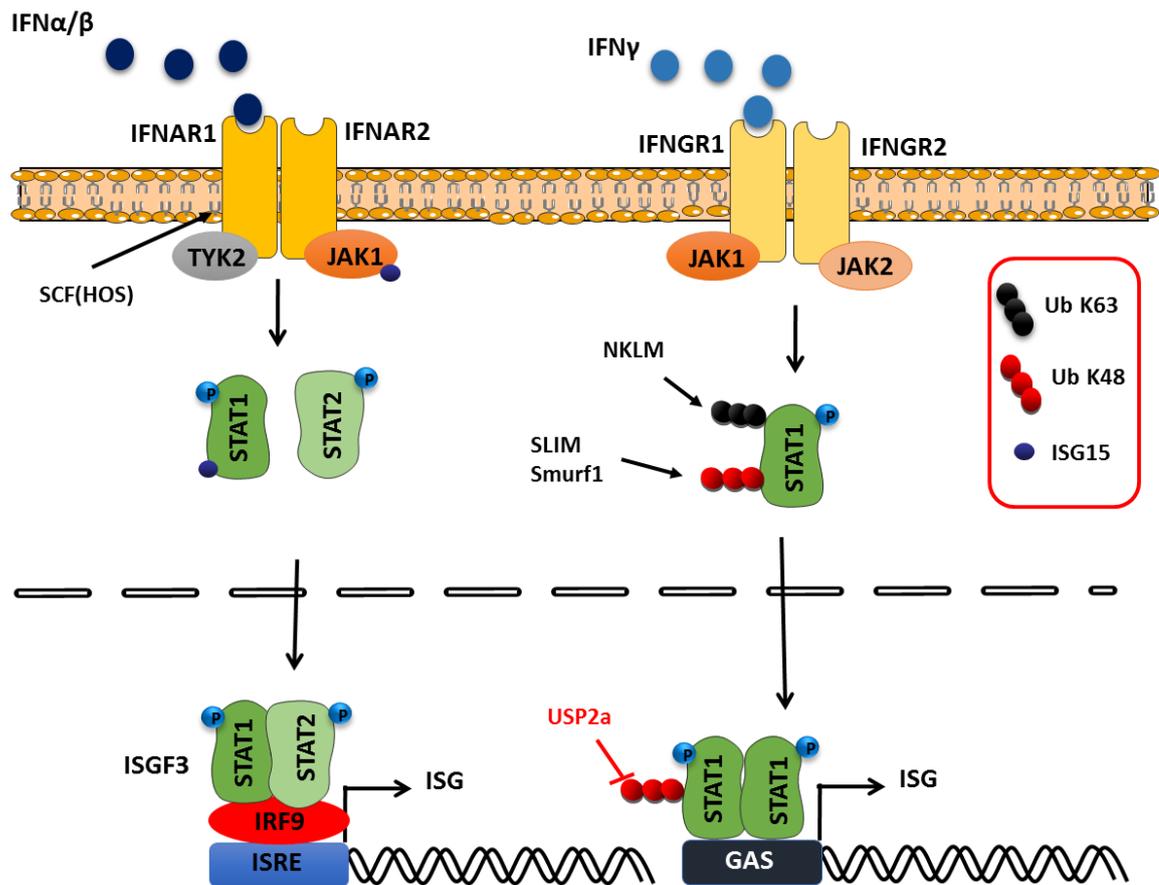


Figure 15. Régulation de la voie de réponse à l'IFN-I par des mécanismes d'ubiquitinylation/déubiquitinylation et ISGylation des protéines.

Alors que de nombreuses études portent sur l'ubiquitinylation des protéines des voies de signalisation RLR et TLR, peu d'études ont été réalisées sur l'ubiquitinylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT (Figure 15). L'ubiquitine ligase Skp1-Cullin1-HOS-Roc1 (SCF(HOS)) interagit avec IFNAR1 et catalyse son ubiquitinylation et sa dégradation *in vitro* ³⁶⁶. STAT1 serait également régulée par différentes E3 ubiquitine ligases : SLIM (pour *STAT-interacting LIM protein*) et Smurf1 (pour *SMAD ubiquitination regulatory factor*) catalysent sa polyubiquitinylation en K48 et ainsi sa dégradation ^{367,368}. La

polyubiquitinylation en K48 induit la translocation dans le noyau de la déubiquitineuse USP2a, qui s'associe avec STAT1 et bloque sa dégradation, régulant ainsi positivement l'activation du promoteur ISRE ³⁶⁹. Dans une autre étude, il a été montré que l'E3 ubiquitine ligase, NKLAM (pour *natural killer lytic-associated molecule*) régule positivement la voie JAK/STAT ³⁷⁰. En effet, après stimulation avec l'IFN- γ , NKLAM serait transitoirement localisé au niveau d'IFN β où il s'associerait à STAT1 et permettrait sa polyubiquitinylation en K63, permettant ainsi une régulation positive de sa phosphorylation et de son activité transcriptionnelle.

b- ISGylation des protéines

Des études ont montré que des protéines des voies de signalisation de l'IFN-I peuvent également subir des processus d'ISGylation, modulant ainsi leur activité.

Certaines protéines des voies d'activation de l'IFN-I (voies dépendantes de TLR et RLR) sont ISGylées. C'est le cas de RIG-I ³³⁸ et IRF3 ^{371,372}. L'ISGylation d'IRF3 stabilise la protéine, régulant ainsi positivement la réponse à l'IFN-I (Figure 14C). Au contraire, l'ISGylation de RIG-I aurait un rôle de rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation, en permettant de garder un niveau de réponse à l'IFN-I optimal ³⁷³ (Figure 14A). De plus, l'ISG15 s'associe à Ubc13 ³⁷⁴, une enzyme permettant l'ubiquitination de TAK1. L'ISGylation de Ubc13 inhibe l'ubiquitinylation de TAK1, régulant ainsi négativement la voie NF- κ B ³⁷⁵.

L'ISGylation touche également des protéines de la voie de réponse à l'IFN-I (voie JAK-STAT) (Figure 15). Dans un cribble recherchant des protéines ISGylées dans le thymus humain, il a été montré que JAK1 et STAT1 sont ISGylées ³⁷⁶. L'ISGylation de STAT1 a ensuite été confirmée dans un autre cribble ³⁷⁷. Il a été suggéré que l'ISGylation de JAK1 et STAT1 aurait un rôle de régulateur positif. D'autres études doivent être réalisées afin de mieux comprendre l'impact de l'ISGylation sur l'activité des protéines cibles.

2- Contrôle des voies de signalisation par d'autres mécanismes

En plus des modifications post-traductionnelles, d'autres mécanismes vont intervenir dans la régulation des voies de signalisation de l'IFN-I, notamment via des interactions directes avec des protéines de ces voies de signalisation, bloquant leurs activités. Par exemple, Plk1 (pour *polo-like-kinase 1*) est une protéine régulatrice qui, en interagissant avec MAVS via son

domaine PDB (pour *polo-box domain*), inhibe sa capacité à activer la voie de signalisation ³⁷⁸. Les protéines PIAS1 (pour *protein inhibitor of activated STAT1*) et PIAS3 interagissent respectivement avec STAT1 et STAT3 pour bloquer leur activité transcriptionnelle ³⁷⁹. C'est également le cas des protéines SOCS (pour *suppressor of cytokine signaling*). Les SOCS sont des régulateurs négatifs cruciaux des voies de signalisation de la réponse aux cytokines et facteurs de croissance. Il existe 8 membres de la famille de protéines SOCS : CIS et SOCS1-7. SOCS1 et SOCS3 sont les mieux caractérisées, elles sont induites par la signalisation IFN-I et jouent un rôle de rétrocontrôle négatif sur la voie JAK-STAT. SOCS1 est capable de se lier directement à JAK1/2, inhibant ainsi leur activité kinase. SOCS3 va se lier au récepteur IFNAR et aux protéines JAK pour inhiber leur activité kinase. De plus, les protéines SOCS contiennent un motif « SOCS box » qui permet le recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase, entraînant la dégradation des protéines JAK par le protéasome ³⁸⁰. Des récepteurs et protéines transmembranaires sont également capables de réguler la signalisation IFN-I. C'est le cas du récepteur SIRP α (pour *signal regulatory protein α*), qui permet l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de TLR3 et des RLRs ³⁸¹. La signalisation IFN-I est également très régulée par des modifications épigénétiques telles que des modifications des histones, la méthylation de l'ADN et des ARN non codants ³⁸², permettant ainsi le contrôle de l'expression des gènes.

D- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques (DCs) sont les cellules sentinelles du système immunitaire. Elles surveillent les tissus et détectent les infections et l'inflammation. Il existe différents types de DC spécialisées dans certaines fonctions. Après phagocytose d'un potentiel antigène et/ou réception de signaux de danger, les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T (LT) naïfs, ce qui va entraîner leur maturation. Un autre type de DCs, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont recrutées au niveau des sites d'inflammation où elles jouent un rôle clé dans la réponse antivirale précoce en produisant de grandes quantités d'IFN-I (IFN- α et IFN- β) (jusqu'à 1000 fois plus que les autres cellules ³⁸³) et d'IFN-III. La réponse est rapide et implique principalement les récepteurs TLR7 et TLR9, exprimés essentiellement dans ce type cellulaire.

1- Fonctions des pDCs

Bien que ne représentant que 0.2%-0.8% des PBMCs (pour *peripheral blood mononuclear cells*), les pDCs jouent un rôle primordial dans la production d'IFN-I en réponse à une infection virale. En effet, 60% de leur activité transcriptionnelle est dédiée à la production d'IFN-I³⁸⁴. Chez un macaque infecté par le virus de l'immunodéficience simien (SIV), il a été montré que les pDCs sont la seule source d'IFN- α dans les phases précoces de l'infection³⁸⁵. Pour certains virus, il a été montré un lien entre la réponse IFN-I induite par les pDCs et l'élimination du virus de l'organisme. Il a été mis en évidence une production très importante d'IFN α par les pDCs de patients infectés par le VIH-1 qui présentent un titre viral indétectable en absence de thérapie, en comparaison avec des patients présentant une virémie³⁸⁶. De la même manière, une étude a montré que chez des patients infectés par le DENV, le titre viral et la sévérité de la maladie dépendaient du nombre de pDCs circulantes et de leur production d'IFN-I³⁸⁷. Différentes études dans des modèles murins ont également mis en évidence le rôle des pDCs dans l'élimination d'infections virales. En effet, la déplétion en pDCs a montré qu'elles jouent un rôle critique dans la production précoce d'IFN- α en réponse à des virus tels que le MHV³⁸⁸, le LCMV (pour *lymphocytic choriomeningitis virus*), le VSV^{389,390}, les virus HSV-1 et HSV-2³⁹¹ et le RSV³⁹².

En plus de la production d'IFN, les pDCs peuvent aussi avoir une activité de cellule présentatrice d'antigène (CPA) pour activer la réponse immunitaire médiée par les LT CD8+ cytotoxiques³⁹³⁻³⁹⁶. Des signaux spécifiques, différents de ceux permettant l'induction d'IFN, sont requis pour l'acquisition de cette fonction. Notamment, l'acquisition de ce phénotype nécessite l'activation de la voie de signalisation NF- κ B. Les pDCs sont ainsi capables de reconnaître des cellules infectées par le virus IAV, de capturer du matériel viral et de se différencier en CPA, permettant l'activation spécifique de LT cytotoxiques³⁹⁴. Au contraire, les cellules infectées par le VIH sont capables de produire de l'IFN- α mais ne se différencient pas en CPA³⁹⁷.

L'IFN-I sécrété va permettre l'induction de l'expression du récepteur TRAIL (pour *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) à la surface des cellules NK et des LT. Le récepteur TRAIL va permettre la reconnaissance de la cellule infectée à lyser et ainsi induire

l'activité cytotoxique des cellules NK. Des études ont montré que TRAIL peut être exprimé par les pDCs, faisant des pDCs des cellules cytotoxiques jouant un rôle direct dans l'élimination des cellules infectées ³⁹⁸⁻⁴⁰⁰.

La réponse des pDCs aux pathogènes peut donc être variable et va notamment dépendre de la localisation subcellulaire où les TLRs reconnaissent le pathogène ⁴⁰¹. L'engagement des TLR7/9 au niveau des endosomes précoces des pDCs active principalement la voie de signalisation IRF7 conduisant à la production d'IFN-I alors que leur engagement au niveau des lysosomes va préférentiellement conduire à l'activation de la voie NF-κB et donc à la production de cytokines pro-inflammatoires, de molécules de co-stimulation et à la maturation en un phénotype de CPA ^{401,402}.

2- Reconnaissance des acides nucléiques par les pDCs

Chez l'homme, les pDCs expriment les TLR7 et TLR9. TLR9 permet la reconnaissance de virus à ADN tels que HSV-1 ⁴⁰³, HSV-2 ²³⁴ et le MCMV ^{233,404} alors que TLR7 est requis pour la réponse aux virus à ARNs tels que l'IAV, le RSV, le SeV, le VSV, le DENV et le virus de la fièvre jaune (YFV) ^{223,224,405-407}. Certaines études ont suggéré que RIG-I n'était pas requis pour la production d'IFN-α dans les pDCs ^{408,409}. Cependant, d'autres études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de RIG-I après stimulation des TLR7 et 9, indépendamment de l'IFN-I ⁴¹⁰. De plus, une étude récente a montré que RIG-I et TLR7 permettaient la reconnaissance du YFV, induisant ainsi l'activation des pDCs ⁴⁰⁵. De la même manière, la reconnaissance du HCV par les pDCs dépend à la fois de la signalisation RLR et TLR ⁴¹¹.

3- Activation des pDCs par différents mécanismes

De nombreux virus sont capables d'activer les pDCs. Cependant, les mécanismes d'activation peuvent varier suivant les virus impliqués (activation directe ou indirecte), engendrant l'activation de voies de signalisations différentes (Figure 16).

L'activation peut être directe dans certains cas. En effet, certains virus peuvent infecter les pDCs. C'est le cas du RV ⁴¹², du YFV, du SeV ⁴⁰⁵, du HAV ⁴¹³ du virus Junin (JUNV) ⁴¹⁴ et du VIH ^{415,416}. Ces virus, après infection, sont reconnus par des récepteurs de la famille des RLRs

dans le cytoplasme ou, s'il y a endocytose, ils sont reconnus par TLR7/9 dans les endosomes. L'infection des pDCs par le YFV est productive dans les pDCs et conduit à l'activation de RIG-I⁴⁰⁵. De la même manière, les virus de la famille des arenavirus, LCMV et Lassa (LASV), infectent directement les pDCs, établissent un cycle de réplication productif et sont capables d'activer le TLR7⁴¹⁷. Au contraire, certains virus peuvent infecter des pDCs mais ne sont pas capables d'induire un cycle de réplication complet. C'est le cas du MERS-CoV (pour *Middle east respiratory syndrome coronavirus*) qui est capable de s'associer à son récepteur à la surface des pDCs, d'être endocyté, d'activer les voies de signalisation dépendantes de TLR7 mais le cycle viral est bloqué dans les phases précoces⁴¹⁸.

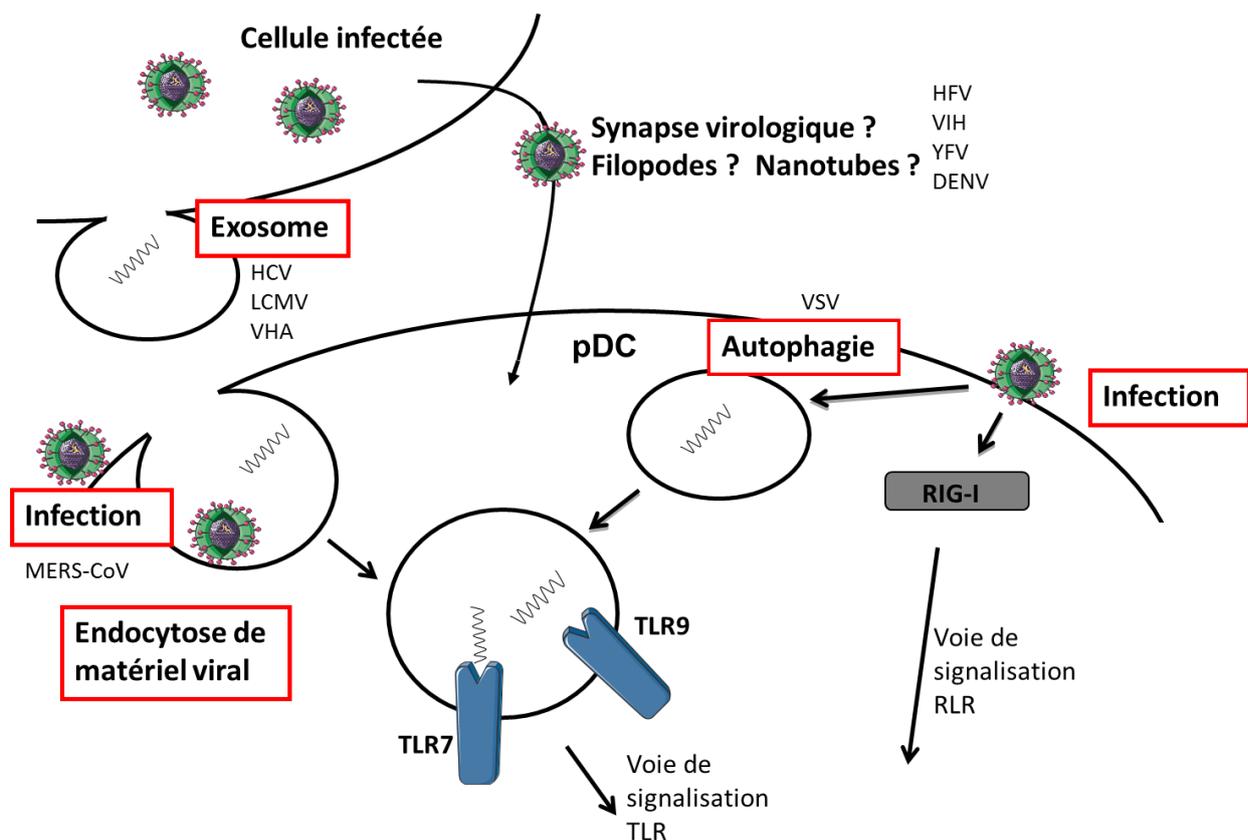


Figure 16. Les pDCs peuvent être activées par différents mécanismes.

D'autres virus peuvent subir un processus d'autophagie²²⁴. L'autophagie de matériel viral induit l'activation de voies de signalisation dépendantes des TLRs situés dans les lysosomes. D'autres virus ne peuvent pas infecter les pDCs et donc ils ne les activent pas directement. L'activation des pDCs par ces virus nécessite alors un contact entre les cellules infectées et

les pDCs. On parle alors d'activation indirecte. De nombreux virus sont reconnus de cette manière : le virus Faomy (HFV) ⁴¹⁹, le VIH ⁴²⁰, le DENV, le WNV ⁴⁰⁶, le VSV ⁴²¹, et le YFV ⁴⁰⁵. Cependant, le mécanisme conduisant à l'activation des pDCs n'est pas toujours très clair. Le transfert de matériel viral pourrait se faire via la formation de synapses virologiques, nanotubes ou filopodes. Dans le cas du DENV, un réseau d'actine se forme au niveau de la zone de libération des particules virales immatures qui vont être transférées aux pDCs ⁴⁰⁶. Plus récemment, un autre mécanisme de transmission viral a été décrit : la transmission de l'ARN viral via la formation d'exosomes depuis la cellule infectée qui sont ensuite endocytés dans la pDC, ce qui induit l'activation de voies de signalisation dépendantes des TLRs. Ce transfert exosomal dépend de la machinerie ESCRT ²²⁵. Ce mécanisme a été mis en évidence pour le HCV ²²⁵, le HAV ⁴¹³, le LCMV ⁴²², EBV ⁴²³ et le PRRSV (pour *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) ⁴²⁴.

III- INTERACTION VIRUS-SYSTEME INTERFERON

Au vu du rôle crucial du système IFN-I dans la réponse antivirale précoce de l'hôte, l'activité des protéines constituant ces voies de signalisation est très souvent bloquée par les virus. Le blocage peut être fait à tous les niveaux, que ce soit dans la voie d'induction de l'IFN-I, la voie de réponse à l'IFN mais également au niveau des ISGs induits. Nous parlerons dans un premier temps des différents mécanismes conduisant au blocage des voies d'induction et de réponse à l'IFN-I par les protéines virales. Certaines protéines virales sont également capables de cibler l'activité de certaines protéines codées par les ISGs mais nous n'aborderons pas ce sujet ici. Dans un second temps, nous exposerons ce qui est connu dans le cas du HEV, au niveau de l'interaction entre le virus et le système IFN-I de l'hôte.

A- Modulation des voies de signalisation de l'IFN-I par les virus

1- Contrôle de l'induction de l'IFN-I par les virus

L'IFN-I jouant un rôle crucial dans la lutte antivirale, les voies de signalisation conduisant à sa synthèse sont particulièrement inhibées par les virus. Les voies de signalisation TLR et RLR

peuvent être bloquées à différents niveaux, que ce soit au niveau de l'induction de la synthèse d'IFN-I via les voies de signalisation dépendantes d'IRF3/IRF7 ou au niveau de l'induction des cytokines pro-inflammatoires via les voies de signalisation dépendantes de NF- κ B. Les protéines de ces voies de signalisation peuvent être séquestrées par une ou plusieurs protéines virales pour inhiber leur activité, dégradées ou subir des modifications post-traductionnelles qui vont impacter les processus d'ubiquitinylation/déubiquitinylation ou de phosphorylation/déphosphorylation. Les protéines virales peuvent se lier directement à la protéine cellulaire ou induire ou inhiber une autre protéine impliquée dans l'activité de la protéine cellulaire jouant un rôle dans la voie de signalisation IFN-I. Les différentes protéines virales qui interagissent avec les protéines des voies de signalisation TLR et RLR impliqués dans la production d'IFN-I sont représentées dans les figures 17-18-19 ⁴²⁵.

Les cibles des protéines virales les plus étudiées sont les récepteurs cytoplasmiques RIG-I et MDA5. L'adaptateur MAVS est également une protéine dont l'inhibition a souvent été rapportée, ainsi que les protéines kinases TBK1 et IKK α et les facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Au contraire, l'inhibition d'autres protéines adaptatrices comme SINTBAD, NAP-1, TANK et MyD88 par les virus a été peu étudiée.

α - Inhibition des PRRs par les virus

Les PRRs cytoplasmiques RIG-I et MDA5 sont la cible de nombreuses protéines virales (Figure 17). Au contraire les TLRs semblent peu ciblés. RIG-I et MDA5 peuvent être séquestrés, la liaison à des protéines virales bloquant leur activité. Par exemple, la protéine Z de nombreux virus de la famille des *Arenaviridae* (virus Chapare (CHPV), dandenong (DANV), Guanarito (GTOV), JUNV, LASV, Lujo (LVJV), LCMV, Machupo (MACV) et Sabia (SABV)) se lie aux domaines CARDs de RIG-I et MDA5, bloquant ainsi leur interaction avec MAVS ^{426,427}. RIG-I et MDA5 peuvent également être clivés par respectivement les protéines 3C^{pro} et 2A^{pro} du Coxsackievirus B3 (CVB3), de l'Entérovirus 71 (EV71) et du PV ⁴²⁸⁻⁴³². Certaines protéines virales peuvent également interagir avec RIG-I et entraîner sa dégradation par le protéasome. Ce mécanisme est utilisé par la protéine NSs du virus Toscana. D'autres mécanismes impliquant des modifications post-traductionnelles des protéines sont également utilisés. Par exemple, la protéine V du MV inhibe la dé-phosphorylation de RIG-I et MDA5 en bloquant les phosphatases PP α/γ , inhibant ainsi son activation ^{433,434}. De plus,

l'ubiquitinylation de RIG-I étant nécessaire à son activité, RIG-I peut également être déubiquitinylé par des DUBs virales. Ce mécanisme de déubiquitinylation de RIG-I est utilisé par de nombreuses protéines virales comme la polymérase L du Nairovirus CCHFV (pour *crimean-congo hemorrhagic fever virus*)⁴³⁵, la protéine X du HBV⁴³⁶, et le domaine PLP2 de la protéine Nsp2 de différents virus de la famille des *arteriviridae* (EAV (pour *equine arteritis virus*), LDV (pour *lactate dehydrogenase-elevating virus*), PRRSV, SHFV (pour *simian hemorrhagic fever virus*))^{435,437-441}.

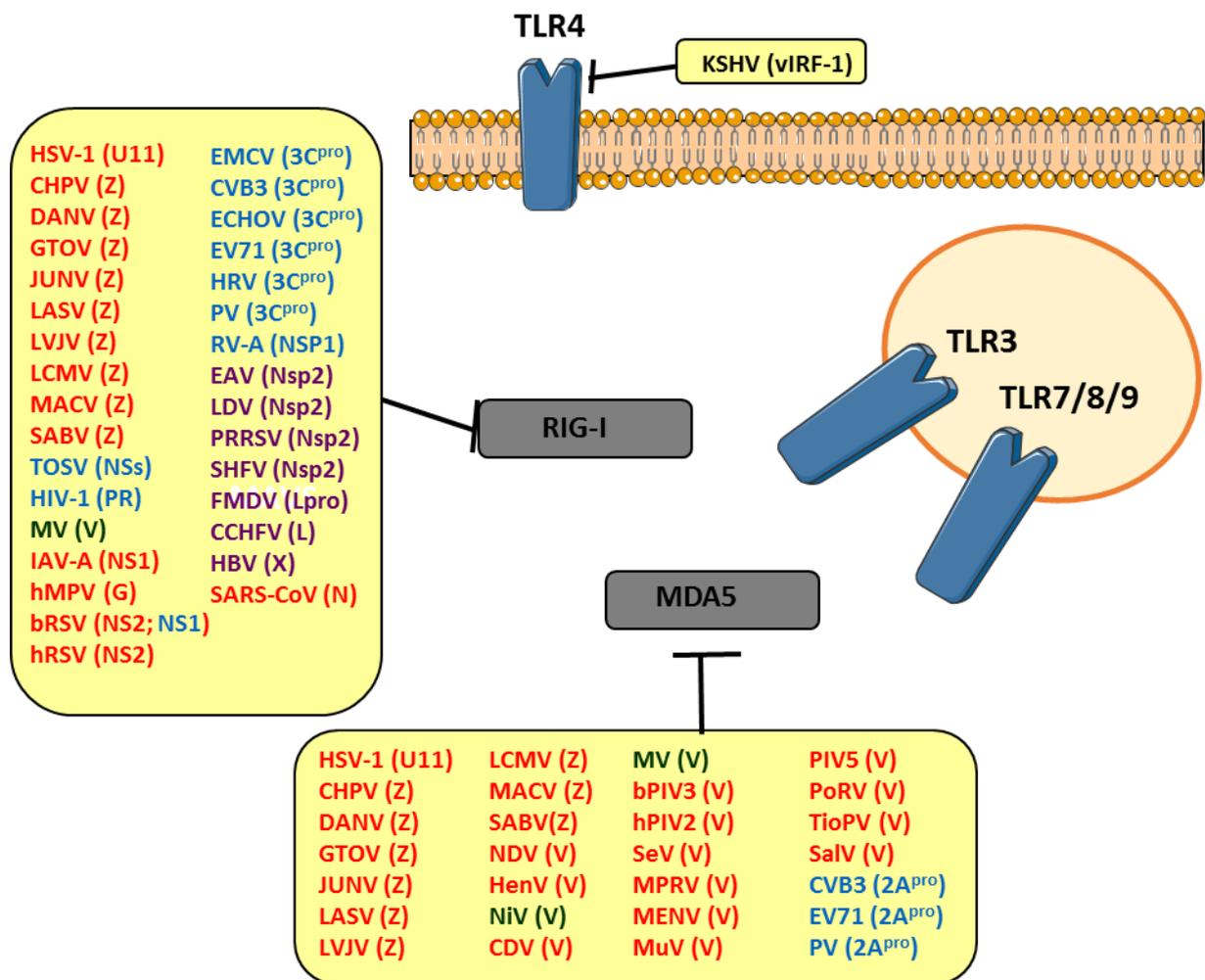


Figure 17. Stratégies de blocage des PRRs par les protéines virales.

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge; en bleu les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible; en violet les protéines virales qui déubiquitinylent leur cible; en vert les protéines virales qui hyperphosphorylent leur cible; et en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET⁴²⁵ et dans différentes revues^{442,443}.

b- Inhibition des adaptateurs des voies de signalisation TLR et RLR par les virus

Les adaptateurs sont la cible de nombreuses protéines virales qui vont principalement les dégrader ou les séquestrer pour inhiber leur interaction avec d'autres partenaires cellulaires (Figure 18). MAVS est un adaptateur souvent ciblé par les protéines virales. Les protéines Nsp4 et Nsp11 du PRRSV vont respectivement cliver MAVS et dégrader l'ARNm codant pour MAVS^{444,445}. La protéine X du HBV interagit avec MAVS, entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation protéosomale⁴⁴⁶. Au contraire, certains virus interagissent avec MAVS sans la dégrader, empêchant alors MAVS de recruter ces partenaires cellulaires comme c'est le cas de la protéine M2-2 du métapneumovirus humain (hMPV)⁴⁴⁷. Les protéines TRAFs peuvent être également la cible de protéines virales. TRAF3 et TRAF6 peuvent être séquestrées, dégradées ou déubiquitylées. L'ubiquitinylation des protéines TRAFs étant une étape nécessaire au recrutement de protéines de la voie de signalisation IFN-I, leur déubiquitinylation permet donc l'inhibition de la synthèse d'IFN-I. Par exemple, HPV-16 régule positivement la DUB cellulaire UCHL1 (pour *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*) qui va inhiber l'ubiquitinylation de TRAF3 et TRAF6⁴⁴⁸. Certaines protéines virales possèdent une activité de déubiquitinylation intrinsèque et n'ont donc pas besoin de recruter de DUB cellulaires. C'est notamment le cas de la protéine UL36 du HSV-1 qui est capable de déubiquityler TRAF3 et empêcher le recrutement de TBK1 et IKKε⁴⁴⁹. D'autres protéines virales vont dégrader les TRAFs comme la protéine ORF9b du SARS-CoV qui induit une régulation positive des protéines PCBP2 (pour *poly(rc) binding protein 2*) et Itch (E3 ubiquitine ligase), induisant ainsi la polyubiquitinylation en K48 et ainsi la dégradation de MAVS, TRAF3 et TRAF6⁴⁵⁰.

L'adaptateur TRIF est également la cible des protéines virales. Via une liaison directe avec TRIF, la protéine virale peut soit dégrader, cliver ou séquestrer TRIF afin d'inhiber sa fonction. La protéine A64R du VACV contient un domaine TIR, lui permettant d'interagir avec de nombreux adaptateurs des TLRs : TRIF mais aussi MyD88, MAL et TRAM qui contiennent également un domaine TIR, ce qui bloque leur activité. Une des stratégies est le clivage de TRIF, mécanisme utilisé par exemple par les protéines NS3/4A du HCV et 3C^{pro} du CVB3 et EV71⁴⁵¹⁻⁴⁵⁴.

Enfin, la protéine NEMO est également ciblée. Le mode d'action le plus souvent décrit est le clivage de NEMO, qui conduit à l'inhibition de la synthèse d'IFN-I, comme c'est le cas des protéines C3^{pro} du virus de la fièvre aphteuse (FMDV pour *foot-and-mouth disease virus*) et du HAV^{455,456}.

Au contraire de MAVS, des protéines TRAFs et des adaptateurs TRIF et NEMO, les adaptateurs MyD88, MAL, TRAM, IRAK1, IRAK4, SINTBAD, NAP-1 et TANK semblent peu ciblés par les protéines virales. Cependant, le peu d'études disponibles ne signifie pas qu'ils ne sont pas affectés lors d'une infection virale.

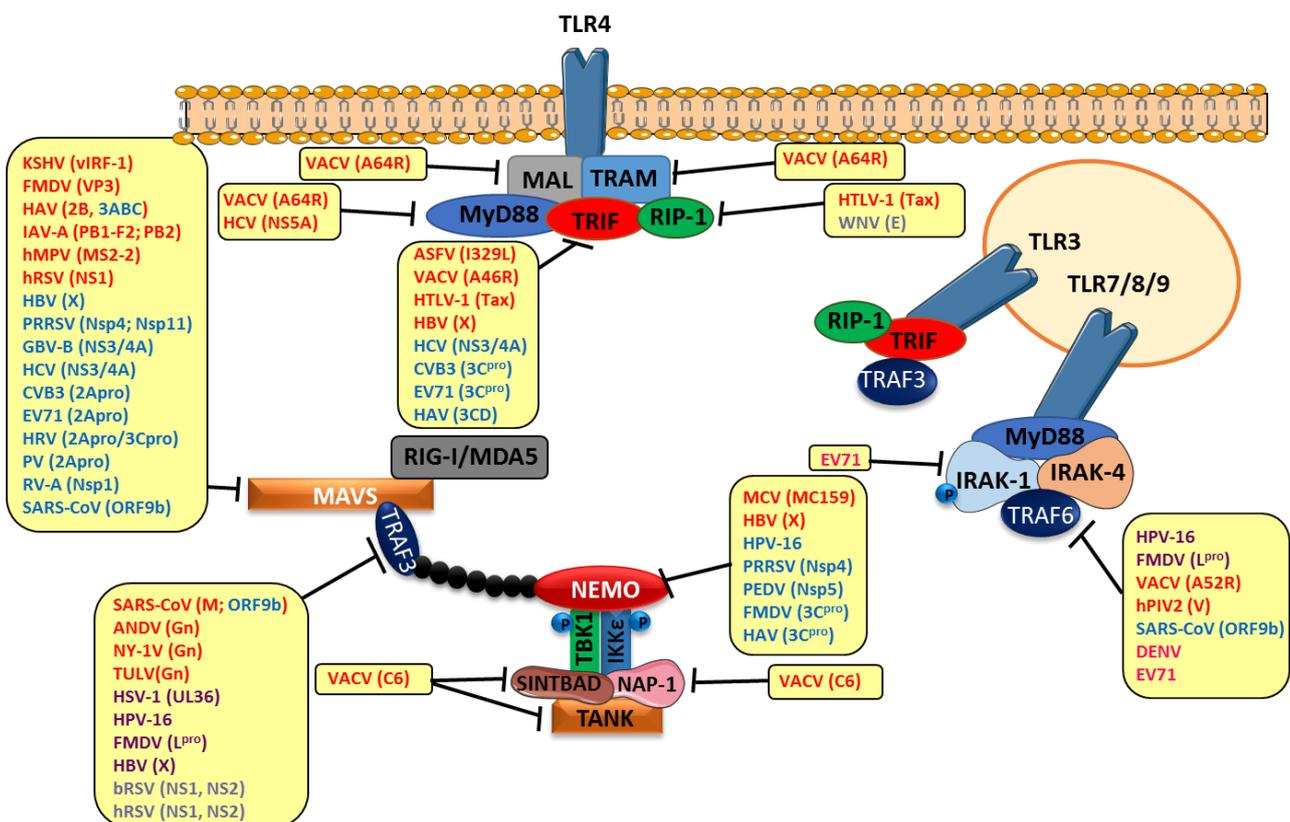


Figure 18. Stratégies de blocage des adaptateurs des voies RLRs par les protéines virales.

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge ; en bleu les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible ; en violet les protéines virales qui déubiquitylent leur cible ; en rose les protéines virales qui inhibent la traduction de leur cible et en gris les protéines virales dont le mécanisme d'inhibition est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET⁴²⁵ et dans différentes revues^{442,443}.

c- Inhibition du complexe IKKε-TBK1 par les virus

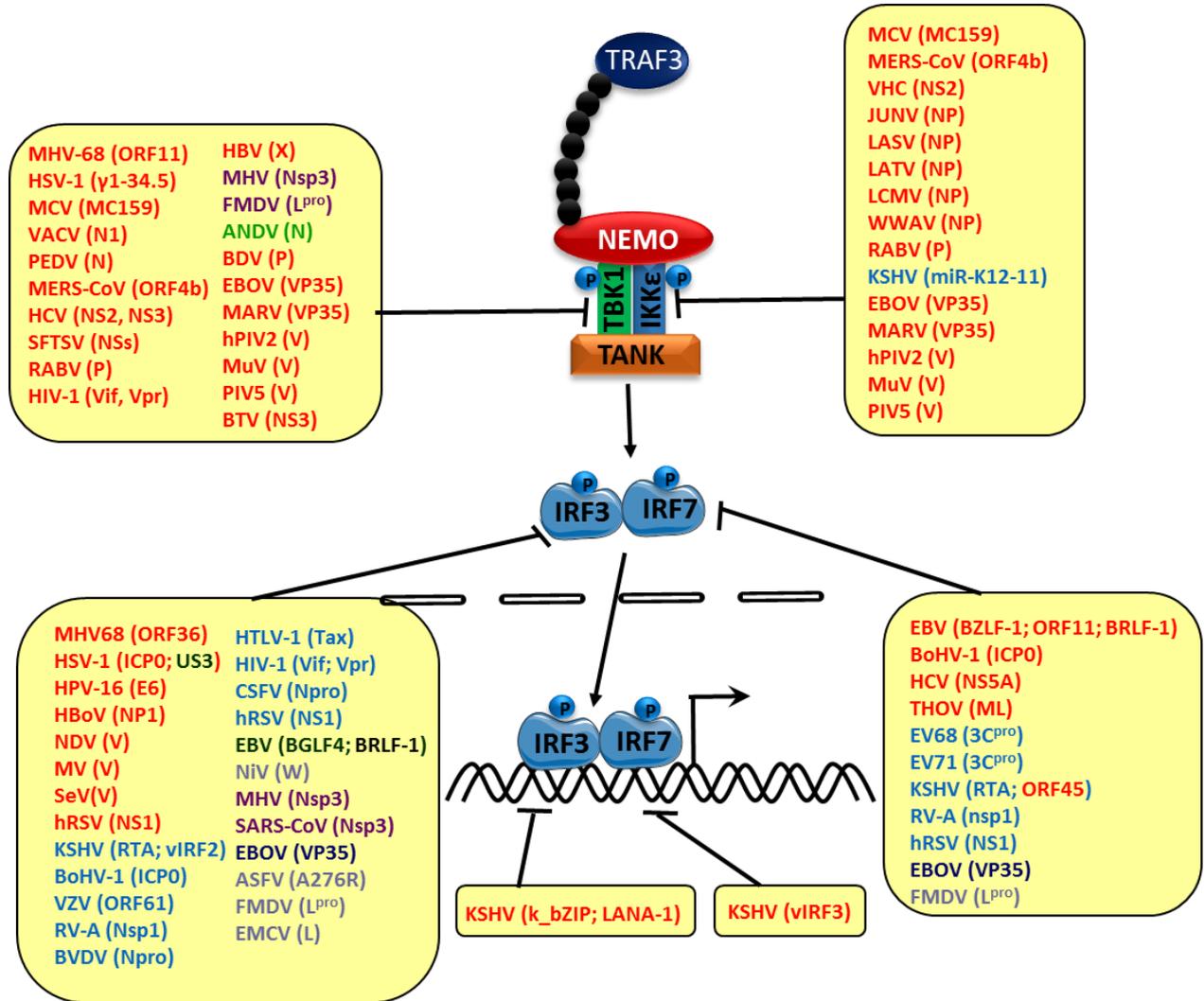


Figure 19. Stratégies de blocage des voies de synthèse de l'IFN-I en aval des adaptateurs par les protéines virales.

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge; en bleu foncé les protéines virales qui entraînent la SUMOylation de leur cible ; en bleu clair les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible ; en violet les protéines virales qui débubiquitinylent leur cible ; en vert foncé les protéines virales qui hyperphosphorylent leur cible ; en vert clair les protéines virales qui déphosphorylent leur cible ; en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible ; et en gris les protéines dont le mécanisme d'inhibition est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET ⁴²⁵ et dans différentes revues ^{442,443}.

La formation du complexe IKK ϵ -TBK1 étant une étape importante de la voie de signalisation, son inhibition par des protéines virales a très souvent été décrite (Figure 19). La séquestration des protéines IKK ϵ et TBK1 est le mécanisme le plus utilisé par les protéines virales ⁴²⁵. Cette séquestration entraîne le blocage de l'activité catalytique du complexe IKK ϵ -TBK1 et donc l'inhibition de la phosphorylation des IRFs. C'est par exemple le cas pour les protéines virales de nombreux arénavirus (virus JUNV, LASV, Latino (LATV), LCMV, WWAV (pour *Whitewater Arroyo virus*)) qui interagissent avec IKK ϵ ⁴⁵⁷. Certaines protéines virales interagissent avec IKK ϵ et TBK1 et agissent comme un substrat leurre qui sera phosphorylé par IKK ϵ et TBK1 au lieu des protéines IRFs, qui ne seront alors pas activées. C'est le cas de la protéine VP35 des virus EBOV et de Marburg (MARV) ainsi que de la protéine V des virus parainfluenza virus humain-2 (hPIV2), oreillons (MuV) et PIV5 ⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰. Un autre mécanisme est l'inhibition de l'autophosphorylation de TBK1, comme c'est le cas pour la protéine N du virus Andes (ANDV) ⁴⁶¹. Enfin TBK1 peut également être déubiquitinylé. Certaines protéines virales possèdent une activité DUB permettant la déubiquitinylation de TBK1 et donc l'inhibition de son activité protéine kinase. Ce mécanisme est notamment utilisé par le domaine PLP2 de la protéine non-structurale nsp3 du MHV ⁴⁶². D'autres mécanismes peuvent être utilisés. Par exemple, la protéine NS3 du virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV) s'associe à l'optineurine, une protéine qui recrute TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi. En recrutant l'optineurine, NS3 empêche TBK1 d'être recrutée et donc activée ⁴⁶³.

d- Inhibition des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 par les virus

Les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 peuvent également être ciblés via des mécanismes empêchant leur phosphorylation ou bloquant leur transport dans le noyau ou leur liaison avec le promoteur IFN- β (Figure 19). Un autre mécanisme consiste en la dégradation des protéines IRF, comme le fait la protéine Nsp1 du Rotavirus-A (RV-A), une E3-ubiquitine ligase qui va induire la dégradation protéosomale d'IRF3 et IRF7 ⁴⁶⁴⁻⁴⁷². IRF3 peut être déubiquitinylé ou hyperphosphorylé ce qui inhibe son activité. Par exemple, les protéines BGLF4 d'EBV et US3 de HSV-1 se lient directement à IRF3 et entraînent son hyperphosphorylation, ce qui induit une inhibition de son activité ^{473,474}. Le domaine PLpro (pour *papain like protease*) de la protéine Nsp3 du SARS-CoV permet une inhibition de la voie de synthèse de l'IFN- β en interagissant avec et en déubiquitinylant IRF3, suggérant que

l'ubiquitylation de IRF3 serait importante pour son activité ⁴⁷⁵. D'autres mécanismes sont également utilisés. Par exemple, l'ORF45 du KSHV (pour *Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*) interagit avec IRF7 et agit comme substrat alternatif, ou leurre, inhibant son interaction avec IKKε et TBK1 ⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁸. La protéine VP35 du EBOV, en interagissant avec IRF7, Ubc9 (une enzyme E2 SUMO) et PIAS1 (SUMO E3 ligase) accroît la sumoylation d'IRF3 et IRF7, contribuant ainsi à la suppression de la transcription de l'IFN-I ⁴⁷⁹.

Certaines protéines virales vont empêcher la liaison des IRFs avec le promoteur IFN-I. C'est le cas des protéines k_bZIP et LANA-1 du KSHV qui entrent en compétition avec IRF3 pour la liaison au promoteur IFN-β ^{480,481} et de la protéine vIRF3 qui entre en compétition avec IRF7 pour la liaison au promoteur IFN-α ⁴⁸².

2- Contrôle de la réponse à l'IFN-I par les virus

La voie de signalisation JAK-STAT peut être bloquée à tous les niveaux par différents virus. De plus, d'autres protéines impliquées dans la régulation de cette voie de signalisation, telles que les protéines SOCS sont également ciblées par les virus. Les différents mécanismes de blocages utilisés par différents virus sont résumés dans la figure 20.

Il peut y avoir un blocage au niveau de la liaison entre l'IFN-I et le récepteur IFNAR. Certaines protéines virales vont se lier à l'IFN-α/β et bloquer sa liaison avec le récepteur IFNAR, comme par exemple le virus de la variole (VARV) ou le virus Monkeypox (MYXV) ^{483,484}.

Le récepteur IFNAR peut être directement ciblé, et la séquestration ou la dégradation du récepteur IFNAR1 sont les mécanismes les plus souvent décrits. Par exemple la protéine RIF du KSHV forme un complexe comprenant IFNAR1/2, JAK1, TYK2 et STAT2, inhibant ainsi l'activité des protéines séquestrées ⁴⁸⁵. L'expression du récepteur IFNAR peut également être réduite. Ce mécanisme est utilisé par la protéine NS4B du HCV ⁴⁸⁶. IFNAR peut également être dégradé. Par exemple, l'activité protéase de la protéine 2A de l'EV71 dégrade l'IFNAR1 ⁴⁸⁷.

Une autre cible importante des virus est JAK1 et TYK2. Les virus peuvent séquestrer JAK1 et/ou TYK2, inhiber leur expression, les dégrader ou inhiber leur phosphorylation.

Certains virus inhibent l'expression de JAK1 et/ou TYK2 au niveau transcriptionnel, comme l'Adénovirus 5 (Ad5) ⁴⁸⁸, et le hMPV ⁴⁸⁹ qui dégradent l'ARNm codant pour JAK1. D'autres induisent leur dégradation via le système ubiquitine-protéasome, comme par exemple le

virus hCMV ⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. Un mécanisme souvent rapporté est la déphosphorylation de la protéine TYK2 par les protéines virales qui se fait soit directement via une interaction entre la protéine virale et TYK2, soit indirectement via la modulation d'une autre protéine impliquée dans la phosphorylation de TYK2. Par exemple, la protéine LMP-1 de EBV et la protéine E6 du HPV-18 se lient directement à TYK2 pour inhiber sa phosphorylation ^{492,493}. Au contraire, le HCV induit l'expression de la phosphatase 2A (PP2A) qui s'associe avec JAK1/TYK2/STAT1 pour bloquer leur phosphorylation ⁴⁹⁴. De même, les protéines UL13 et UL41 du HSV-1, la protéine Core du HCV et la protéine G du RSV induisent l'expression de SOCS3, qui va dégrader JAK1 et TYK2 ⁴⁹⁵⁻⁵⁰⁰.

Les virus vont également cibler la formation, la stabilité et l'activation du complexe ISGF3 de manière directe ou indirecte. De nombreuses protéines virales vont inhiber la phosphorylation de STAT1, notamment les protéines VH-1 des VARV et VACV qui possèdent une activité phosphatase pour déphosphoryler STAT1 et la protéine NS5A du HCV qui va se lier à STAT1 et empêcher sa phosphorylation ⁵⁰¹⁻⁵⁰⁵. L'inhibition de la phosphorylation de STAT2 est également un mécanisme répandu. Des protéines virales vont aussi induire la dégradation protéolytique de STAT1 et/ou STAT2 ou bien cibler leur expression au niveau transcriptionnel. Par exemple, la protéine Vhs du HSV-2 est capable de dégrader STAT2 à la fois au niveau de l'ARNm de part son activité RNase mais également au niveau protéique en entraînant sa dégradation par le protéasome ⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁹. Les protéines du complexe ISGF3 peuvent aussi être séquestrées. Par exemple, la protéine C de hPIV-1 interagit avec STAT1 et la bloque dans des agrégats périnucléaires ⁵¹⁰. IRF9 est également une cible, elle peut être séquestré ou dégradé par des protéines virales telles que la protéine 3C^{pro} de l'EV71 qui clive IRF9 ⁵¹¹.

Certaines protéines virales vont inhiber l'entrée du complexe ISGF3 dans le noyau, soit en interagissant directement avec lui, le séquestrant ainsi dans le cytoplasme soit indirectement en interagissant avec une protéine cellulaire impliquée dans le transport des protéines à travers les pores nucléaires. La Karyophérine- α (KPNA) est une protéine cellulaire impliquée dans le transport du complexe ISGF3 dans le noyau qui a été rapportée comme étant la cible par de nombreuses protéines virales afin d'inhiber l'entrée du complexe dans le noyau. EV71, la protéine Nsp1 β du PRRSV et la protéine 3C^{pro} du FMDV induisent la dégradation de KPNA1, empêchant ainsi la translocation du complexe ISGF3 ⁵¹²⁻⁵¹⁵. Au

contraire, l'ORF6 du SARS-CoV, et les protéines VP24 des virus LLOV (Lloviu cuevavirus) et EBOV interagissent avec KPNA pour la retenir dans le cytoplasme⁵¹⁶⁻⁵²¹.

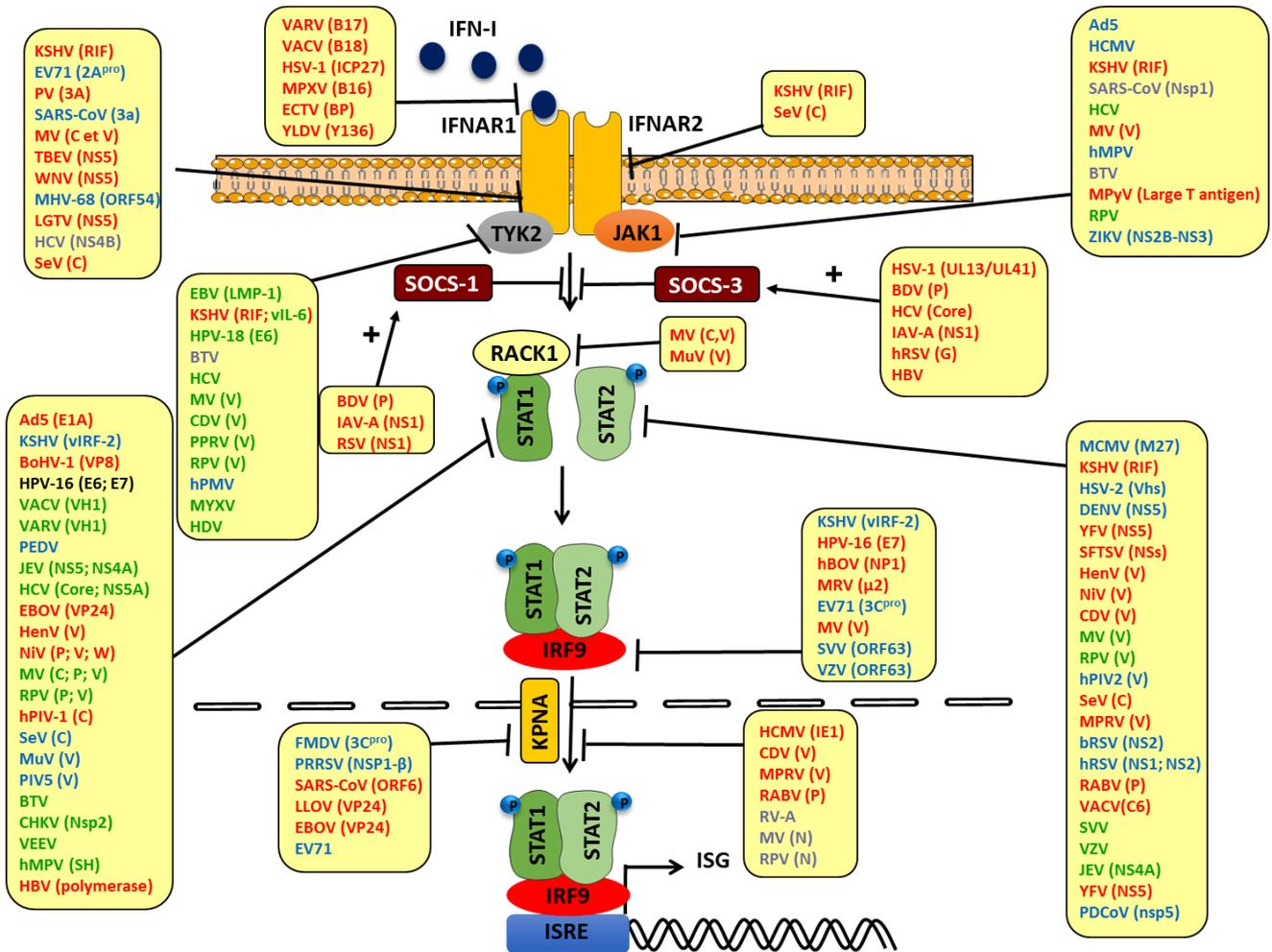


Figure 20. Stratégies de blocage de la voie JAK-STAT par les protéines virales.

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge ; en bleu les protéines virales qui dégradent leur cible ; en vert les protéines virales qui induisent une déphosphorylation de la protéine cellulaire ciblée ; en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible et en gris les protéines virales dont le mécanisme d'inhibition utilisé est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET⁴²⁵ et dans différentes revues^{442,443}.

Un autre mécanisme consiste en l'inhibition de l'activation du promoteur ISRE. La protéine C6 du VACV inhibe STAT2 en se liant à son domaine transactivateur, l'empêchant ainsi d'activer le promoteur ISRE⁵²². De façon similaire, la protéine NP1 du Bocavirus humain

(hBOV) se lie au domaine de liaison à l'ADN de IRF9, l'empêchant ainsi de se lier au promoteur ISRE.

Certains virus ont développé différentes stratégies pour bloquer la voie JAK-STAT à plusieurs niveaux : c'est le cas du MV qui code pour les protéines V, P, C et N qui inhibent la voie JAK-STAT par différents mécanismes : la protéine V se lie à JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1^{523,524}. De plus, elle interagit également directement avec STAT1, STAT2, IRF9^{523,525-528} et TYK2 pour bloquer la phosphorylation de ce dernier⁵²⁹. La protéine P interagit également avec STAT1 et bloque sa phosphorylation⁵³⁰⁻⁵³². La protéine N bloque la translocation nucléaire du complexe STAT1-STAT2 activé⁵³³. Enfin, la protéine C forme un complexe avec V, RACK1 (pour *receptor of activated protein kinase C*), IFNAR1 et STAT1 pour bloquer la voie de signalisation^{534,535}. RACK1 est une protéine permettant la liaison entre IFNAR2 et STAT1. En formant un complexe avec ces différentes protéines, les protéines V et C inhibent leur activité, STAT1 n'est plus recruté au niveau de l'IFNAR et ne peut donc plus être phosphorylé. De plus, la protéine C est également capable, via sa liaison à l'IFNAR1, d'inhiber la phosphorylation de JAK1.

B- Interaction entre système IFN-I et HEV

1- Activation de la réponse immunitaire en réponse au HEV

α- Activation de la synthèse d'IFN-I en réponse au HEV ?

Plusieurs études ont montré que l'infection par le HEV est capable d'activer la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi ces études, certaines ont rapporté une augmentation de la production d'IFN-I après infection par le HEV. Il a notamment été décrit une augmentation de la production d'IFN-I *in vivo* chez le porc suite à l'infection par une souche de HEV porcine⁵³⁶. De plus, il a été montré une induction de l'expression de l'IFN-I dans des cellules humaines A549 en réponse à une infection par une souche de HEV-1, provenant de fèces prélevées chez un patient atteint d'une hépatite E⁵³⁷. Cependant, cette expression est faible et corrèle avec une faible induction d'ISGs. De plus, la mesure de la sécrétion d'IFN-I par ELISA n'a pas permis de détecter la présence d'IFN-I dans le surnageant de culture. Récemment, une autre étude a montré que, dans des cellules HepG2 et des hépatocytes

primaires humains, la transfection d'un clone infectieux de longueur génomique du HEV-3 (souche Kernow-C1) ne conduisait pas à la détection de la production d'IFN- α / β dans le surnageant de culture mais uniquement de l'IFN-III⁵³⁸. L'analyse des cellules par RT-PCRq a montré une très faible augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- β . Au contraire, une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- λ et de certains ISGs a pu être observée.

b- Activation de la synthèse des ISGs en réponse au HEV

Plusieurs études ont montré l'induction d'ISGs après infection par le HEV. Une étude sur des patients présentant une hépatite chronique a montré une augmentation de l'expression de 25 ISGs, dont l'ISG15, Mx1 et IFIT1⁵³⁹. Une étude comparative dans des cellules Huh7 transfectées avec un clone infectieux codant pour une souche de HEV-1 ou pour une souche de HBV a permis de mettre en évidence des gènes dont l'expression était augmentée après infection avec le HEV et des gènes dont l'expression était diminuée⁵⁴⁰. Notamment, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire, était augmentée dans les cellules infectées par le HEV en comparaison aux cellules infectées par le HBV. De plus, une autre étude a montré une augmentation de l'expression de certains ISGs tel que Mx1 dans des cellules PLC/PRF/5 infectées avec une souche de HEV-4 provenant de fèces de singes infectés expérimentalement⁵⁴¹. Chez le chimpanzé, il a été observé une augmentation de l'expression d'ISG15, OAS1, Mx1, STAT1 et IRF7 après infection avec le HEV-1 (souche SAR55)⁵⁴². Cependant, cette induction est faible en comparaison de l'induction des ISGs après infection par le HCV. De plus, cette étude a montré que de nombreux ISGs induits par l'infection par le HCV ne sont pas induits après infection avec le HEV. La réponse IFN-I est également plus courte dans le temps après infection par le HEV et conduit à une élimination du virus, suggérant que le HEV est plus sensible aux effets des ISGs que le HCV. Très récemment, une autre étude a montré dans des cellules Huh7-S10-3 transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (Kernow-C1) et dans des foies de porcs infectés expérimentalement avec le HEV, que l'infection par le HEV induisait une production importante d'ISG15⁵⁴³. De plus, cette étude a suggéré que l'ISG15 jouerait un rôle immunomodulateur sur la réponse du HEV à l'IFN-I.

c- Protéines impliquées dans la reconnaissance et la réponse au HEV

Récemment, plusieurs études ont permis de mettre en évidence des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réponse immunitaire à l'infection par le HEV. Il a été montré une activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 dans des cellules humaines A549 en réponse à une infection par une souche de HEV-1, provenant de fèces prélevées chez un patient atteint d'hépatite E ⁵³⁷. Dans la même étude, il a été rapporté que les adaptateurs TRIF et MyD88 seraient impliqués dans la réponse antivirale, suggérant une implication des TLR 2,3 et 4 dans la reconnaissance du HEV ⁵³⁷. Une étude dans des lignées hépatocytaires Huh7.5 et Huh7.S-10 et HepG2/C3A transfectées avec un clone infectieux codant pour une souche de HEV-1 (souche pSKHEV-2) a montré une induction des IFN-I ainsi que de différentes ISGs dont ISG15, IFIT1, Mx1, OAS1 ⁵⁴⁴. De plus, il semblerait que les voies de signalisation RIG-I et TLR3 soient impliquées dans la reconnaissance du HEV. En effet, il a été montré dans la même étude qu'après transfection d'un plasmide exprimant une forme fonctionnelle de RIG-I ou TLR3 dans des cellules Huh7.5, présentant un déficit au niveau de RIG-I et TLR3, que la réplication du HEV était affectée et l'expression des ISGs était augmentée, suggérant une reconnaissance du HEV par RIG-I et TLR3. La localisation de RIG-I au niveau du cytoplasme, permettrait la reconnaissance de l'ARN génomique du HEV alors que TLR3, localisé au niveau des endosomes, reconnaîtrait des intermédiaires réplicatifs.

D'autres études récentes ont permis de mettre en évidence un rôle important de certaines protéines codées par les ISGs dans l'élimination du HEV. C'est le cas d'IRF1, qui permet l'activation de la transcription de STAT1 ^{545,546}, mais aussi de RIG-I et MDA5 ⁵⁴⁶. En effet, il a été montré dans des cellules Huh7 et HepaRG transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) ou le génome du HEV-1 (souche Sar55), qu'IRF1 inhibait la réplication du virus. En effet, IRF1 induit la transcription de *STAT1*, ce qui conduit à une augmentation de son expression et de sa phosphorylation et à la formation du complexe ISGF3 et donc à l'expression des ISGs, indépendamment de l'IFN- α ⁵⁴⁵. En utilisant un plasmide codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) transfecté dans des cellules Huh7.5, A549 ou HepaRG, il a été montré que la surexpression de RIG-I inhibe la réplication du HEV via l'induction de la transcription de nombreuses ISGs ⁵⁴⁶. Il a également été montré que cette induction d'ISGs est indépendante d'une production d'IFN-I. En effet, la surexpression de RIG-I n'induisait aucune synthèse des ARNm codant pour les IFN- α /- β /- λ ,

malgré une activation de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules huh7.5. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de JAK a montré que l'activité anti-HEV de RIG-I n'était que partiellement inhibée, suggérant que RIG-I active la transcription d'ISGs et exerce son activité antivirale partiellement via l'activation de la voie JAK-STAT.

2- Contrôle de la réponse IFN-I par le HEV

En plus d'activer la réponse IFN-I, quelques études ont mis en évidence une modulation du système IFN-I par le HEV (Figure 21). Dans des cellules A549 infectées avec du virus provenant de fèces d'un patient atteint d'une hépatite chronique, il a été montré que le HEV-3 inhibe la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- α et atténue l'expression de certains ISGs⁵⁴⁷. En utilisant un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) transfecté dans des cellules Huh7, il a été montré une inhibition de la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- α et une atténuation de l'expression de certains ISGs⁵⁴⁸. En utilisant le même clone infectieux, il a été rapporté une inhibition de l'expression de certains ISGs (Mx1, IFIT1, IFIT3 et CXCL10) induites par les IFN- α / γ / λ dans des cellules HepG2⁵⁴⁹.

En contexte de surexpression dans les cellules A549, une étude a montré que l'ORF3 du HEV-3 est capable de s'associer à STAT1 et d'inhiber sa phosphorylation⁵⁴⁷. L'ORF3 est également capable de se lier à et d'activer SIRP α . En activant SIRP α , l'ORF3 du HEV est capable d'inhiber l'activation d'IRF3⁵⁵⁰. Au contraire, l'ORF3 du HEV-1 interagirait avec le domaine N-terminal de RIG-I, induirait son ubiquitinylation en K63, conduisant ainsi à son activation⁵⁵¹. De plus, l'ORF3 du HEV-1 est également capable d'inhiber la voie NF- κ B induite par TLR3 en diminuant l'ubiquitinylation en K63 de RIP-1 dans des cellules A549⁵⁵². Une autre étude a montré que l'ORF3 du HEV-1 inhibe la voie NF- κ B induite par le TNF α en augmentant l'expression de la DUB A20 dans des cellules A549⁵⁵³. A20 enlève les chaînes de polyubiquitine en K63 de RIP-1 et est également capable de polyubiquitinyler RIP-1 en K48 résultant respectivement en une inactivation de RIP-1 et sa dégradation par le protéasome (Figure 14B). Enfin, une troisième étude a montré que l'ORF3 inhibe la voie NF- κ B induite par le LPS dans des cellules humaines PMA-THP1, induisant ainsi une inhibition de cytokines pro-inflammatoires⁵⁵⁴.

Des études ont mis en évidence un rôle de l'ORF2 dans la régulation de la voie de signalisation NF- κ B. En effet, l'ORF2 est capable d'inhiber la voie de signalisation NF- κ B en empêchant l'ubiquitinylation et donc la dégradation de I κ B⁵⁵⁵. Il a également été montré que la protéine TMEM134 (pour *transmembrane protein 134*) interagit avec l'ORF2 et régule négativement l'inhibition de la voie NF- κ B par l'ORF2⁵⁵⁶.

Peu d'études ont été encore réalisées sur l'effet de l'ORF1 du HEV sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Seule une étude a été publiée sur le HEV-1. Il a été montré que les domaines X et PCP de l'ORF1 sont capables d'inhiber la synthèse des ARNm codant pour l'IFN- β induite par la stimulation au poly(I:C) mais également d'inhiber l'activation du promoteur IFN- β induite par le SeV dans un test rapporteur luciférase. De plus, le domaine X est également capable d'inhiber l'activation du promoteur IFN- β induite par RIG-I, MDA5, TBK1 et IKK ϵ . En étudiant le mécanisme responsable de l'inhibition, il a été montré que le domaine X de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de l'IRF3 induite par une stimulation au poly(I:C) et que le domaine PCP possède une activité DUB et déubiquitinye RIG-I et TBK1 dans des cellules HEK293T⁵⁵⁷. Ces résultats ont ensuite été confirmés après transfection de cellules Huh7-S10-3 avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-1 (souche pSK-E2). Une étude en double hybride en levure, visant à rechercher des interacteurs cellulaires des différents domaines du HEV, a mis en évidence des potentielles interactions entre les différents domaines de l'ORF1 et des protéines impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte comme le domaine X et la protéine JAK2, le domaine hélicase et la protéine TAB1, le domaine RdRp et l'ISG56⁵⁵⁸. Cependant, ces interactions restent encore à confirmer.

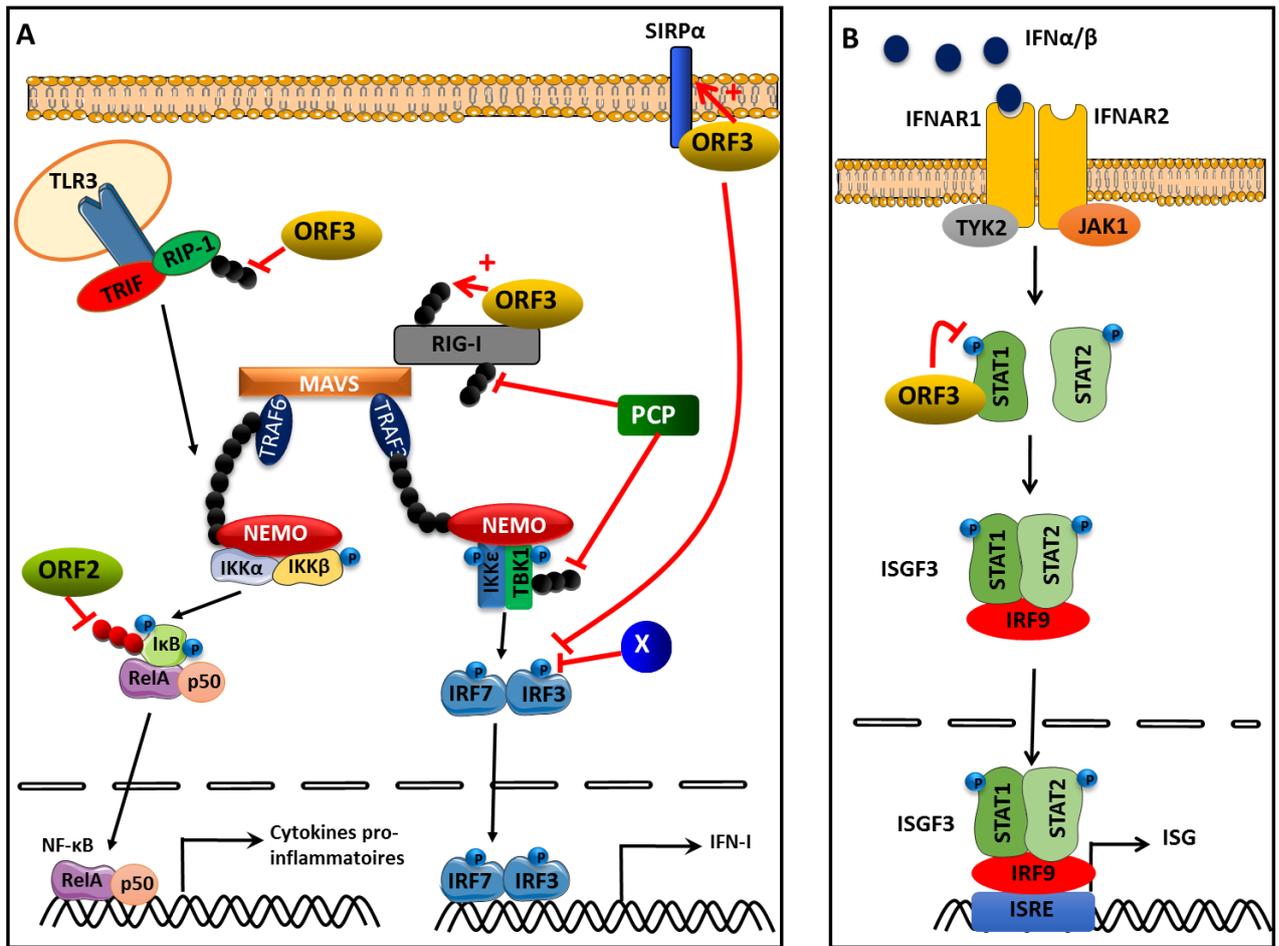


Figure 21. Inhibition des voies de synthèse de l'IFN-I (A) et de réponse à l'IFN-I (B) par les différents domaines de l'ORF1, l'ORF2 et l'ORF3 du HEV.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le HEV est l'agent responsable d'une hépatite aiguë chez l'homme qui peut évoluer en hépatite fulminante, notamment chez la femme enceinte. Le HEV est endémique dans les pays en développement mais de nombreux cas ont également été recensés dans les pays industrialisés dont la France. De plus, le HEV est endémique dans les élevages porcins, et la transmission zoonotique par la consommation de produits à base de porcs infectés en fait un véritable problème de santé publique en Europe. Par ailleurs, la description récente de cas chroniques d'hépatite E, évoluant vers des atteintes sévères du foie, renforce le besoin de mieux caractériser les interactions étroites du HEV avec son hôte. Cependant, du fait de l'absence de système de culture efficace du HEV, peu d'études ont pu être réalisées. En outre, il y a peu de données sur les interactions du HEV avec le système immunitaire de l'hôte. L'IFN-I jouant un rôle crucial dans la réponse antivirale de l'hôte, nous avons souhaité étudier l'interaction du HEV avec ces voies de signalisation. L'objectif de cette thèse était donc d'étudier la capacité du HEV à activer et moduler la réponse IFN-I.

Le premier objectif de mon projet de thèse était de déterminer si l'ORF1 ou les différents domaines qui la composent ont un effet sur l'activation des voies de signalisation de l'IFN-I. En effet, un grand nombre de virus ont mis en place des stratégies pour inhiber les voies de synthèse de l'IFN-I et de réponse à l'IFN-I. Cette capacité d'inhibition est le plus souvent portée par les protéines non-structurales. L'ORF1 code pour une polyprotéine possédant plusieurs fonctions non-structurales dont les rôles ne sont pas encore bien établis. Au début de mes travaux de thèse en 2014, aucune étude n'avait été publiée sur l'effet de l'ORF1 sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Les domaines PCP et X du HEV sont homologues à des domaines retrouvés chez d'autres virus à ARN positif et pour lesquels un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire innée, et notamment celle du système IFN-I, a été démontré. Nous avons donc émis l'hypothèse que les domaines PCP et X du HEV pourraient également jouer un rôle dans la modulation de ces voies de signalisation. De plus, nous avons également souhaité étudier l'effet du domaine Y sur les voies de signalisation de l'IFN-I car sa fonction n'était pas connue.

Le deuxième objectif de mon projet de thèse a consisté en l'étude de la capacité du HEV à induire la production d'IFN-I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Ces cellules font partie de la première ligne de défense de l'organisme lors d'une infection par un agent pathogène. Les pDCs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative en produisant de grandes quantités d'IFN-I, permettant ainsi le contrôle des infections. Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'activation des pDCs par le HEV. L'étude des interactions entre ces cellules et le HEV permettra de mieux comprendre le rôle de ce type cellulaire dans le contrôle de l'infection virale.

Les deux parties de mon projet de thèse avaient donc pour objectif d'acquérir de nouvelles connaissances sur les fonctions des différents domaines non structuraux de l'ORF1, en particulier vis à vis de la réponse IFN-I, et sur l'interaction du HEV avec les acteurs précoces de la réponse immunitaire comme les pDCs. Ces connaissances pourront permettre de mieux lutter contre l'infection par le HEV.

CHAPITRE 1 :
ETUDE DE LA CAPACITE DE L'ORF1 DU HEV A MODULER LE SYSTEME
IFN-I

I- INTRODUCTION

Un grand nombre de virus ont mis en place des stratégies pour inhiber les voies de synthèse de l'IFN-I et de réponse à l'IFN-I. En contexte infectieux, le HEV est capable d'inhiber l'expression de certains ISGs. En contexte de surexpression, il a été rapporté un rôle de l'ORF2 et de l'ORF3 du HEV dans l'inhibition des voies d'induction et de réponse à l'IFN-I. Cependant, peu d'études ont encore été réalisées sur l'ORF1 du HEV.

L'ORF1 du HEV code pour une polyprotéine possédant les fonctions non-structurales. Cependant, les fonctions de certains domaines de l'ORF1 ne sont pas encore très bien comprises, et notamment l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Les domaines PCP et X sont homologues à d'autres motifs viraux pour lesquels un rôle dans la modulation du système IFN-I a été démontré. L'objectif de cette partie de mon projet de thèse était donc de déterminer si l'ORF1 ou ses différents domaines ont un effet sur l'activation des voies de signalisation de l'IFN-I. Nous avons alors cloné et exprimé les différents domaines de l'ORF1 pour tester leurs capacités à moduler la voie de réponse à l'IFN-I, puis nous avons sélectionné le domaine protéique au plus fort potentiel inhibiteur afin d'étudier son mécanisme d'action au sein de la voie de signalisation.

II- MATERIELS ET METHODES

A- Plasmides

1- Stratégie de clonage de l'ORF1 et de ces différents domaines

Les séquences codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines putatifs ont été déterminées par bioinformatique en utilisant des logiciels de prédiction de domaines fonctionnels⁹⁹. Ces séquences ont été amplifiées par PCR en utilisant la polymérase Phusion (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific ; Waltham, Massachusetts, États-Unis) avec les oligonucléotides répertoriés dans l'annexe 1. Un clone infectieux construit dans le laboratoire et codant pour le génome complet d'un génotype 3f du HEV (FR-FulmHEV-3f amplifié à partir du sérum d'un

patient présentant une hépatite E fulminante) a été utilisé comme matrice pour l'amplification des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3.

La technique de clonage Gateway (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) nécessite l'incorporation des sites de recombinaison AttB1 et AttB2 aux extrémités du produit de PCR à cloner. Ils sont utilisés pour l'insertion du produit de PCR dans un vecteur d'entrée Gateway compatible (pDONOR207R, Invitrogen ; Carlsbad, CA, Etats-Unis) via un processus de recombinaison homologue durant une réaction BP (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) effectuée en suivant les instructions du fabricant. Le gène cloné peut ensuite être redistribué par une deuxième réaction de recombinaison dans une collection de vecteurs de destination Gateway compatibles (pCINeo3xFlag et pEGFP-C1) par une simple réaction LR (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) effectuée en suivant les instructions du fabricant. Toutes les constructions réalisées ont été séquencées (Eurofins MWG, Ebersberg, Allemagne).

2- *Autres plasmides*

Les plasmides p Δ RIG-I comprenant les domaines CARD de la protéine RIG-I, activateurs constitutifs de la voie IFN- β , fusionnés à une étiquette FLAG⁵⁵⁹ et pRSV- β gal codant pour le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous proviennent du laboratoire d'Eliane Meurs (Institut Pasteur). Les plasmides pCINeo3Flag-NS3 codant la protéine NS3 du BTV8 associée à une étiquette 3FLAG à son extrémité N-terminale⁵⁶⁰ ont tous été fournis par Damien Vitour (ANSES, Laboratoire de santé animale). Le plasmide pCR3.1-SOCS3 codant pour la protéine SOCS3⁵⁶¹ a été fourni par Christoph Auernhammer (Université Ludwig-Maximilians-Universität). Le plasmide pISRE composé du gène codant pour la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE, pIFN- β composé du gène codant pour la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur IFN- β et pCINeo3xFlag-V⁵²³ codant pour la protéine V du MV associée à une étiquette 3FLAG à son extrémité N-terminale ont été fournis par Yves Jacob (Université Paris Descartes).

B- Cellules

1- Culture cellulaire

Les cellules épithéliales humaines de rein HEK293T (293T) et les cellules humaines HeLa provenant d'un cancer du col de l'utérus ont été cultivées dans du milieu DMEM+GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100UI/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (P/S) et 1% de pyruvate (Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis) à 37°C et 5% CO₂. Les cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 ont été cultivées dans le même milieu et sérum, supplémenté avec 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA ; Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis).

2- Transfections

Les transfections de plasmides dans des cellules 293T, A549 et HeLa ont été réalisées en utilisant le réactif JetPRIME (Polyplus transfection, Strasbourg, France) selon les instructions du fabricant.

3- Stimulation des cellules à l'IFN

L'IFN-β humain utilisé pour activer la voie JAK-STAT provient de PBL (Piscataway, NJ, États-Unis). L'IFN-γ humain provient de chez PeproTech (Rocky Hill, NJ, États-Unis).

Les cellules 293T transfectées ont été stimulées avec 500UI/ml d'IFN-β pour les expériences d'immunoblot ou 1000UI/ml d'IFN-β pour les expériences d'immunofluorescence et pour les tests rapporteurs luciférase. La stimulation a été effectuée en retirant le milieu et ajoutant un nouveau milieu dans lequel l'IFN-β est dilué. La stimulation est réalisée pendant 30 minutes pour analyser l'état de phosphorylation des protéines de la voie JAK-STAT et la translocation de STAT1 dans le noyau, pendant 6h pour étudier l'expression des ISGs ou pendant 7h pour étudier l'activité du promoteur IFN-β. A la fin de la stimulation, les cellules sont soit récoltées pour l'extraction des ARNs ou des protéines, soit fixées pour analyse par immunofluorescence (IF). Pour la stimulation à l'IFN-γ, les cellules 293T ont été traitées

pendant 30 minutes avec 250ng/ μ l d'IFN- γ en diluant l'IFN dans du milieu de culture. 30 minutes plus tard, les cellules ont été récoltées pour extraction des protéines.

C- Analyse de la viabilité cellulaire

Des cellules 293T ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24h avant la transfection (7.5×10^4 cellules/puits). Après 24h ou 40h de transfection, les cellules ont été lysées et la viabilité cellulaire a été analysée en utilisant le kit CellTiter-Glo™ (Promega ; Madison, WI, États-Unis) suivant les instructions du fabricant. Ce kit est basé sur la quantification de l'ATP (Adenosine triphosphate) présent dans les cellules, qui signale la présence de cellules métaboliquement actives.

D- Tests rapporteurs luciférase

Les tests rapporteurs luciférase ont été effectués dans des cellules 293Tensemencées 24h à l'avance dans des plaques 24 puits (0.4×10^6 cellules/puits). Afin d'analyser l'effet des différents domaines sur l'activité du promoteur ISRE, les cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour la luciférase *Firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE (pISRE ; 100ng/puits), le plasmide pRSV- β gal exprimant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (50ng) et les plasmides codant pour l'ORF1 ou les différents domaines ou le vecteur vide pCINeo comme contrôle négatif ou un plasmide codant pour la protéine SOCS3 cellulaire comme contrôle positif. Après 18h de transfection, les cellules ont été traitées avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 7h. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon composé de 25mM Tris pH 7.8, 8mM MgCl₂, 0.1% Triton 100X et 15% de glycérol afin de mesurer l'activité luciférase et β -galactosidase. L'activité luciférase *Firefly* a été mesurée après avoir mélangé 50 μ l de lysat avec 50 μ l de réactif Bright-Glo (Promega; Madison, WI, États-Unis) à l'aide d'un luminomètre (EnSpire® Alpha ; Perkin Elmer, Wellesley, MA, États-Unis). L'activité β -galactosidase a été dosée par un test colorimétrique en ajoutant 50 μ l d'un tampon substrat (composé de 200mM de Na₂HPO₄ pH 7.3, 2mM de MgCl₂, 100mM de β -mercaptoéthanol et 1.33mg/ml d'ONPG (pour ortho-nitrophényl- β -galactoside)) à 50 μ l de lysat. La réaction a été quantifiée à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 450 nm (MultiSkan EX, Thermo, Waltham, MA, États-

Unis). La moyenne du ratio de l'activité luciférase sur l'activité β -galactosidase de triplicats a été calculée pour obtenir l'activité luciférase normalisée pour chaque condition testée.

E- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)

L'ARN total a été extrait des culots cellulaires en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne) en incluant une étape de digestion à la DNase I sur colonne (Qiagen ; Hilden, Allemagne). Une deuxième étape de digestion à la TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis) a ensuite été réalisée, suivie d'une étape de lavage de l'ARN sur colonne avec le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne). La transcription inverse (RT) a ensuite été réalisée avec 500ng d'ARN en utilisant l'enzyme PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc. Shiga, Japon) selon les instructions du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée sur 2 μ l d'ADNc en utilisant le kit SYBR Green Master Mix (Roche, Bâle, Suisse) avec des oligonucléotides spécifiques, décrit dans l'annexe 1. Les échantillons d'ADNc ont été dénaturés durant 15 min à 95°C, puis les séquences ciblées ont été amplifiées pendant 40 cycles de 30s à 95°C, 30s à 60°C et 30s à 72°C suivi d'une étape de refroidissement à 40°C pendant 30s en utilisant l'appareil LightCycler 96 (Roche, Bâle, Suisse). La quantification relative a été réalisée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁵⁶², le témoin cellulaire non stimulé ayant servi de calibrateur. L'ARNm de la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisée comme contrôle endogène.

F- Analyse par Immunoblot

Les cellules 293T ont été lysées dans du tampon RIPA (composé de 25mM TrisHCl pH 8.8, 50mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (respectivement Complete et PhosSTOP, Roche, Bâle, Suisse)) à 4°C pendant 30 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C et la concentration protéique du lysat cellulaire a été mesurée en utilisant le kit MicroBCA Protein assay (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis) selon les instructions du fabricant. Des quantités équivalentes de protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon Laemmli (BioRad ;

Hercules, CA, Etats-Unis) supplémenté avec 10% de β -mercaptoéthanol puis séparés sur gel de dodecyl sulphate-polyacrylamide à 10 ou 12% (SDS-PAGE).

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Proton Premium 0.45 μ M NC ; GE healthcare LifeScience, Pittsburgh, PA, Etats-Unis) en condition de transfert semi-liquide à 25V pendant 25 minutes ou liquide à 160mA pendant 1h30. Ensuite, afin d'éviter les interactions non spécifiques, une étape de blocage de la membrane est réalisée soit dans du PBS (pour *phosphate-buffered saline*) contenant 5% de lait et 0.05% de Tween-20 soit dans du TBS (pour *tris-buffered saline*) contenant 5% de BSA (pour *Bovine serum albumine*) et 0.05% de Tween-20 pendant 1h à température ambiante (TA). Chaque membrane a ensuite été incubée avec des anticorps primaires spécifiques (Tableau 1) dilués dans le tampon de blocage pendant 1h à TA ou durant la nuit à 4°C. Après lavage, la membrane a été incubée pendant 1h à TA avec un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) dans du tampon de blocage (Dako, Glostrup, Danmark, dilution 1/5000). Les protéines ont été détectées par l'ajout du substrat ECL (pour enhanced chemiluminescence ; composé de 1.25mM de Luminol (Sigma ; Saint-Louis, Missouri, États-Unis), 0.4mM d'acide p-Coumaric (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis) et 100mM de Tris pH 8.8 et 0.025% H₂O₂) et un système de détection Fusion Fx7 (Vilber Lourmat ; Marne-la-Vallée ; France). L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution	Blocage
Actine	Souris	Sigma-Aldrich (clone AC-40)	1/2500 ^{ème}	PBS-Lait
FLAG	Souris	Sigma-Aldrich (clone M2)	1/5000 ^{ème}	PBS-Lait
JAK1	Lapin	Cell signaling (6G4, 3344)	1/500 ^{ème}	TBS-BSA
PhJAK1 (Tyr1022/1023)	Lapin	Merck Millipore (07-1489)	1/500 ^{ème}	TBS-BSA
PhSTAT1 (Tyr701)	Lapin	Merck Millipore (07-307)	1/500 ^{ème}	PBS-Lait
PhSTAT2 (Tyr689)	Lapin	Merck Millipore (07-224)	1/500 ^{ème}	PBS-Lait
STAT1	Lapin	Merk Milipore (06-501)	1/1000 ^{ème}	PBS-Lait
STAT2	Lapin	Santa Cruz Biotechnology (SC-476)	1/200 ^{ème}	PBS-Lait

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunoblot.

G- Immunofluorescence (IF)

Des cellules A549 (0.25×10^6 cellules/puits), HeLa (0.2×10^6 cellules/puits) ou 293T (0.35×10^6 cellules/puits) ont étéensemencées sur des lamelles de 12-mm de diamètre dans une plaque P24 le jour précédent la transfection ou l'infection. Après 24h de transfection, les cellules ont été fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 20 minutes à TA. Les cellules ont ensuite été incubées dans du PBS contenant 50mM de chlorure d'ammonium pendant 5 minutes et perméabilisées dans du PBS contenant 0.2% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes dans du PBS contenant 0.5% de BSA pour éviter les accrochages non spécifiques et ensuite incubées avec des anticorps monoclonaux pendant 1h à TA (Tableau 2). Après trois lavages au PBS, un anticorps secondaire anti-souris couplé au DyLight 488 (vert) et/ou un anticorps secondaire anti-lapin couplé au DyLight 550 (rouge) ont été ajoutés pendant 45 minutes à TA. Les lamelles ont ensuite été lavées trois fois dans du PBS, rincées à l'eau distillée et montées sur des lames dans du milieu de montage Mowiol 4-88 (composé de 1g/ml de Glycérol et 0.4g/ml de Mowiol 4-88) contenant du DAPI ou du Hoechst. Les images ont été acquises en utilisant un microscope inversé AxioObserver Z1 (Zeiss ; Oberkochen, Allemagne) et le logiciel Zen (Zeiss ; Oberkochen, Allemagne).

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution
FLAG	Souris	Sigma-Aldrich (clone M2)	1/1000 ^{ème}
Kinectine1	Lapin	Santa Cruz Biotechnology (clone H-190)	1/200 ^{ème}
STAT1	Lapin	Merk Milipore	1/300 ^{ème}
Syntaxine6	Lapin	Ozyme (C34B2)	1/50 ^{ème}

Tableau 2. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunofluorescence.

Les anticorps secondaires DyLight 488 anti-souris et DyLight 550 anti-lapin ont été achetés chez Thermo Scientific (Waltham, MA, Etats-Unis) et ont été utilisés au 1/600^{ème}. Le 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) utilisé provient de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, Etats-Unis).

H- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests t de student avec correction de Welsh avec au moins 3 réplicats biologiques. Les valeurs-p ont été considérées comme significatives quand $p < 0.05$.

III- RESULTATS

A- Construction et expression de plasmides codant pour les différents domaines de l'ORF1

1- Expression des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 dans les cellules 293T

Afin d'étudier l'effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur le système IFN-I, nous avons tout d'abord cloné les séquences codant pour les différents domaines de l'ORF1 dans un vecteur d'expression pCINeo3Flag. Nous avons obtenus des vecteurs possédant une étiquette 3xFLAG à leur extrémité N-terminale codant pour l'ORF1 complète (pFLAG-ORF1), le domaine MetPCP (correspondant à la partie N-terminale de l'ORF1 comprenant les domaines Met, Y et PCP appelé pFLAG-MetPCP), le domaine Y (pFLAG-Y), le domaine PCP (pFLAG-PCP) et le macrodomaine X (pFLAG-X) (Figure 22A).

Afin d'évaluer l'expression des différents domaines, les plasmides construits ont été transfectés dans des cellules 293T (Figures 22 B et C). Comme le montre la figure 22B, tous les plasmides s'expriment dans les cellules 293T et les produits possèdent le poids moléculaire attendu à l'exception du domaine PCP. En effet, la bande correspondant au domaine PCP correspond à un poids moléculaire supérieur à 25 kDa alors que celui attendu est de 23 kDa. De plus, la présence d'autres bandes de tailles supérieures, à environ 35 kDa, 40 kDa et 50 kDa, suggère que la protéine pourrait subir des modifications post-traductionnelles. Enfin, l'ORF1 et le domaine MetPCP présentent, en plus de leur taille attendue, des bandes de taille inférieure, suggérant que la polyprotéine pourrait être clivée ou dégradée dans les cellules. La figure 22C permet de mieux visualiser les bandes de taille inférieure que l'on peut observer pour l'ORF1.

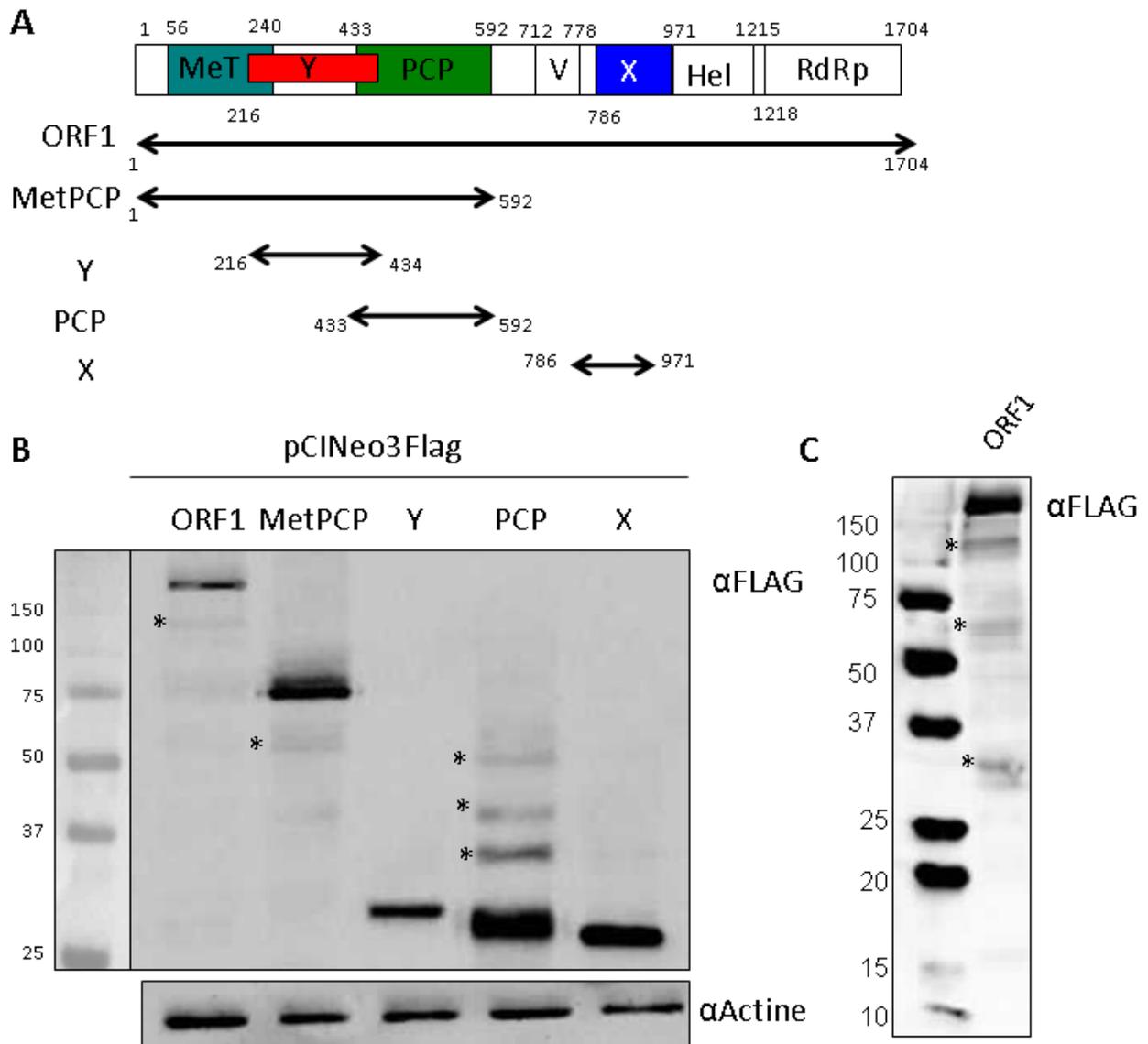


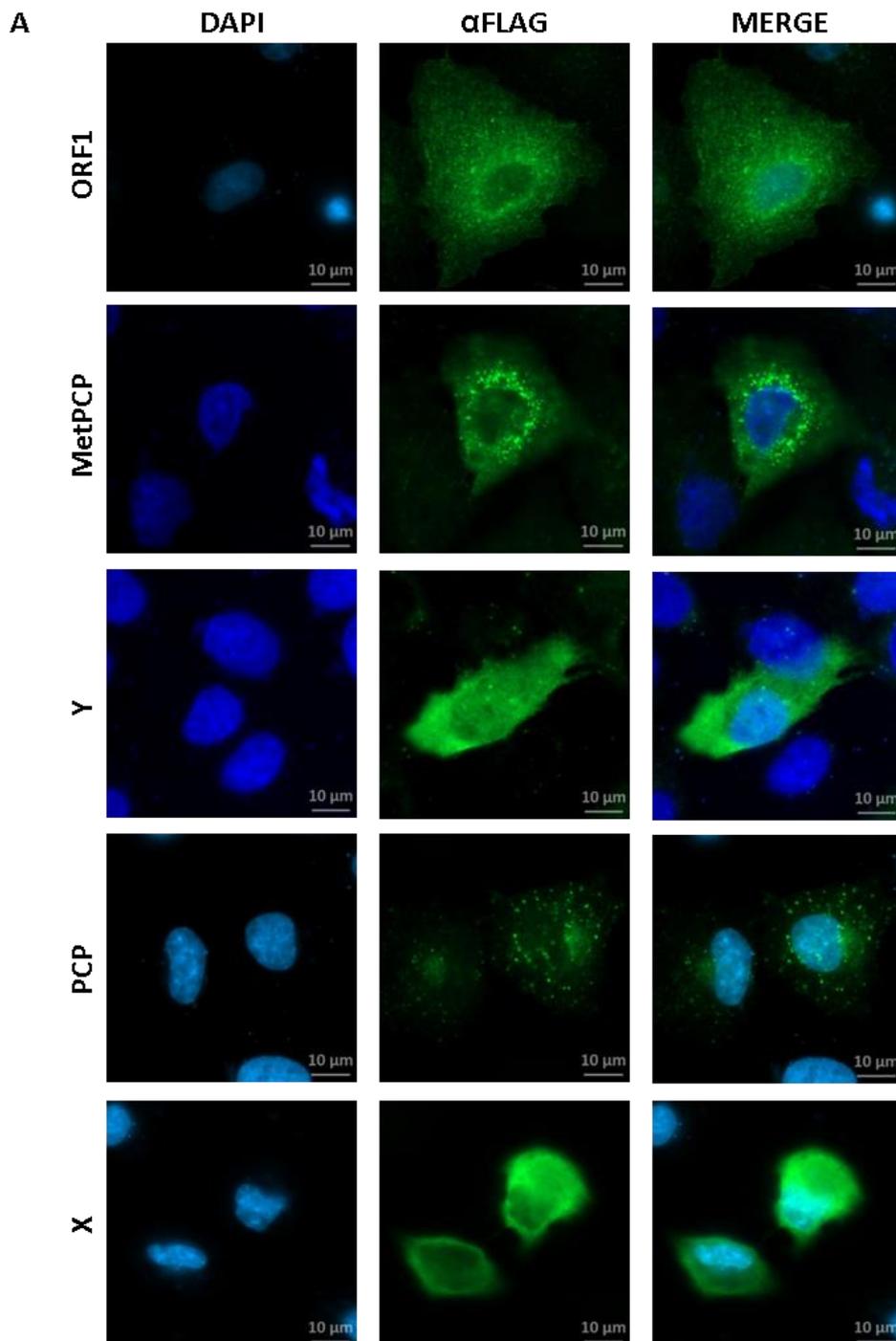
Figure 22. Construction de vecteurs d'expression codant pour l'ORF1 et ses différents domaines.

(A) Schéma de la polyprotéine ORF1 et des différentes constructions réalisées (ORF1, MetPCP, Y, PCP et X). Les nombres indiquent la position des acides aminés délimitant les domaines de l'ORF1 prédits ⁹⁹. **(B et C)** Les cellules 293T ont été transfectées avec les différents vecteurs d'expression construits. A 18h post-transfection, les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression de FLAG-ORF1 (192 kDa), FLAG-MetPCP (72 kDa), FLAG-Y (31 kDa), FLAG-PCP (23 kDa), FLAG-X (26 kDa) ou de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot.

2- Etude de la localisation sub-cellulaire de l'ORF1 et de ses différents domaines

Afin d'étudier la localisation subcellulaire de l'ORF1 et de ses différents domaines, les plasmides correspondant ont été transfectés dans des cellules A549, qui sont plus adaptées

à l'étude de la localisation de protéines par IF du fait qu'elles poussent en monocouche, adhèrent fermement aux lamelles et ont une plus grande taille comparée aux cellules 293T. Comme le montre la figure 23 A, l'ORF1 ainsi que les domaines MetPCP et PCP fusionnés à une étiquette FLAG présentent une localisation ponctiforme dans le cytoplasme des cellules. Au contraire, les domaines X et Y présentent une localisation diffuse. Cela suggère que l'ORF1 complète, le domaine MetPCP et le domaine PCP ont une localisation dans des compartiments cellulaires spécifiques de la cellule.



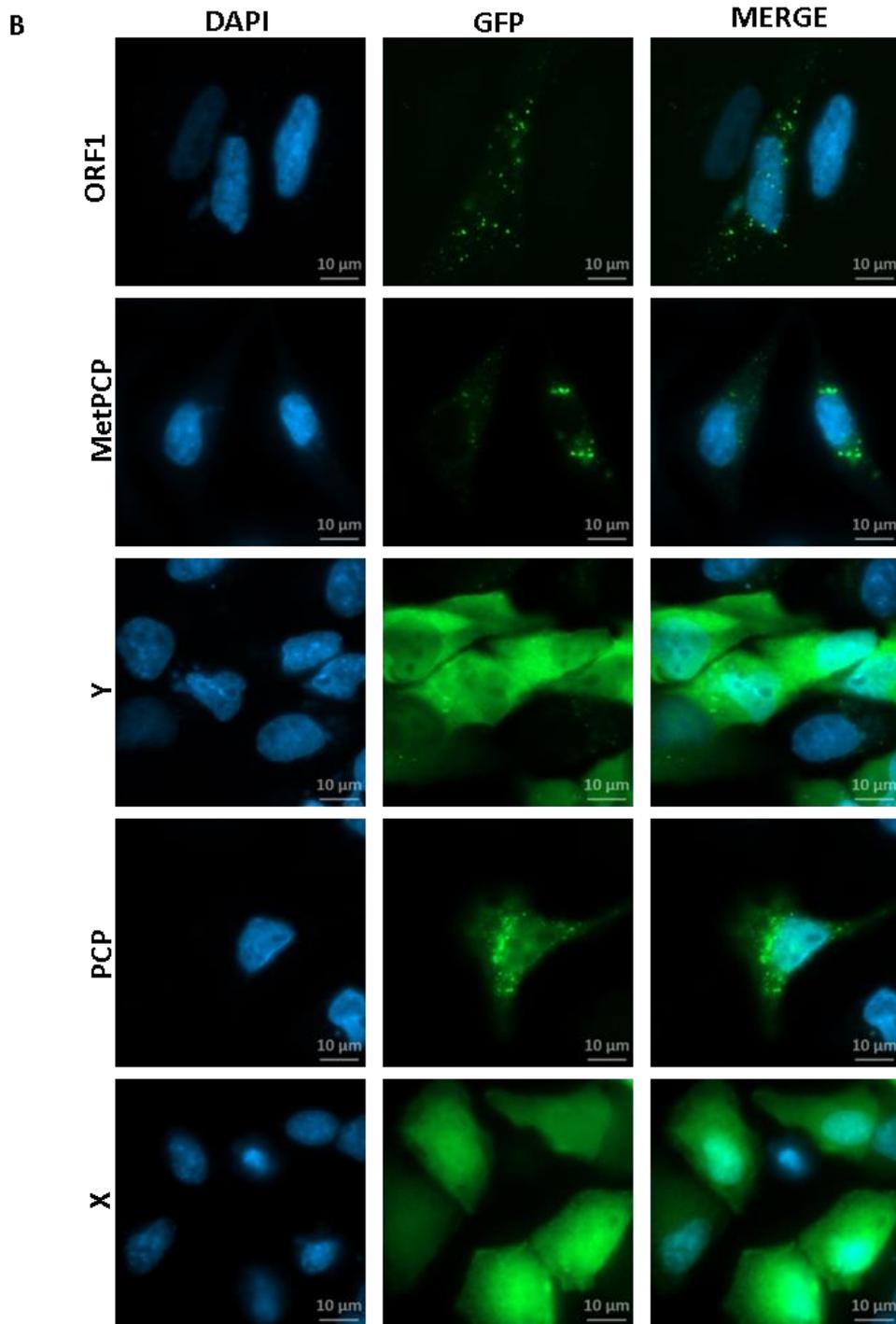


Figure 23. L'ORF1 et les domaines PCP et MetPCP présentent une localisation ponctiforme dans la cellule.

La localisation des protéines a été étudiée par microscopie à fluorescence. Les cellules A549 ont été transfectées avec 250ng de pFLAG-ORF1, pFLAG-MetPCP, pFLAG-Y, pFLAG-PCP, pFLAG-X (A) et pEGFP-ORF1, pEGFP-MetPCP, pEGFP-Y, pEGFP-PCP, pEGFP-X (B) pendant 8h. Après fixation, les cellules exprimant les différentes protéines ayant une étiquette FLAG ont été incubées avec un anticorps anti-FLAG de souris, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 488 (vert). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les protéines présentant une étiquette FLAG, des vecteurs d'expression codant pour les différents domaines fusionnés à une étiquette eGFP (pour *enhanced green fluorescent protein*) à leur extrémité N-terminale ont été également générés. Nous avons obtenu des plasmides codant pour la protéine ORF1 complète (pEGFP-ORF1), le domaine MetPCP (pEGFP-MetPCP), le domaine Y (pEGFP-Y), le domaine PCP (pEGFP-PCP) et le domaine X (pEGFP-X). Comme le montre la figure 23B, l'ORF1 ainsi que ses différents domaines présentent la même localisation que celle observée avec les plasmides possédant une étiquette FLAG, confirmant ainsi les résultats de localisation subcellulaire précédemment obtenus.

Afin de déterminer plus précisément la localisation des domaines PCP et MetPCP dans la cellule, des expériences de co-marquage ont été réalisées dans des cellules HeLa, qui sont également de grandes cellules permettant d'étudier la localisation subcellulaire des protéines par IF. Elles permettent une meilleure expression des protéines par rapport aux cellules A549. Les co-marquages ont été réalisés en utilisant un anticorps anti-Kinectine pour marquer le RE et un anticorps anti-Syntaxine-6 pour marquer l'appareil de Golgi. Comme le montre la figure 24, le domaine MetPCP semble colocaliser avec la kinectine, suggérant que ce domaine est localisé dans le RE ou dans une structure proche. De plus, le domaine MetPCP entraîne un changement de localisation de la kinectine par rapport à sa localisation dans les cellules non transfectées (Figure 24A haut). Le domaine PCP semble également être localisé au niveau du RE sans entraîner de re-localisation de la kinectine (Figure 24A bas). Au contraire, aucun des domaines n'est localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 24B).

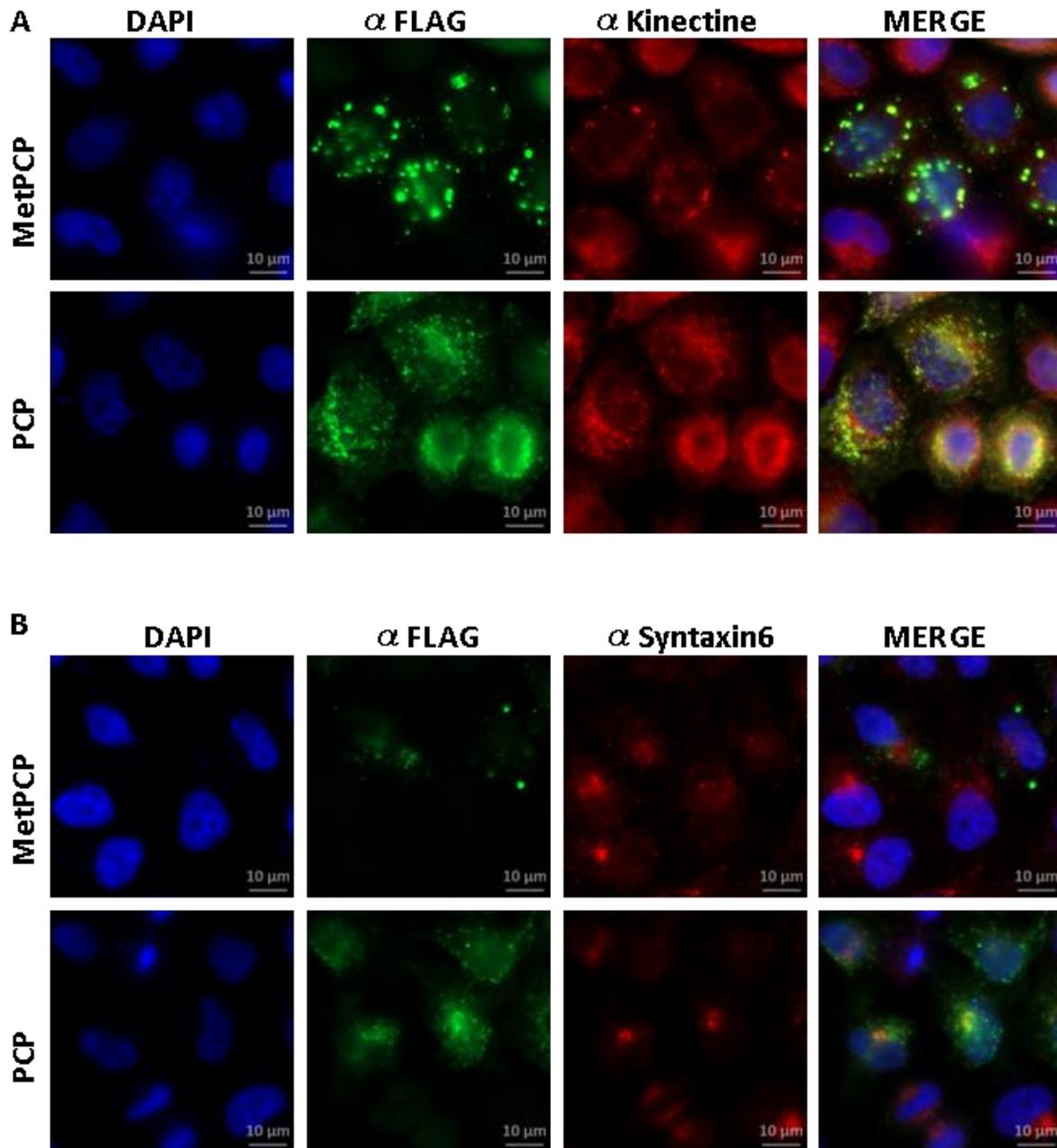


Figure 24. Les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 sont localisés au niveau du RE ou dans des structures proches.

La co-localisation des domaines de l'ORF1 avec des marqueurs cellulaires a été étudiée par microscopie à fluorescence. Des cellules HeLa ont été transfectées avec pFLAG-MetPCP et pFLAG-PCP (500ng) pendant 18h. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-FLAG de souris et un anticorps anti-Kinectine de lapin **(A)** ou un anticorps anti-Syntaxine6 de lapin **(B)**, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire respectivement conjugué à une molécule DyLight 488 (vert) et DyLight 550 (rouge). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

3- Etude de l'impact de l'expression de l'ORF1 et de ses différents domaines sur la viabilité cellulaire

Avant d'étudier l'impact de l'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines sur les voies de signalisation de l'IFN-I, nous avons souhaité vérifier si l'ORF1 ou ses différents domaines avaient un effet sur la viabilité cellulaire afin de ne pas induire de biais dans nos expériences. Dans ce but, des cellules 293T ont été transfectées avec les différents plasmides et la viabilité cellulaire a été analysée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Comme le montre la figure 25, ni l'expression de l'ORF1 ni celle des différents domaines n'a d'effet sur la viabilité cellulaire dans les cellules 293T.

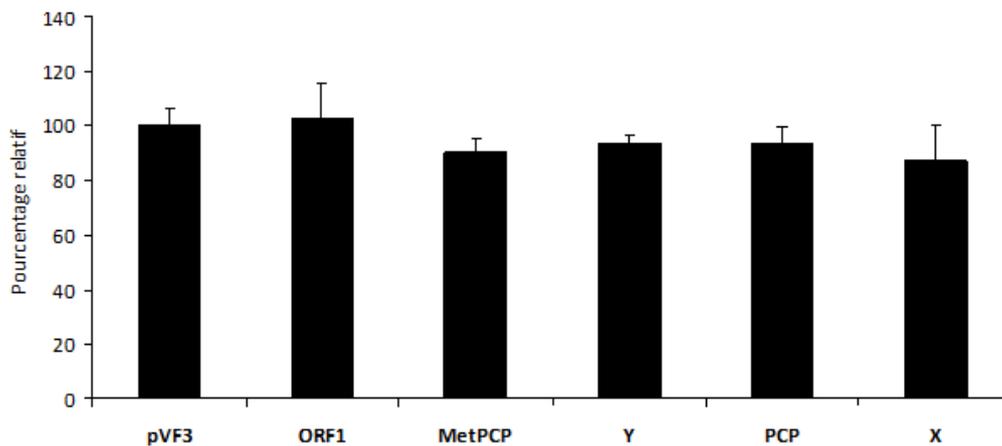


Figure 25. L'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire.

Des cellules 293T ont été transfectées avec 100ng des plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines. Les cellules ont été lysées 24h post-transfection et la viabilité cellulaire a été étudiée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Les résultats sont représentés en pourcentage relatif par rapport au contrôle transfecté avec le vecteur vide pCINeo3Flag (pVF₃). L'expérience a été reproduite 2 fois indépendamment et les barres d'erreurs représentent les moyennes de triplicats d'une expérience.

B- Etude de la capacité de l'ORF1 du HEV à moduler la voie de réponse à l'IFN-I

1- Effet de l'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines sur l'activité du promoteur ISRE

Afin d'évaluer la capacité de l'ORF1 et de ses différents domaines à moduler l'activation du promoteur ISRE, des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène de la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE, un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase pour normaliser les résultats et les plasmides codant pour l'ORF1 ou ces différents domaines. Un plasmide codant pour la protéine SOCS3 a été utilisé comme contrôle positif car cette protéine cellulaire inhibe la voie de signalisation IFN-I⁵⁶³ et le vecteur vide pCINeo (pV) ainsi qu'un plasmide codant pour la protéine VP2 du BTV (qui n'a pas d'effet sur cette voie de signalisation ; résultats du laboratoire, non publié) ont été utilisés comme contrôles négatifs. Après 18h de transfection, les cellules ont été traitées avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h afin de stimuler la voie de signalisation JAK-STAT. Les analyses statistiques ont été réalisées en comparaison des résultats obtenus avec le vecteur vide (pV). Comme le montre la figure 26, le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe l'activation du promoteur ISRE de manière statistiquement significative, suggérant un effet modulateur du domaine MetPCP sur la voie JAK-STAT. Au contraire, l'ORF1 complète, le domaine Y, le domaine PCP et le domaine X n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'activation du promoteur ISRE.

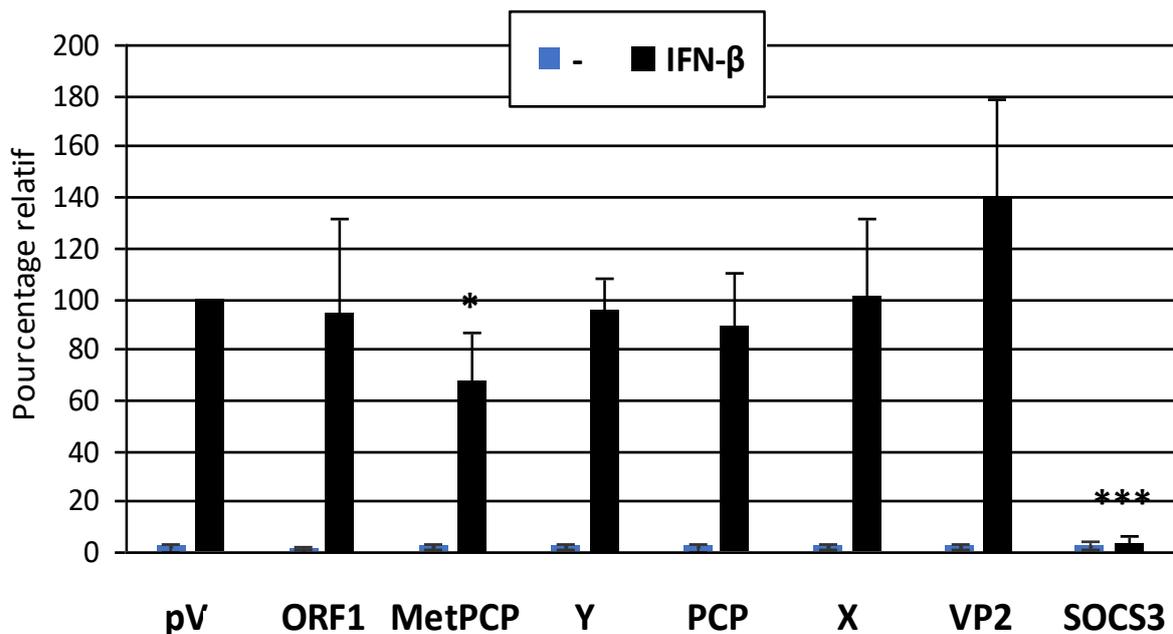


Figure 26. Effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur l'activation du promoteur ISRE. Des cellules 293T ont été transfectées avec pISRE (100ng), pRSV-βgal (50ng) et le plasmide vide (pV) ou un plasmide codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines, ou un plasmide codant pour la protéine SOCS3 cellulaire (250ng). Les résultats représentent les moyennes de quatre expériences indépendantes, chaque expérience étant réalisée en triplicat. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au vecteur vide traité à l'IFN-β pV. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle traitée à l'IFN-β (pV). *, $p < 0.05$; *** < 0.0005 (test t de Student avec la correction de Welsh).

2- Construction de vecteurs d'expression codant pour différents fragments du domaine MetPCP

Afin de déterminer si l'effet du domaine MetPCP sur l'activation du promoteur ISRE viendrait du domaine complet ou d'un sous domaine de MetPCP, nous avons cloné les domaines Met, YPCP et MetY dans des vecteurs pCINeo3xFlag (Figure 27A). Nous avons ensuite transfecté des cellules 293T avec ces plasmides exprimant les différents domaines construits pFLAG-Met, pFLAG-MetY et pFLAG-YPCP et nous avons analysé leur expression par immunoblot. Toutes les constructions s'expriment aux tailles attendues dans les cellules 293T (Figure 27B). Nous avons ensuite effectué un test rapporteur luciférase afin de déterminer si les domaines Met, MetY ou YPCP inhibent l'activation du promoteur ISRE. Comme le montre la figure 27C,

ni le domaine Met seul, ni le domaine YPCP et ni le domaine MetY n'ont d'effet sur l'activation du promoteur ISRE.

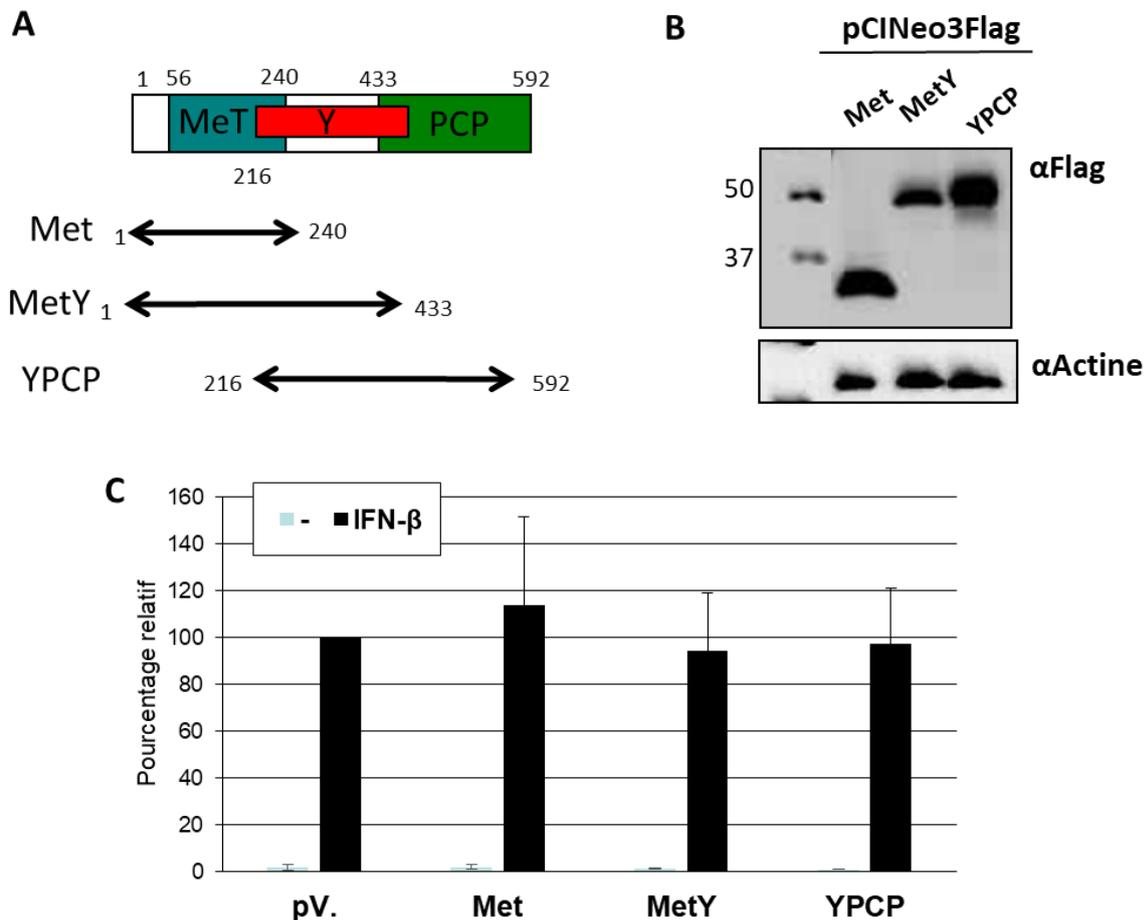


Figure 27. Construction de vecteurs d'expression codant pour les différents domaines du MetPCP et étude de leur effet sur l'activation du promoteur ISRE.

(A) Schéma du domaine MetPCP et des différentes constructions réalisées (Met, MetY et YPCP). (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec les différents vecteurs d'expression construits. A 18h post-transfection, les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression de FLAG-Met (24 kDa), FLAG-MetY (48 kDa), FLAG-YPCP (47 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. (C) Des cellules 293T ont été transfectées avec pISRE (100ng), pRSV-βgal (50ng) et le plasmide vide (pV) ou les plasmides les différents domaines Met, MetY, YPCP (250ng). Les résultats représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, chaque expérience étant réalisée en triplicat. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au vecteur vide pV traité à l'IFN-β. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle traitée à l'IFN-β (pV). *, p<0.05 (test t de Student avec la correction de Welsh).

3- *Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la synthèse de certains ISGs*

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les tests rapporteurs luciférase ISRE, nous avons analysé l'expression des ARNm codant pour certains ISGs par RT-PCRq après transfection d'un plasmide codant pour le domaine MetPCP. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide pVF₃ comme contrôle négatif, les plasmides codant pour les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 et un plasmide codant pour la protéine V du MV comme contrôle positif. En effet, cette protéine inhibe la voie de signalisation JAK-STAT. La protéine V se lie à JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1^{523,524}. De plus, elle interagit également directement avec STAT1, STAT2, IRF9^{523,525-528} et TYK2 pour bloquer la phosphorylation de ce dernier⁵²⁹. Après 40h de transfection, les cellules ont été traitées avec 500UI/ml d'IFN-β pendant 6h afin de stimuler la voie JAK-STAT et d'induire l'expression de différents ISGs. Une analyse par RT-PCRq a permis de montrer que l'expression des ARNm codant pour OAS1, MDA5 et l'ISG56 est diminuée dans les cellules exprimant le domaine MetPCP mais pas le domaine PCP (Figures 28B/C/D). Dans cette expérience, les cellules ont été analysées 40h après la transfection au lieu de 24h afin d'obtenir une expression plus forte des domaines transfectés et de pouvoir détecter une inhibition potentielle de l'expression d'ISGs par les domaines d'intérêt. Nous avons vérifié l'absence de toxicité de la transfection et de l'expression des protéines d'intérêt au bout de 40h. Comme le montre la figure 28A, les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire au bout de 40h de transfection. Ces résultats confirment l'effet inhibiteur du domaine MetPCP sur le promoteur ISRE observé par tests rapporteurs luciférase.

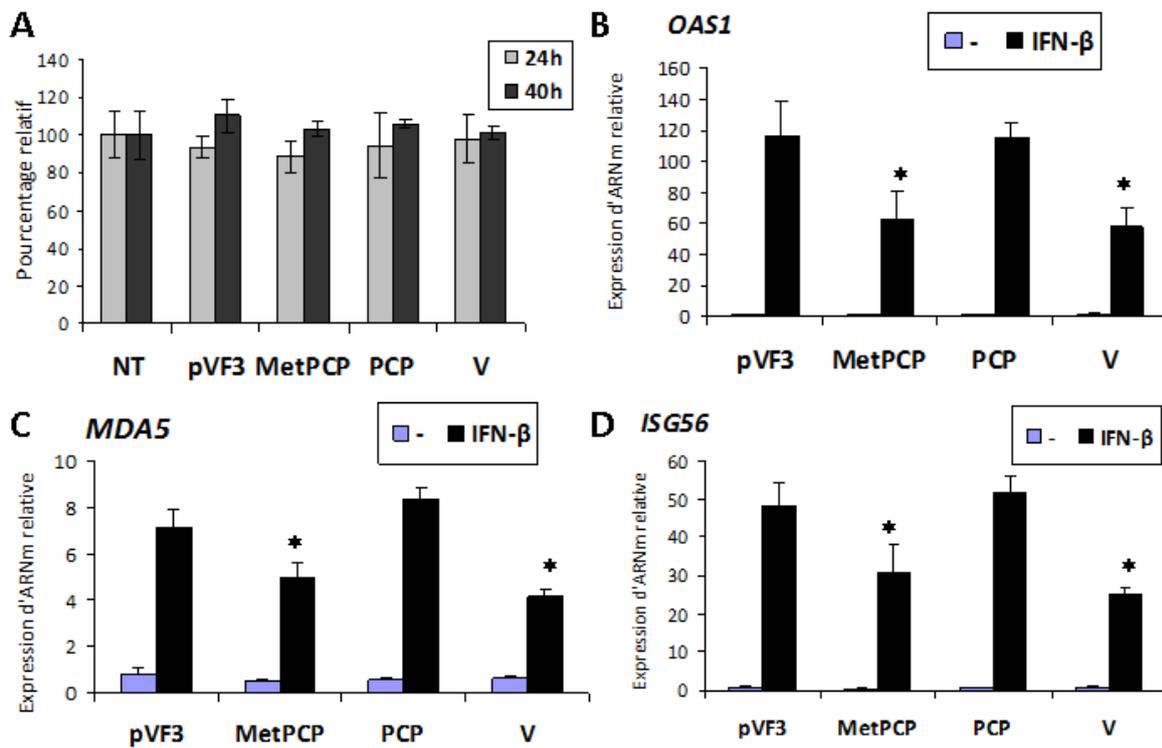


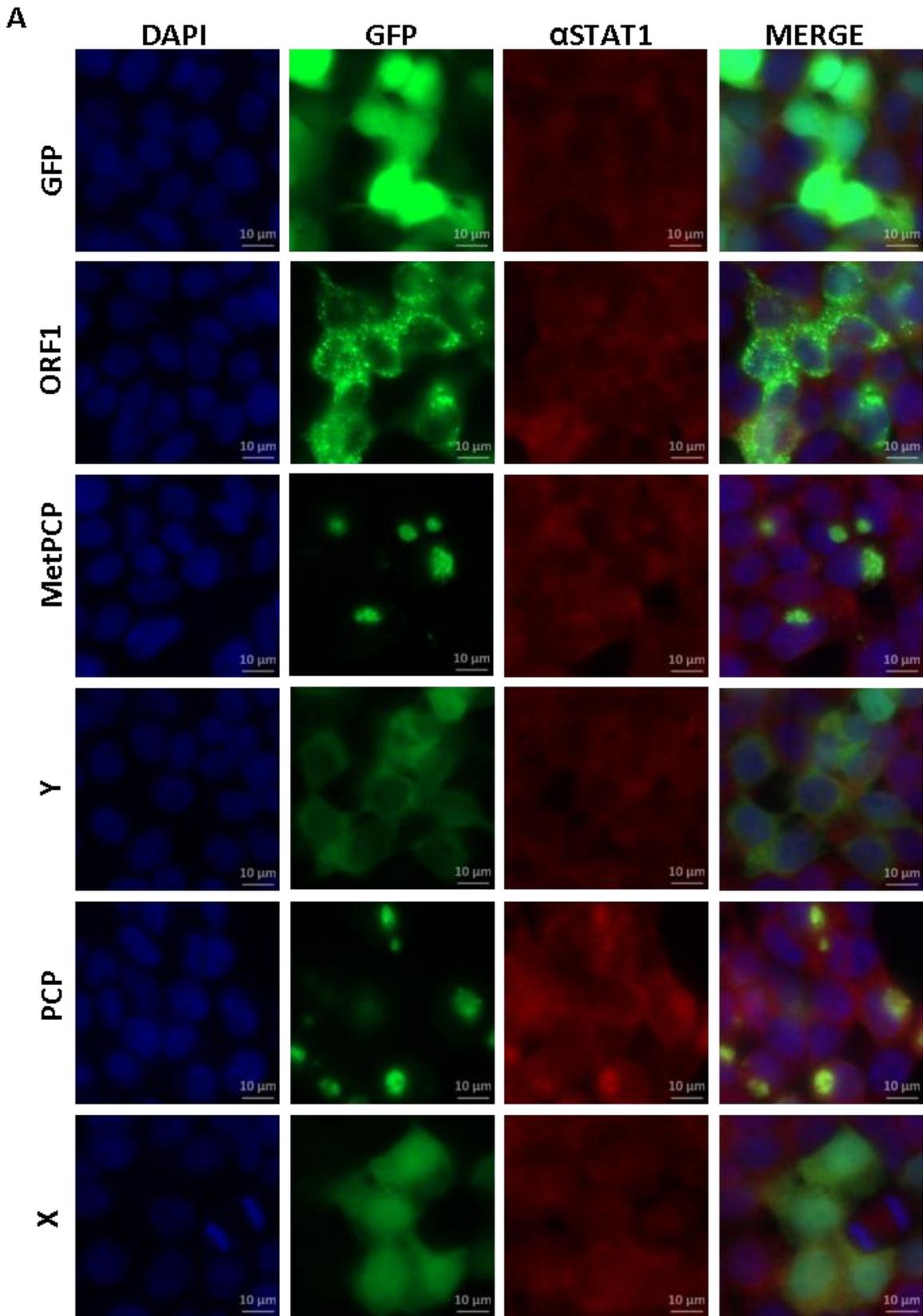
Figure 28. Le domaine MetPCP inhibe l'expression de certains ISGs.

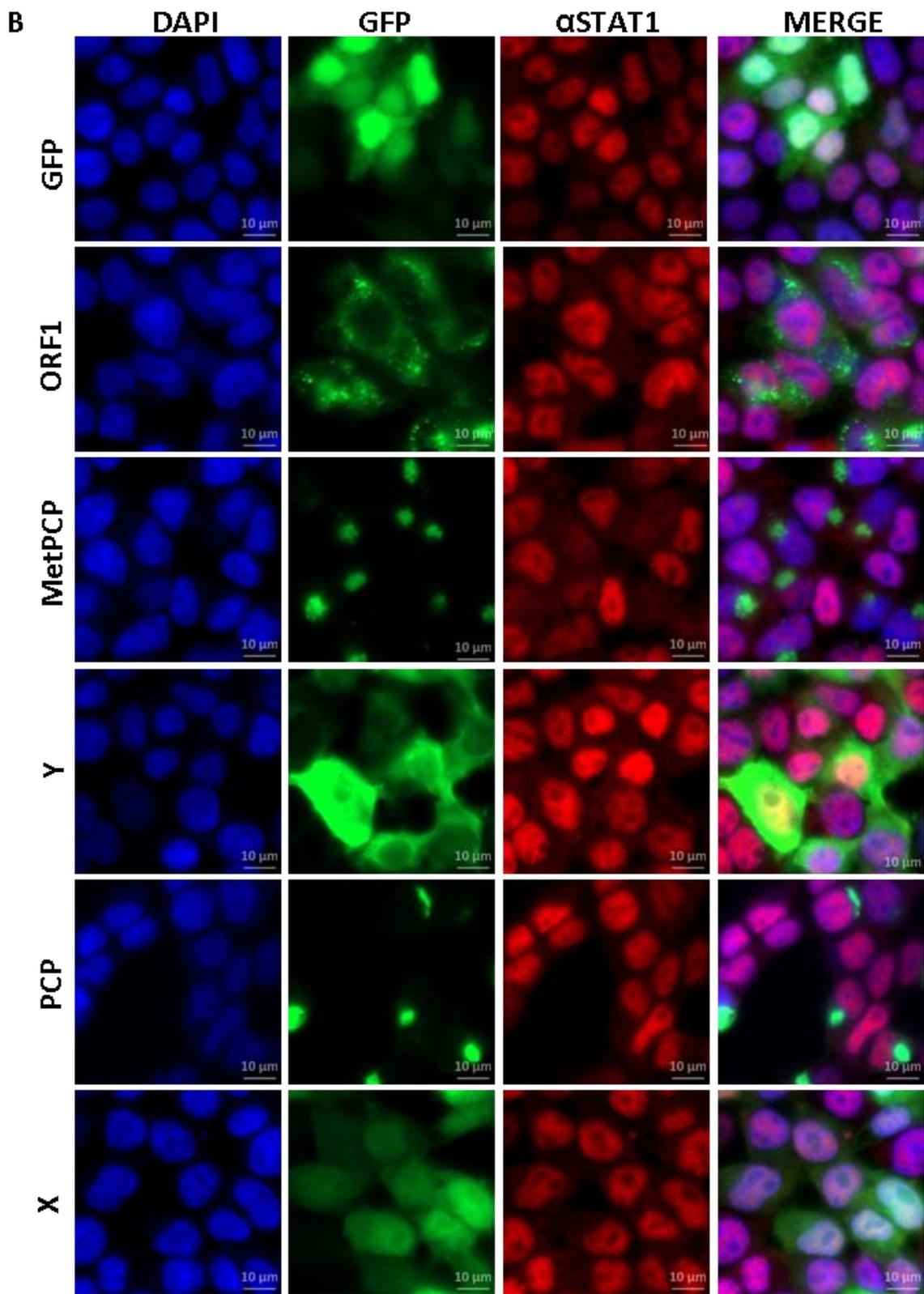
(A) Test de viabilité cellulaire à 24h et 40h post transfection. Les cellules 293T ont été transfectées ou non (NT=non transfecté) avec 100ng du vecteur vide 3Flag (pVF₃), et les plasmides codant pour FLAG-PCP et FLAG-MetPCP ou le plasmide codant pour la protéine V du MV associée à une étiquette 3Flag pFLAG-V. Après 24h ou 40h de transfection, les cellules ont été lysées et la viabilité cellulaire a été étudiée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Les résultats sont représentés en pourcentage relatif par rapport au contrôle non transfecté (NT). L'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment et les barres d'erreurs représentent les moyennes de triplicats d'une expérience. (B ; C et D) Des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3Flag (pVF₃), un plasmide codant pour la protéine V du MV ou les plasmides codant pour les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 du HEV (2µg). A 40h post-transfection, les cellules ont été stimulées pendant 6h avec 500UI/ml d'IFN-β. Après extraction des ARNs totaux, l'expression des ARN codant pour OAS1 (B), MDA5 (C) et l'ISG56 (D) a été mesurée par RT-PCRq. GAPDH a été utilisée comme gène de référence endogène. Les résultats représentent la moyenne de triplicats biologiques et de duplicats techniques d'une expérience. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle (pVF₃). *, p<0.05 (test t de Student avec la correction de Welsh).

4- Le domaine MetPCP de l'ORF1 bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau

Ensuite, afin de déterminer si le blocage de la voie de signalisation de JAK/STAT, par le domaine MetPCP, a lieu en amont ou en aval de la translocation de STAT1 dans le noyau, des

expériences d'immunofluorescence ont été réalisées après stimulation par l'IFN- β . Nous avons transfecté des cellules 293T avec les plasmides codant pour l'ORF1 ou les différents domaines fusionnés à une étiquette EGFP à leur extrémité N-terminale ou le plasmide codant pour l'EGFP seule (pEGFP-C1) comme contrôle négatif. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées pendant 30 minutes avec 1000UI/ml d'IFN- β afin d'induire la translocation de STAT1 dans le noyau. Comme le montre la figure 29, le domaine MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau mais pas dans toutes les cellules exprimant le domaine. En effet, 50% des cellules qui expriment le domaine MetPCP présentent une localisation de STAT1 inchangée comparé au contrôle (Figures 29B et C). Pour les cellules qui expriment l'ORF1 complète ou le domaine PCP, on observe une translocation de STAT1 dans 70% des cellules comptées alors que pour les cellules qui expriment la protéine GFP seule, le domaine X et le domaine Y, la translocation de STAT1 dans le noyau est observée pour 90% des cellules. Ces résultats montrent que le domaine MetPCP est capable d'interférer avec l'entrée de STAT1 dans le noyau, c'est-à-dire qu'il bloquerait la voie de signalisation soit au niveau de l'entrée de STAT1, soit plus en amont dans la voie de signalisation.





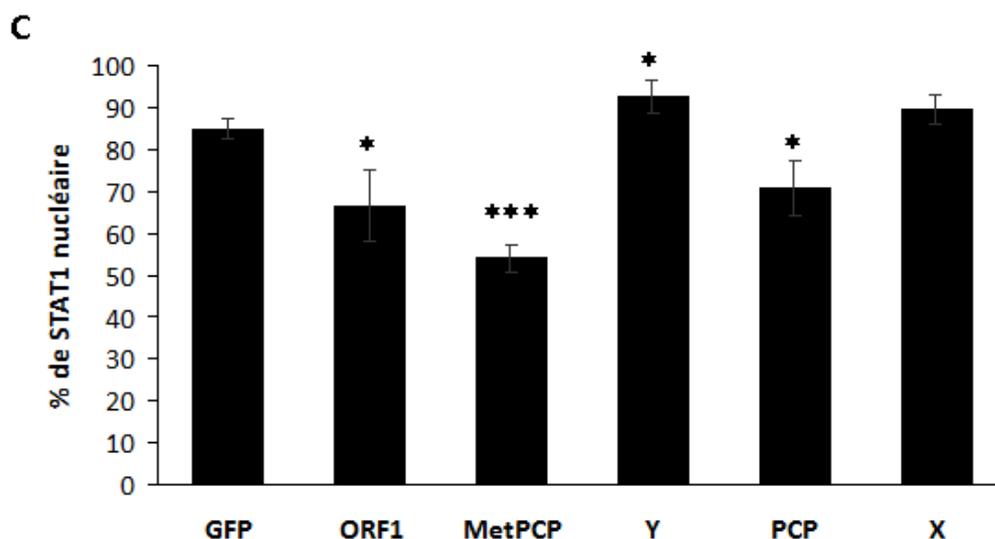
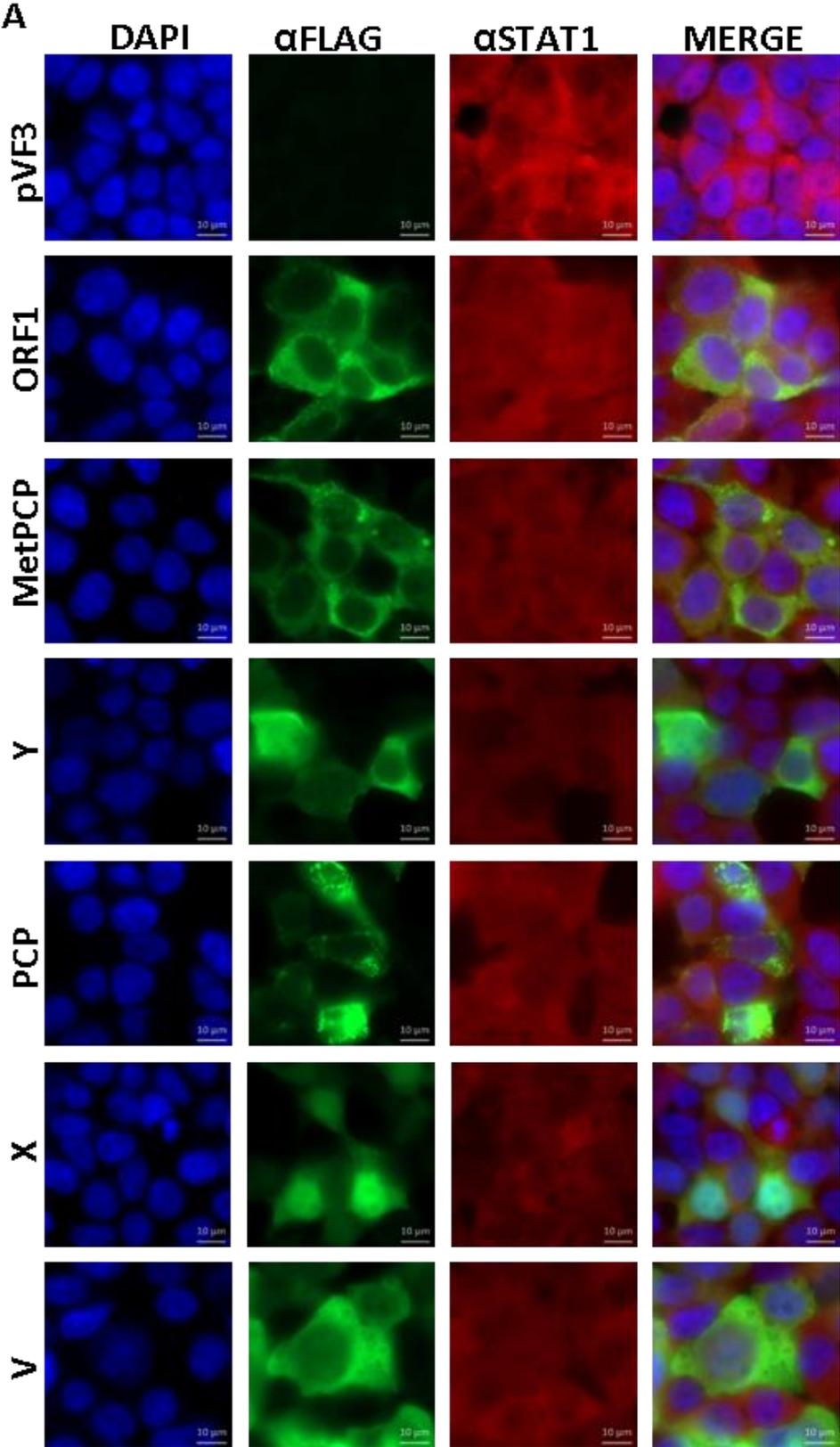


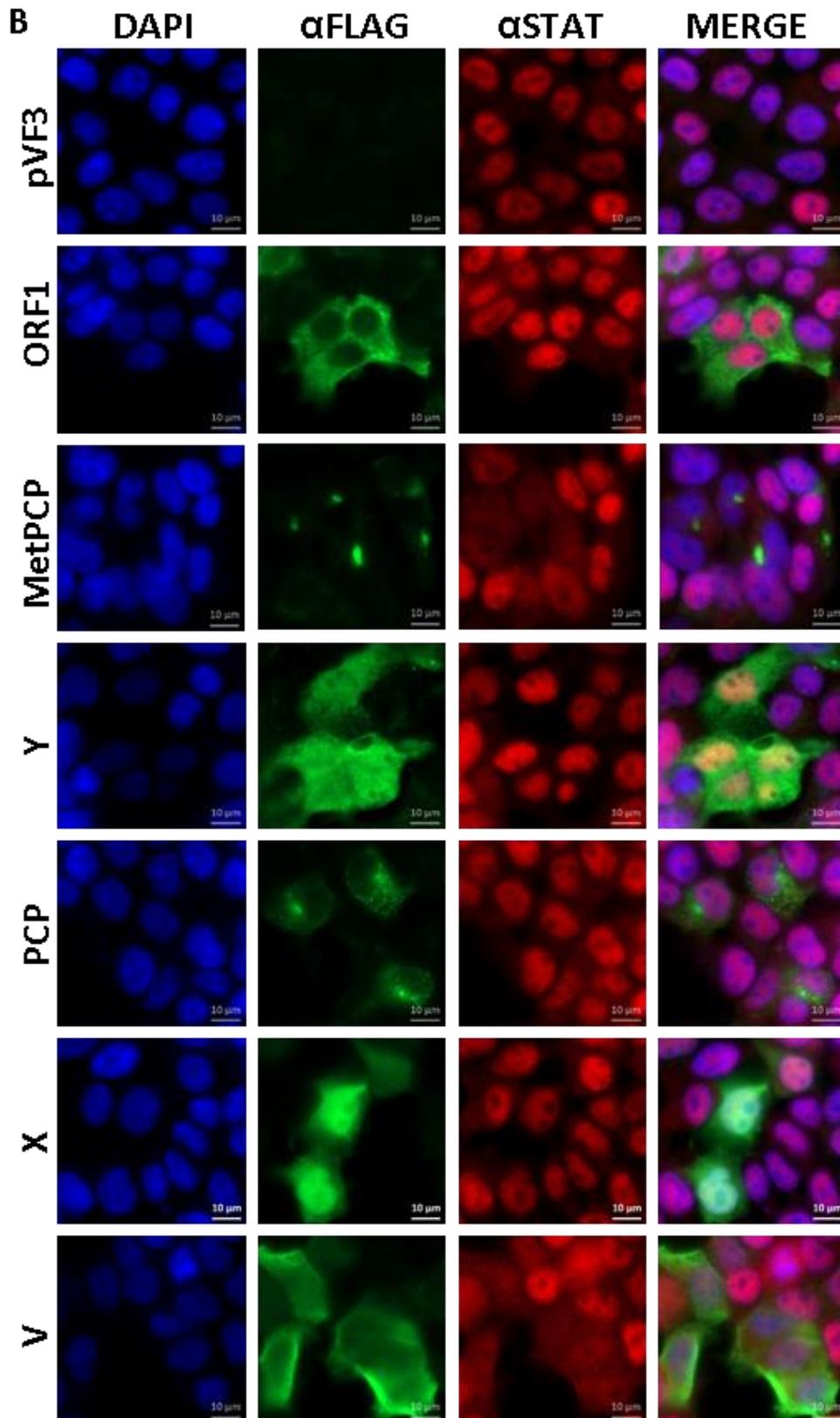
Figure 29. Le domaine GFP-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.

Les plasmides codant pour la GFP, GFP-ORF1, GFP-MetPCP, GFP-Y, GFP-PCP et GFP-X ont été transfectés dans des cellules 293T. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées (B) ou non (A) avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-STAT1, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 550 (rouge). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630). Entre 100 et 200 cellules ont été comptées dans 10 champs par expérience et l'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment. (C) Moyennes des comptages des trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (GFP). * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

Ces résultats ont été confirmés avec les plasmides codant pour les différents domaines associés à une étiquette FLAG. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines associés à l'étiquette FLAG ou avec le plasmide pCINeo3Flag comme contrôle négatif ou le plasmide codant pour la protéine V du MV pFLAG-V comme contrôle positif. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées pendant 30 minutes avec 1000UI/ml d'IFN- β afin d'induire la translocation de STAT1 dans le noyau. Comme le montre la figure 30, le domaine FLAG-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau. En effet, après transfection du plasmide exprimant MetPCP, STAT1 est localisé dans le noyau dans environ 65% des cellules exprimant le domaine. Après transfection de la protéine V du MV, qui sert ici de contrôle positif, 40% des cellules présentent une localisation de STAT1 nucléaire (Figure 30 B et C). Au contraire, après

transfection du vecteur vide pVF₃, des plasmides exprimant l'ORF1, le domaine PCP, le domaine Y ou le domaine X, 90% des cellules expriment STAT1 au niveau du noyau.





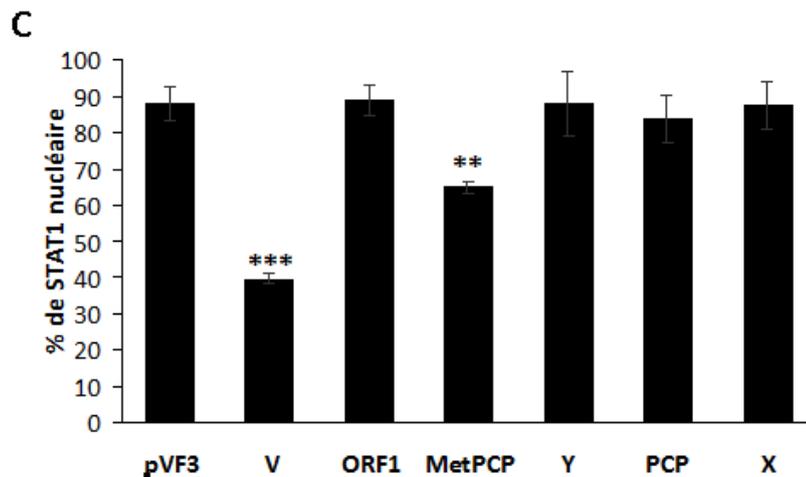


Figure 30. Le domaine FLAG-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.

Le plasmide vide pVF3 et les plasmides codant pour FLAG-ORF1, FLAG-MetPCP, FLAG-Y, FLAG-PCP et FLAG-V ont été transfectés dans des cellules 293T. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées (**B**) ou non (**A**) avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-STAT1 de lapin et anti-FLAG de souris, suivi par une incubation avec des anticorps secondaires respectivement conjugués à une molécule DyLight 550 (rouge) anti-lapin ou à une molécule DyLight 488 (vert) anti-souris. Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630). Entre 50 et 400 cellules ont été comptées dans 10 à 14 champs par expérience et l'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment. (**C**) Moyennes des comptages des trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (pVF3). **p<0.005 ; ***p<0.0005.

5- Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1

Afin de déterminer si le blocage de la voie de signalisation JAK-STAT par le domaine MetPCP a lieu au niveau de la translocation de STAT1 ou en amont, l'état de phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 a été étudié. En effet, l'étape de phosphorylation de STAT1 et STAT2 est nécessaire à leur translocation nucléaire après stimulation par l'IFN- β . Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour le domaine MetPCP ou le domaine PCP ou avec le vecteur vide 3Flag (pVF3) comme contrôle négatif ou avec un plasmide codant pour la protéine V du MV comme contrôle positif, car cette protéine inhibe la phosphorylation de STAT1 et de STAT2 ^{523,525}. Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées avec 500UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes et les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot (Figure 31). Comme attendu, la protéine V du MV inhibe la

phosphorylation de STAT1 et de STAT2. Le domaine PCP, pour lequel aucun effet inhibiteur n'a été détecté sur l'activité du promoteur ISRE, n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 et de STAT2. Au contraire, le domaine MetPCP induit une diminution de l'expression de la forme phosphorylée de STAT1 mais pas de la forme phosphorylée de STAT2. La quantité totale de STAT1 n'est pas modifiée, suggérant que MetPCP n'inhibe pas l'expression de STAT1 ni n'entraîne sa dégradation. L'inhibition est donc spécifique de l'étape de phosphorylation de STAT1, suggérant que l'activité inhibitrice du domaine MetPCP a lieu au niveau de STAT1 ou plus en amont dans la voie, par exemple au niveau des protéines JAK1 et TYK2, qui sont les protéines qui phosphorylent STAT1 et STAT2.

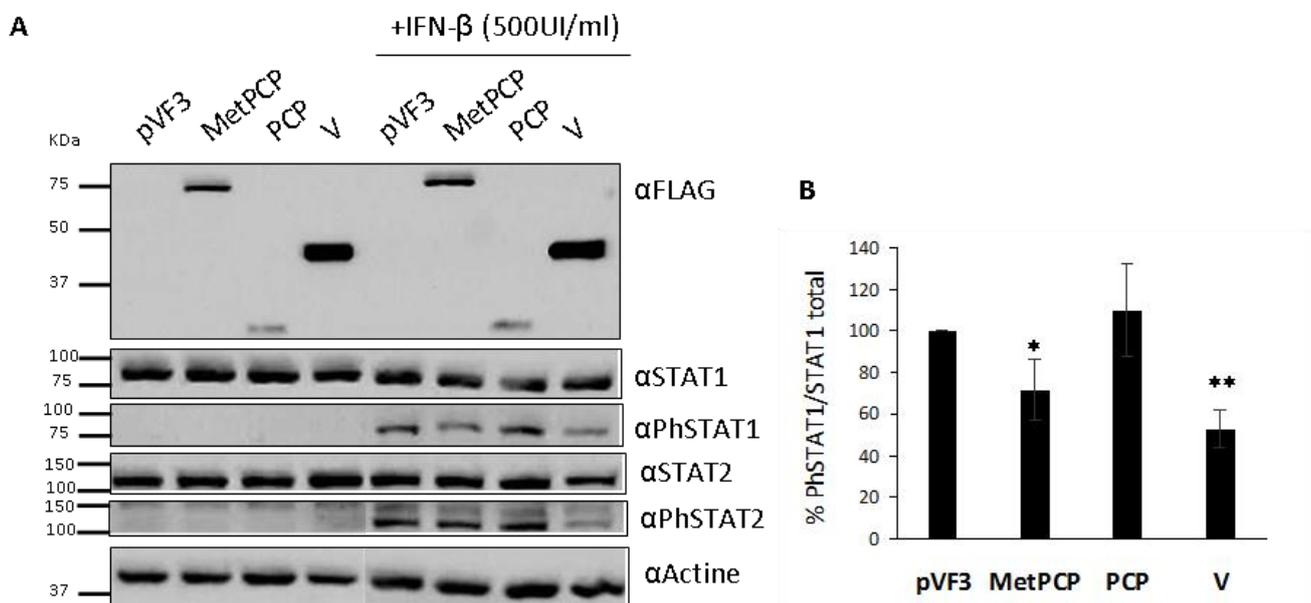


Figure 31. Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1.

(A) Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3F (pVF3), ou un plasmide codant pour la protéine V du MV ou les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 du HEV-3 (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines fusionnées à une étiquette FLAG, de STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa), STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. Les résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée quatre fois indépendamment. **(B)** L'intensité des bandes de quatre expériences indépendantes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et la quantité relative mesurée pour PhSTAT1 a été divisée par celle obtenue pour STAT1 totale. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle pVF3. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (pVF3). *p<0.05 ; **p<0.005.

6- Le domaine MetPCP de l'ORF1 n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1

La phosphorylation de STAT1 nécessite en amont la phosphorylation des protéines TYK2 et JAK1. Ainsi, afin de déterminer si l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par MetPCP a lieu au niveau de STAT1 ou plus en amont au niveau de la phosphorylation des protéines TYK2 et JAK1, la phosphorylation de ces dernières a été évaluée par immunoblot. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide pVF₃ comme contrôle négatif, ou un plasmide codant pour le domaine MetPCP ou le domaine PCP ou la protéine V du MV. Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β avant de les lyser. Les lysats ont été analysés par immunoblot. Comme le montre la figure 32, le domaine MetPCP n'a pas d'effet sur le niveau de phosphorylation de JAK1 alors qu'elle inhibe bien la phosphorylation de STAT1. Du fait d'un bruit de fond important sur les immunoblots et d'une faible expression de TYK2, nous n'avons pas été en mesure de conclure sur l'état de phosphorylation de la protéine TYK2 dans ces expériences.

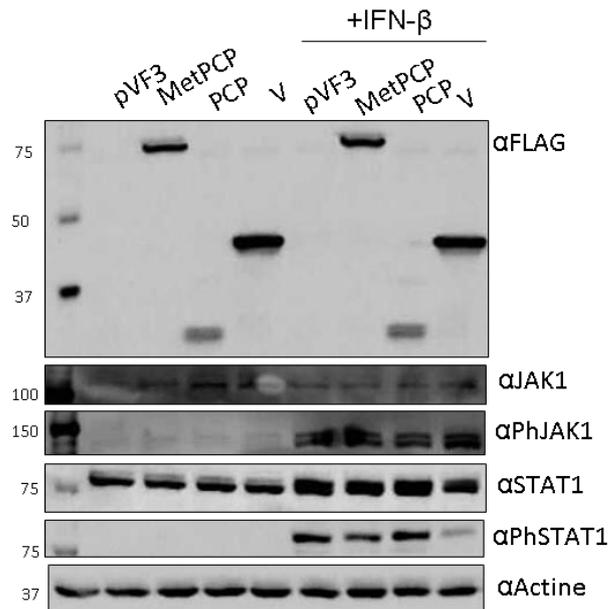


Figure 32. Le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1.

Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3Flag (pVF₃), les plasmides codant pour la protéine V du MV ou les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 du HEV (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines fusionnées à une étiquette FLAG, de JAK1 (130 kDa), PhJAK1 (130 kDa), STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa) STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. L'expérience est représentative de deux expériences réalisées de manière indépendante.

7- L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β

L'activation de l'IFNGR induit la phosphorylation de STAT1 qui va s'homodimeriser pour activer l'expression de certains ISGs. Afin de déterminer si l'inhibition de STAT1 est spécifique de la réponse IFN- β ou si le domaine MetPCP est capable d'inhiber la phosphorylation de STAT1 également après stimulation de la voie de réponse à l'IFN- γ , nous avons transfecté des cellules avec les plasmides codant pour le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV, ou avec le vecteur vide pVF3 comme témoin négatif ou avec un plasmide codant pour la protéine V du MV comme témoin positif de l'inhibition de la voie de réponse à l'IFN- β . Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées avec 250ng/ μ l d'IFN- γ ou 500UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes pour induire la phosphorylation des protéines STAT. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par immunoblot. Comme observé précédemment, le domaine MetPCP de l'ORF1, comme la protéine V du MV inhibent la phosphorylation de STAT1 après stimulation avec l'IFN- β . Au contraire, le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 après stimulation avec l'IFN- γ , suggérant que l'inhibition serait spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β (Figure 33).

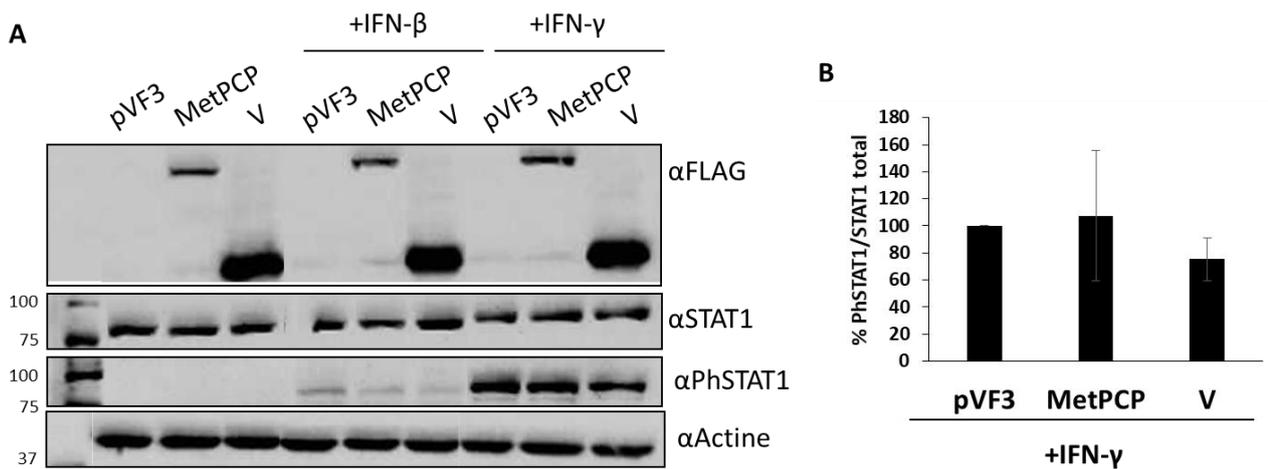


Figure 33. L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β .

(A) Des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3F (pVF3), un plasmide codant pour la protéine V du MV ou le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β ou 250ng/ μ l d'IFN- γ . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines-FLAG, de STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa) STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. L'expérience est représentative de trois expériences réalisées de manière indépendantes. **(B)** L'intensité des bandes de trois expériences indépendantes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et la quantité relative mesurée pour PhSTAT1 a été divisée par celle obtenue pour STAT1 totale. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle pVF3.

IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ORF1 du HEV code pour une polyprotéine pour laquelle différents domaines non-structuraux ont été décrits, notamment un domaine Met, un domaine Y de fonction inconnue, un domaine protéase PCP, un domaine hypervariable HVR, un macrodomaine X, une hélicase et une ARN polymérase ARN dépendante. De façon intéressante, certains de ces domaines présentent des homologies avec des domaines retrouvés dans le génome d'autres virus, et pour lesquels un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et notamment du système IFN-I a été démontré. Cependant, le rôle de l'ORF1 du HEV dans la modulation du système IFN-I a été peu étudié. L'objectif de cette partie de mon projet de thèse a donc été de déterminer si certains domaines de l'ORF1 pouvaient avoir un effet sur les voies de signalisation de l'IFN-I.

Afin de déterminer si les différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 ont un effet sur les voies de signalisation de l'IFN-I, nous avons dans un premier temps entrepris la construction de vecteurs d'expression codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines (MetPCP, PCP, X et Y). L'étude de l'expression de la protéine ORF1 par immunoblot a montré la présence de différentes bandes à des tailles inférieures à celles attendues, suggérant que l'ORF1 du HEV serait clivée dans les cellules 293T (Figures 22 et 34). Cependant, le clivage de l'ORF1 en différents domaines fonctionnels n'est pas clairement établi. En effet, certaines études ont montré une absence de clivage alors que d'autres ont montré le clivage en fragments de différentes tailles. Nous avons observé des bandes à des poids moléculaires d'environ 35 kDa, 70 kDa et 130 kDa en plus de la bande attendue pour l'ORF1 complète à un poids moléculaire de 192 kDa. L'étiquette FLAG étant à l'extrémité N-terminale de l'ORF1, nous détectons des fragments de clivage contenant l'étiquette FLAG. Il est donc probable que certains sites de clivage ne soient pas mis en évidence dans nos expériences. Il serait intéressant de construire un plasmide codant pour l'ORF1 avec l'étiquette FLAG en C-terminale afin de pouvoir comparer avec les potentiels sites de clivage observés dans nos expériences.

Les tailles de fragments détectés dans cette étude (d'environ 35, 70 et 130 kDa) correspondent à celles obtenues dans certaines de ces études. Notamment, le fragment N-terminal d'environ 35 kDa a été obtenu après transfection de cellules HepG2 avec un clone infectieux codant pour le génome complet du HEV ⁹⁴, en utilisant un système d'expression en baculovirus ⁹⁶, dans un système d'expression en *E. coli* ⁹⁷ et dans des cellules Huh7 exprimant l'ORF1 fusionnée avec une étiquette histidine ⁹⁸. Nos résultats semblent donc corroborer ces différents résultats publiés. Dans un système d'expression en baculovirus de l'ORF1, des fragments de 22, 35, 47 et 98 kDa avec l'étiquette 6xHis (à l'extrémité N-terminale de l'ORF1) et des fragments de 26, 59, 93, 106 et 122 kDa avec l'étiquette FLAG (à l'extrémité C-terminale de l'ORF1) ont été observés, ce qui a permis de déterminer des sites potentiels de clivage au sein de l'ORF1 (Figure 34A) ⁹⁶. En plus du fragment d'environ 35 kDa, nous avons également observé des bandes d'environ 70 et 130 kDa (Figure 22 et 34). Ces bandes correspondraient à des sites de clivages présents à la fin du domaine Met, à la fin du PCP et entre le domaine Hel et RdRp identifiés ⁹⁶ (Figure 34A), suggérant des clivages de l'ORF1 en fragments correspondant aux domaines Met, Y-PCP, HVR-X-Hel et RdRp ⁹⁶. Nos

résultats semblent donc en accord avec l'étude en système d'expression baculovirus et suggèrent que l'ORF1 serait clivée en au moins 4 différentes protéines.

Une étude dans des cellules Huh7-S10-3 exprimant des mutants au niveau de l'ORF1 a également montré la présence d'un site catalytique au niveau du domaine PCP constitué de 6 cystéines (C457, C459, C471, C472, C481 et C483) et de 3 histidines (H443, H497 et H590)⁹⁸. De plus, il a également été mis en évidence trois glycines très conservées en aval du domaine X (G815-G816-G817), homologues au site de clivage de la protéase du RubV. Ce site potentiel de clivage du domaine PCP est également présent dans la séquence du HEV-3 que nous utilisons, cependant nous n'avons pas observé de bande avec une taille de 90 kDa qui pourrait correspondre à ce site de clivage. Notre système ne nous permettant d'observer que les fragments liés à l'étiquette FLAG, il est possible que d'autres fragments aient été générés mais qu'ils n'aient pas été détectés par immunoblot.

Une autre étude a mis en évidence un site catalytique au niveau des acides aminés H443, C472/C481/C483 et des sites de clivage de l'ORF1 au niveau des sites A15/I16 situé en N-terminal du domaine Met et A1364/V1365 situé dans la RdRp⁹⁷. Nous n'avons cependant pas observé de clivages à ces différents niveaux, suggérant également que des fragments de différentes tailles pourraient être générés que l'on ne puisse pas détecter avec notre système. Notamment, un fragment de la taille de 1-2 kDa, dû à un clivage au niveau du site A15/I16 serait difficile à visualiser sur gel de polyacrylamide 12%.

Le site catalytique mis en évidence au niveau des acides aminés H443, C472/C481/C483 a été retrouvé dans la séquence primaire du HEV-3 que nous utilisons au laboratoire. Cela suggère que le PCP de l'ORF1 utilisé dans nos expériences posséderait bien une activité protéase fonctionnelle et permettrait le clivage de l'ORF1.

Après transfection des cellules 293T avec un plasmide codant pour le domaine MetPCP, plusieurs bandes de taille inférieure à celle attendue (d'environ 40 et 60-70 kDa) ont été observées (Figure 22). Une bande d'une taille supérieure à 50 kDa (60-70 kDa) semble correspondre à une des bandes observées après transfection de l'ORF1 entière. Il semblerait donc que le domaine MetPCP soit également clivé en différents fragments. Cependant, nous n'avons pas obtenu une bande de la même taille (72 kDa) que le domaine MetPCP après expression de l'ORF1, il est donc possible que le domaine MetPCP exprimé dans cette étude

ne corresponde pas à un produit de clivage de l'ORF1, et qu'en contexte infectieux, une forme plus courte du domaine MetPCP soit produite après clivage de l'ORF1.

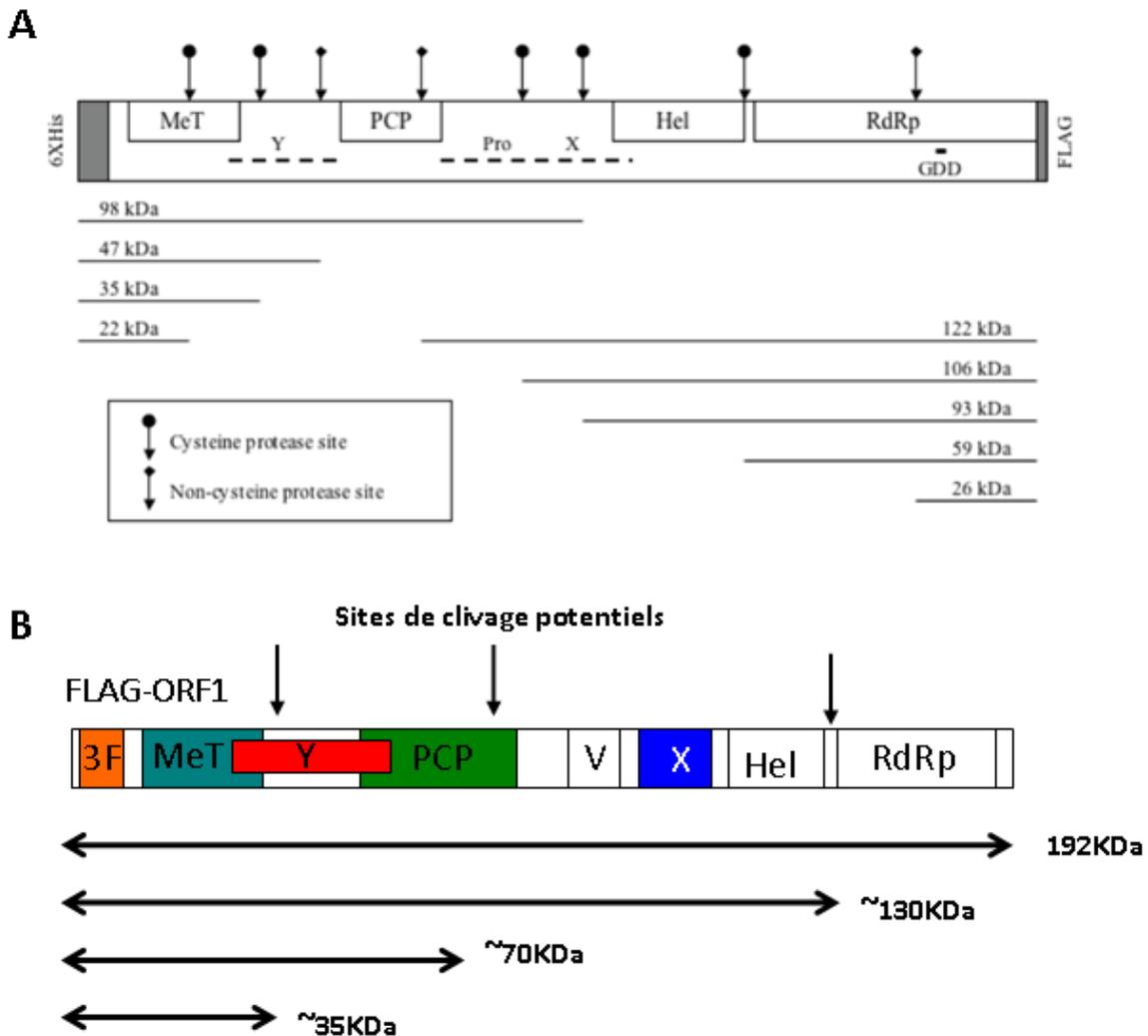


Figure 34. Comparaison de la taille des bandes observées après transfection de l'ORF1 dans nos expériences avec les fragments obtenus dans une autre étude.

(A) Fragments obtenus dans une étude antérieure et sites de clivage potentiels de l'ORF1 du HEV ⁹⁶ (B) Tailles des bandes observées par immunoblot, dans la présente étude, après transfection d'un plasmide codant pour FLAG-ORF1 dans les cellules 293T (flèches horizontales) et sites de clivages putatifs (flèches verticales).

L'étude de l'expression du domaine PCP de l'ORF1 a également montré la présence de plusieurs bandes, mais de taille supérieure (environ 35, 40 et 50 kDa) (Figure 22). De plus, le domaine PCP n'est pas à la taille attendue de 23 kDa mais plutôt vers 28 kDa. Ces résultats semblent indiquer que le domaine PCP pourrait subir différentes modifications post-traductionnelles. Par rapport à la taille des différentes bandes obtenues, nous avons émis

l'hypothèse que PCP pourrait être ubiquitinylé. En effet, PCP possède des sites potentiels d'ubiquitylation au niveau des lysines 32, 33, 37 et 43. Ces sites ont été identifiées en utilisant le logiciel de prédiction des sites d'ubiquitylation en ligne PDM-PUB (pour *Prediction of Ubiquitination sites with Bayesian Discriminant Method*)⁵⁶⁴. De plus, l'ubiquitine possède une taille de 8,5 kDa. La forme principale possède une taille d'environ 28 kDa, suivi d'une bande à une taille de 35 kDa environ puis d'une bande à une taille d'environ 40 kDa et enfin 50 kDa. L'ajout d'une, deux ou trois ubiquitines au domaine PCP donnerait des produits aux tailles des différentes bandes observées. Ces bandes pourraient également correspondre à de l'ISGylation. L'ISG15 ayant un poids moléculaire de 15 kDa, il est possible que la bande observée à 40 kDa soit la protéine PCP de 23 kDa associée à l'ISG15. De même, la présence d'une bande à 35 kDa pourrait correspondre à de la SUMOylation. La protéine SUMO, de 10 kDa, pourrait, en étant liée au PCP (23 kDa), donner une protéine de 35 kDa, comme observé par immunoblot. Il est possible que la différence de taille entre celle attendue (23 kDa) et celle observée (27-28 kDa) soit due à plusieurs processus de phosphorylation car il s'agit d'une modification qui change peu le poids moléculaire de la protéine cible (1 kDa).

Dans cette étude, la localisation subcellulaire de l'ORF1 et des différents domaines qui la compose a également été étudiée. L'ORF1 ainsi que les domaines MetPCP et PCP présentent une localisation cytoplasmique ponctiforme au niveau d'une région périnucléaire dans la cellule, alors que les domaines X et Y présentent une localisation diffuse (Figure 23). Une localisation ponctiforme de l'ORF1 et d'un domaine proche du MetPCP mais plus court (environ 100 acides aminés de moins) dans les cellules HeLa a déjà été observée dans une autre étude portant sur la localisation de l'ORF1 d'une souche de HEV-1⁹³. Dans celle-ci, l'ORF1 était localisée au niveau d'un compartiment intermédiaire entre le RE et le golgi appelé ERGIC. Ici, nous n'avons pas étudié la localisation de l'ORF1 complète. Cependant, l'étude de la localisation des domaines PCP et MetPCP a montré une co-localisation potentielle avec un marqueur spécifique du RE (α -kinectine). Cette localisation doit encore être confirmée par microscopie confocale ou par apotome et en utilisant d'autres marqueurs du RE et du ERGIC.

Aucune étude n'a encore été réalisée sur la localisation du domaine X du HEV. Une étude portant sur la localisation de macrodomaines cellulaires a montré la même expression

diffuse dans la cellule que celle du HEV ¹¹³. Il semblerait donc que la localisation du macrodomaine de l'ORF1 du HEV soit similaire à celles de certains macrodomaines cellulaires.

Un des objectifs de ce projet de thèse était de déterminer si l'ORF1 ou certains de ses domaines avaient un effet sur la voie de signalisation JAK-STAT. Pour cela, l'activation du promoteur ISRE a été étudiée après transfection de plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines et d'un plasmide contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur ISRE. Les résultats obtenus ont permis de montrer que le domaine MetPCP, et non le domaine PCP et l'ORF1 complète, inhibe l'activation du promoteur ISRE. L'ORF1 étant exprimée à un niveau très faible en comparaison du domaine MetPCP, il est possible que son activité inhibitrice soit masquée dans le test rapporteur. De plus, le clivage potentiel de l'ORF1 en différents domaines semble se faire à un niveau assez faible. Il est possible que l'activité protéase de la PCP ne soit pas très efficace ou que l'expression de l'ORF1 doit être étudiée à des temps plus tardifs afin de mieux observer les différents produits de clivage. En effet, dans une publication étudiant le clivage de l'ORF1 en système d'expression baculovirus, l'analyse par immunoblot des fragments générés par l'ORF1 a montré que les formes clivées sont de plus en plus présentes au cours du temps après infection, jusqu'à devenir majoritaires à partir de 36h et jusqu'à 72h après l'infection ⁹⁶. L'ORF1 complète semble être la forme majoritaire exprimée après transfection dans les cellules 293T, ce qui limiterait la détection de l'effet que pourraient avoir certains produits de clivage de l'ORF1 sur la voie de réponse à l'IFN-I.

Nous avons ensuite effectué différentes expériences afin de déterminer à quel niveau de la voie de signalisation l'inhibition de la voie JAK-STAT avait lieu. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1 et interfère avec l'entrée de STAT1 dans le noyau. Cependant, l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est plus faible que l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par la protéine V du MV, utilisée comme contrôle positif. Cette différence s'explique certainement, d'une part, par le fait que la protéine V est exprimée plus abondamment dans les cellules 293T par rapport au domaine MetPCP, comme observé par immunoblot, et, d'autre part, par le fait qu'elle agit à plusieurs niveaux de la voie de signalisation JAK-STAT. Notamment, la protéine V interagit avec JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1

^{523,524}, interagit avec STAT1, STAT2 et TYK2 et bloque la phosphorylation de ces trois protéines ^{523,525–529}.

Après transfection des plasmides codant pour GFP-ORF1 et GFP-PCP, un effet modéré sur l'entrée de STAT1 dans le noyau a été observé par IF (Figure 29). Cependant, cet effet n'a pas été reproduit dans les expériences d'IF après transfection des plasmides codant pour FLAG-PCP et FLAG-ORF1 (Figure 30). De plus, aucun effet du domaine PCP n'a été observé sur le niveau de phosphorylation de STAT1. Il est possible, du fait du faible niveau d'expression de l'ORF1 et du domaine PCP, en comparaison du domaine MetPCP, détecté dans la plupart des immunoblots réalisés, que l'effet sur la phosphorylation de STAT1 soit masqué ou bien que l'ORF1 et le domaine PCP n'aient pas d'activité sur la voie de signalisation JAK-STAT et que l'effet observé par microscopie sur l'entrée de STAT1 dans le noyau soit non-spécifique. Il serait intéressant de transférer une quantité de plasmide codant pour l'ORF1 ou le domaine PCP plus importante ou d'augmenter le temps de transfection afin d'améliorer le niveau d'expression des protéines et donc de déterminer si une meilleure expression permettrait de visualiser un effet inhibiteur sur l'état de phosphorylation de STAT1 en immunoblot.

Dans les investigations menées pour identifier l'étape en amont de la phosphorylation de STAT1 qui pourrait être inhibée par MetPCP, il n'a pas été observé d'inhibition de la phosphorylation de JAK1, ni celle de STAT2. Cependant, des résultats préliminaires laissent supposer que la phosphorylation de TYK2 pourrait être diminuée. Les niveaux endogènes des protéines TYK2 et JAK1 étant faibles, ces résultats sont délicats à reproduire. Il est envisageable de les surexprimer afin de mieux visualiser une potentielle inhibition de la phosphorylation de ces protéines par MetPCP. Par ailleurs, la surexpression des protéines JAK1 et TYK2 pour stimuler la voie de signalisation au lieu de l'ajout d'IFN- β permettrait de confirmer si l'inhibition a lieu avant ou après l'activation de ces deux protéines ou au niveau de l'activation de STAT1 spécifiquement.

Par ailleurs, après stimulation des cellules avec l'IFN- γ , nous avons observé que la phosphorylation de STAT1 n'est pas inhibée par le domaine MetPCP, suggérant que l'inhibition de la phosphorylation est spécifique de la voie de réponse à l'IFN-I. La voie de réponse à l'IFN- γ ne dépendant pas de la phosphorylation de TYK2, une hypothèse serait que l'inhibition spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β vient de l'inhibition spécifique de la phosphorylation de TYK2. Cependant, cette hypothèse reste encore à confirmer.

Nos résultats montrent que le domaine MetPCP du HEV inhibe l'activité du promoteur ISRE et la phosphorylation de STAT1. Cet effet inhibiteur n'a pas été observé pour le domaine PCP seul, ce qui pourrait suggérer que le domaine Met ou Y sont nécessaires à l'inhibition de cette voie. Cependant, les domaines Y, Met, MetY et YPCP exprimés séparément n'ayant pas d'effet sur l'activité du promoteur ISRE, cela suggère que c'est l'ensemble des domaines Met, Y et PCP qui est nécessaire à l'activité inhibitrice sur la voie de signalisation JAK-STAT. Il est également possible que seules les domaines Met et PCP soient nécessaires. Il serait intéressant d'exprimer les deux protéines en même temps afin d'analyser si une inhibition de l'activation du promoteur ISRE est observée dans ce cas là.

Dans une autre étude, il a été rapporté que le domaine Met d'un HEV-1 possède un domaine en doigt de zinc entre les acides aminés 73 et 94 ¹⁰⁴. Dans cette même étude, une protéine codant pour le domaine MetPCP (entre les acides aminés 26 à 592) a été produite en système *E. coli*. Cette protéine a été mise en contact avec différents substrats fluorescents, l'ubiquitine-7-amino-methylcoumarin (Ub-AMC), l'ISG15-AMC, le Nedd8-AMC et le SUMO-AMC, et a été capable d'hydrolyser les 4 substrats, mais l'hydrolyse de l'ISG15-AMC était la plus élevée. Chez d'autres virus, un domaine en doigt de zinc a été montré comme nécessaire à l'activité enzymatique de domaines PCP. Par exemple, le domaine en doigt de zinc de la protéine Nsp1- α du PRRSV est essentiel à l'inhibition de la production d'IFN- β ⁵⁶⁵. En effet, la protéine non structurale du PRRSV Nsp1- α possède un domaine PCP, un domaine en doigt de zinc en N-terminal du PCP et un domaine en doigt de zinc en C-terminal du PCP. Il a été montré que des mutations dans le domaine en doigt de zinc N-terminal inhibaient l'activité inhibitrice sur la voie de production de l'IFN- β de Nsp1- α , suggérant que ce domaine est essentiel à cette activité ⁵⁶⁶. Au contraire, des mutations au niveau des sites catalytiques permettant l'activité protéase du PCP ne modifiait pas l'activité inhibitrice de Nsp1- α sur la voie de production de l'IFN- β . Il serait intéressant de muter le domaine en doigt de zinc du domaine MetPCP du HEV (séquence NEVEQYCRARAGRCLEVGHAHPR prédite à partir du logiciel SMART), et plus particulièrement les sites C79, C86 et H92, importants pour la liaison au zinc, afin de voir s'ils sont nécessaires à l'inhibition de la phosphorylation de STAT1. De la même manière, il serait intéressant de voir si une fonction de déISGylation des protéines est également portée par le domaine PCP seul ou s'il a besoin du motif en doigt de zinc pour exercer cette fonction.

Un des mécanismes pouvant conduire à une inhibition de la phosphorylation de STAT1 et potentiellement de TYK2 serait la liaison directe du domaine MetPCP avec une des protéines de la voie, bloquant ainsi son activité. Le domaine MetPCP pourrait se lier à JAK1 et/ou TYK2 pour bloquer leur activité de phosphorylation de STAT1. Il pourrait également se lier à STAT1 lui-même pour empêcher son recrutement au niveau de l'IFNAR et donc sa phosphorylation. L'étude de l'interaction du domaine MetPCP avec des protéines de la voie JAK-STAT a été débutée pendant cette thèse (voir travaux complémentaires, partie I).

Une autre hypothèse possible serait l'activation, par le domaine MetPCP, de phosphatases PTPs (pour *protein tyrosine phosphatases*), qui régulent négativement la voie JAK-STAT. Par exemple, la protéine cellulaire SHP2 (pour *SH2-domain-containing-PTPs*) est impliquée dans la déphosphorylation de STAT1 au niveau de résidus tyrosine et sérine, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Il a été également montré que certaines PTP, comme TC45, déphosphorylent STAT1 dans le noyau. De même, la phosphatase TCPTP (pour *T-cell PTP*) est impliquée dans la déphosphorylation de STAT1 et de STAT3 dans le cytoplasme ³⁷⁹. Certains virus sont capables de moduler l'activité des PTPs pour inhiber l'activité des protéines de la voie JAK-STAT. Notamment, la protéine NS5 du JEV inhibe la phosphorylation de TYK2 et STAT1 via un mécanisme dépendant des PTPs ⁵⁶⁷. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur des PTPs, ATPase et phosphatase alcaline à large spectre, le sodium orthovanadate, restaure l'état de phosphorylation de STAT1 et TYK2 dans les cellules exprimant la protéine NS5. Cependant, la PTP impliquée n'a pas été identifiée. Il serait donc intéressant de traiter nos cellules exprimant le domaine MetPCP avec du sodium orthovanadate, afin de déterminer si l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 est liée à une PTP.

Une autre possibilité serait que le domaine MetPCP inhiberait l'activité de la protéine RACK1. RACK1 est une protéine adaptatrice permettant le recrutement de STAT1 (et non STAT2 et STAT3) au niveau d'IFNAR2 ⁵⁶⁸. Une fois phosphorylée, STAT1 se dissocie de RACK1 pour entrer dans le noyau et activer le promoteur ISRE. En effet, RACK1 est associé uniquement avec la forme non phosphorylée de STAT1. De nombreuses protéines virales interagissent avec RACK1. C'est le cas de la protéine E1A de l'Adenovirus 5 (Ad5) ⁵⁶⁹ qui interagit avec RACK1 au niveau de membranes périnucléaires dans la cellule. C'est également le cas de la protéine BZLF1 de EBV ⁵⁷⁰, de la protéine de matrice du IAV ⁵⁷¹ et de la protéine Nef du VIH-1

⁵⁷². La protéine V du MuV interagit avec RACK1 et cette interaction bloque la formation du complexe entre STAT1, RACK1 et l'IFNAR ⁵⁷³. De plus, l'association des protéines C et V du MV avec l'IFNAR et RACK1 bloque la signalisation dépendante de l'IFN- α . Il serait donc possible qu'en interagissant avec RACK1, le domaine MetPCP empêche le recrutement de STAT1 au niveau de l'IFNAR et donc bloque sa phosphorylation. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation ou de co-précipitation avec le domaine MetPCP fusionné à la GST (pour *glutathione sepharose transferase*) afin d'étudier une potentielle interaction entre le domaine MetPCP et la protéine RACK1.

Enfin, une étude a rapporté que le domaine MetPCP du HEV possède une activité de déISGylation et de déubiquitinylation des protéines ¹⁰⁴. Il a été montré que STAT1 est ISGylé après traitement au poly(I :C) ou à l'IFN- β ³⁷⁶. De plus, le fait que les protéines ISGylées ne soient pas nécessairement dégradées par le protéasome suggère que l'ISGylation pourrait avoir un rôle positif sur STAT1. Il serait alors intéressant d'étudier si la déISGylation de STAT1 serait un mécanisme impliqué dans l'inhibition de sa phosphorylation par MetPCP.

V- Manuscrit de l'article

Sur la base des travaux réalisés au cours de cette partie de mon projet de thèse, un manuscrit a été rédigé, qui a été soumis à *Journal of Virology*. J'ai participé à la conception et à la réalisation des expériences et à la réalisation des figures de l'article.

The amino-terminal region of hepatitis E virus ORF1 containing a methyltransferase (Met) and a papain-like cysteine protease (PCP) domain counteracts type I interferon response.

Running title: "MetPCP of HEV ORF1 inhibits the IFN-I response"

Eugénie Bagdassarian^{1,2,3}*, Virginie Doceul^{1,2,3}#, Marie Pellerin^{1,2,3}, Nolwenn Jouvenet⁴, Nicole Pavio^{1,2,3}.

¹ UMR 1161 Virologie, Anses, Laboratoire de santé animale, Maisons-Alfort, France.

² UMR 1161 Virologie, INRA, Maisons-Alfort, France.

³ UMR 1161 Virologie, PRES, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France.

⁴ CNRS-UMR3569, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France.

Address correspondence to Virginie Doceul, virginie.doceul@vet-alfort.fr

* E.B. and V.D. contributed equally to this work.

Abstract: 214 words; Text: 5111 words.

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of large waterborne epidemics in endemic countries and numerous cases of zoonotic hepatitis E worldwide. HEV causes acute hepatitis

in humans that can lead to fulminant hepatitis. Chronic cases of hepatitis and severe neurological disorders have also been linked to HEV infection, highlighting the importance to characterize the interactions between HEV and its host. Here, we investigated the ability of the non-structural polyprotein encoded by the first open reading frame (ORF1) of HEV to modulate the host early antiviral response and in particular the type I interferon (IFN-I) system. We found that the amino-terminal region of HEV ORF1 (MetPCP) containing a putative methyltransferase (Met) and a papain-like cysteine protease (PCP) functional domain inhibited IFN-stimulated response element (ISRE) promoter activation and the expression of several IFN-stimulated genes (ISGs) in response to IFN-I. We showed that the MetPCP domain interfered with the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription protein (STAT) signaling pathway by inhibiting STAT1 nuclear translocation and STAT1 phosphorylation after IFN-I treatment. However, MetPCP had no effect on STAT2 phosphorylation and a limited impact on the activation of the JAK/STAT pathway after IFN-II stimulation. Overall, this study provides evidence that the predicted MetPCP domain of HEV ORF1 antagonizes STAT1 activation to modulate the IFN-I response.

Importance

Hepatitis E virus (HEV) is the leading cause of enterically transmitted hepatitis worldwide. In some cases, hepatitis E infection can cause extra-hepatic manifestations or evolves toward chronicity. It is then critical to better understand the interactions occurring between HEV and its host to prevent and control such severe complications. Due to difficulties in establishing an efficient cell culture system for HEV, the virus remains poorly characterized and studies on its ability to modulate host immunity are lacking. Here, we investigated the ability of the non-structural polyprotein encoded by the first open reading frame (ORF1) of HEV to counteract the host antiviral response. We found that the amino-terminal region of ORF1 is able to

inhibit the IFN response by interfering with the activation of STAT1, a key component of this pathway. This finding contributes to a better understanding of the strategies evolved by HEV to evade the host innate immune response.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a single stranded positive RNA virus belonging to the *Orthohepevirus* genus within the *Hepeviridae* family (1). Its genome is 7.2 kb in length and codes for 3 open reading frames (ORF1 to 3) (2). *ORF1* codes for a non-structural polyprotein composed of several putative functional domains including a methyltransferase (Met), a domain of unknown function (Y), a papain-like cysteine protease (PCP), a macro domain (X), a helicase and a RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (3). *ORF2* codes for the capsid protein and *ORF3* for a multifunctional phosphoprotein. Four genotypes of HEV are able to infect humans. Genotypes 1 and 2 (HEV-1 and HEV-2) infect exclusively humans in endemic regions and are transmitted via the fecal-oral route, through the consumption of contaminated water or soiled food. In contrast, genotypes 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4) are detected in humans and other animal species worldwide and can be transmitted via direct contacts with infected animals and the consumption of infected meat (4, 5). In most human cases, HEV infection causes an acute hepatitis that is self-limited. However, fulminant hepatic failure can occur in patients with underlying chronic liver disease, in the elderly and in pregnant women. More recently, chronic cases of HEV infection have also been reported in immunocompromised patients and extrahepatic manifestations including renal, pancreatic and neurological disorders have been linked to HEV infection (6). With the exception of China, no country has yet commercialized an HEV vaccine and no treatment against HEV infection has been approved. Several reports have recently described the successful use of ribavirin to treat cases of chronic hepatitis E (7).

Innate immunity is the first host defense to limit viral infection. It allows infected and neighboring cells to establish an antiviral state early after virus exposure and stimulates the adaptive immune response. Interferons (IFNs) are a group of secreted cytokines that play a key role in the host early antiviral response. Type I IFNs (IFN-I), composed mainly of IFN- α and - β , are produced directly in response to viral infection, upon sensing of viral molecular signatures by specialized cellular receptors such as retinoic-acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) and Toll-like receptors (TLRs). IFN-I subsequently binds to IFN- α/β receptors (IFNAR) at the cell surface and activates the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription protein (STAT) signaling pathway in an autocrine and paracrine manner. Binding of IFN-I to its receptor leads to the phosphorylation of tyrosine kinase 2 (TYK2) and JAK1 (8–10) and the subsequent phosphorylation of the cytoplasmic domain of the IFNAR subunits (10–14). STAT1 and STAT2 are then recruited and phosphorylated by the JAK kinases on tyrosine 701 and tyrosine 690, respectively (10, 15). Phosphorylated STAT1/STAT2 heterodimers are released in the cytoplasm where they interact with IFN response factor 9 (IRF9) to form IFN-stimulated gene (ISG) factor 3 (ISGF3). This transcription factor translocates to the nucleus where it binds to specific promoter elements called IFN-stimulated response element (ISRE), leading to the up-regulation of hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) that may display antiviral properties and contribute to the establishment of a rapid and robust antiviral state within the cell (16). In contrast, type II IFN (IFN- γ) is secreted mainly by activated T cells and natural killer cells. Binding of the cytokine to a specific IFN- γ receptor (IFNGR) leads to the phosphorylation of JAK1 and JAK2 and the subsequent phosphorylation of STAT1. STAT1 homodimers are then formed and translocate to the nucleus where they bind to specific promoters to activate the transcription of a different subset of ISGs (17).

Different reports suggest that an IFN response is triggered by HEV as the expression of IFN-I and multiple ISGs has been detected after infection *in vivo* and *in vitro* (18–22). However, IFN-I seems to have a moderate and delayed antiviral effect on HEV infection *in vitro* and in patients in comparison, for instance, to hepatitis C virus (HCV), another hepatotropic RNA virus (23, 24). Consistently, recent studies indicate that HEV counteracts the host IFN response (23–25). These findings suggest that HEV has evolved evasion strategies to efficiently establish an infection.

Evidence from an increasing number of studies shows that non-structural viral proteins can perform multiple functions and interfere with multiple steps of the IFN-I signaling pathways (26). It is then likely that one or several functional domains of the HEV ORF1 non-structural polyprotein are able to modulate the IFN-I system via different strategies. Recently, the macrodomain and the PCP domain of HEV-1 ORF1 were described as antagonists of the signaling cascade leading to IFN synthesis by interfering with several components of the RLR pathway (27). However, nothing is known about the ability of the viral polyprotein to inhibit the response to IFN-I and the JAK/STAT pathway. To address this question, we studied the effect of HEV ORF1 and several of its domains on this signaling pathway. We were particularly interested in testing PCP and the macrodomain (X) as such functional domains encoded by several RNA-positive viruses have been shown to modulate the host innate immune response (28–33). The amino-terminal end of ORF1 (MetPCP) containing Met, Y and PCP was also included in this study. A putative zinc finger domain is present in Met that might be critical for the enzymatic activity of PCP (34). Finally, we tested the Y domain as its function remains unknown. We found that the amino-terminal region of ORF1 composed of the Met, Y and PCP domains (MetPCP) is able to inhibit ISRE promoter activation and the expression of several ISGs after stimulation with IFN-I. We showed that MetPCP interferes with the nuclear translocation of STAT1 and blocks specifically the phosphorylation of

STAT1 in response to IFN-I. Overall, our data provides evidence that the predicted MetPCP domain of HEV ORF1 antagonizes STAT1 activation to modulate the IFN-I response.

Results

Expression of full-length and individual domains of HEV ORF1. Sequences coding for full-length ORF1 and the MetPCP, Y, PCP and X domains were identified according to a previous computer-based analysis (3), amplified and inserted in an expression vector downstream and in frame of a sequence coding for 3 FLAG tags (Fig. 1A). Expression of the different constructs was confirmed in 293T cells by immunoblotting (Fig. 1B). Bands corresponding to the expected molecular weight of FLAG-ORF1 (192 kDa), FLAG-Y (31 kDa), FLAG-X (26 kDa) and FLAG-MetPCP (72 kDa) were detected. Bands of lower molecular weight were also observed for FLAG-ORF1 and FLAG-MetPCP, suggesting cleavage or degradation of these proteins. In contrast, bands corresponding to higher molecular weights than the one expected (23 kDa) were detected for FLAG-PCP, suggesting post-translational modification and/or dimerization of the viral protein. We also ensured that transfection of the different HEV ORF1 plasmids and expression of the FLAG-tagged viral proteins had no effect on cell viability 24 h post-transfection (Fig. 1C).

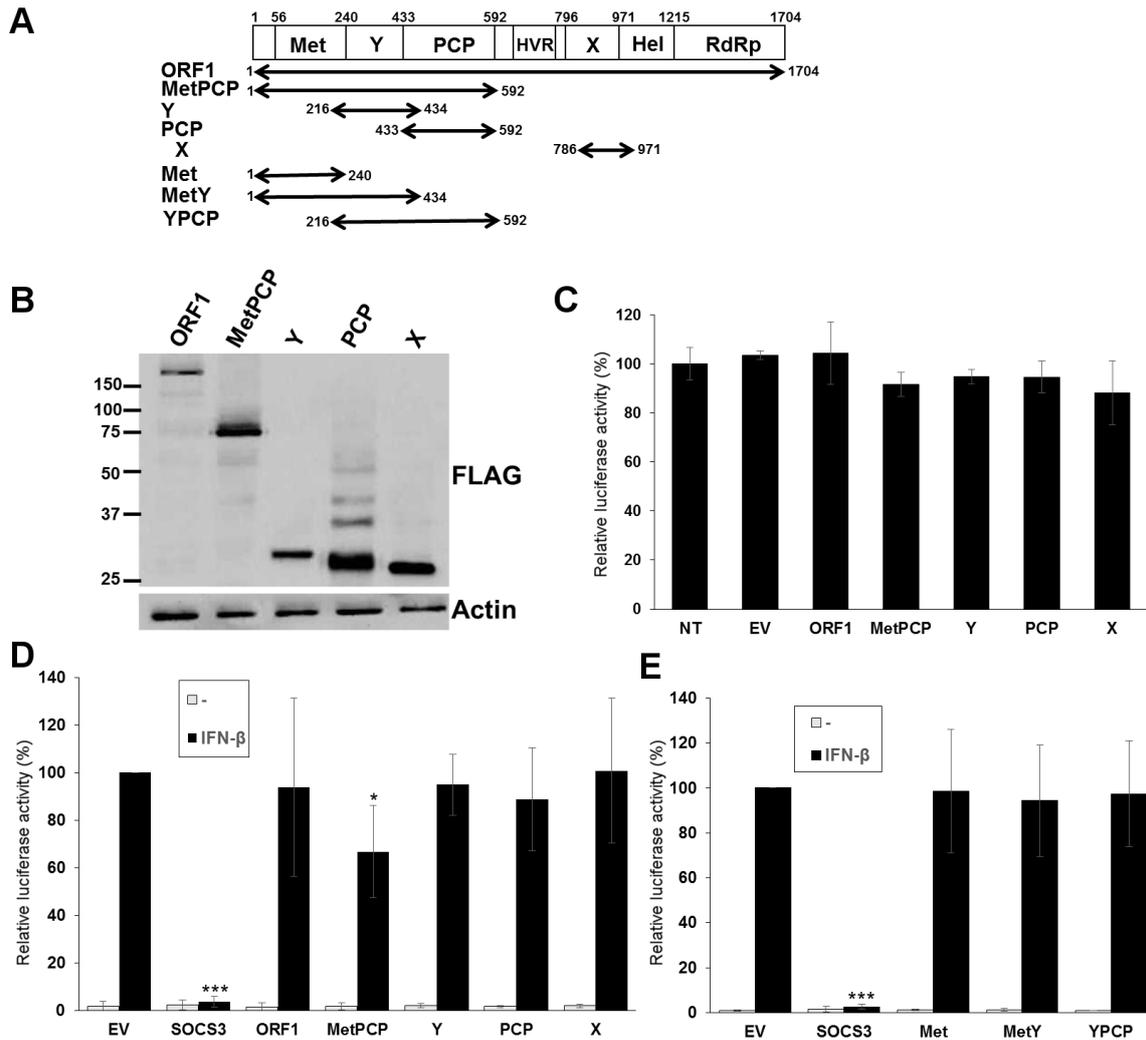


FIG 1. Effect of expressing full-length HEV ORF1 and several of its domains on ISRE promoter activation. (A) Schematic representation of the different domains of HEV ORF1. Met, methyltransferase domain; Y, Y domain; PCP, papain-like cysteine protease; HVR, hypervariable region; X, macro domain; Hel, helicase domain; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase. The position of the different putative functional domains present in the ORF1 amino acid sequence of the HEV-3 strain used in this study are indicated. The different fragments of ORF1 that were cloned and expressed in 293T cells are represented by arrows. (B) Expression of FLAG-tagged full-length and domains of ORF1 in 293T cells detected by immunoblotting using an anti-FLAG antibody. Actin served as internal control. Cells were lysed 18 h post-transfection. (C) Effect of the expression of the different FLAG-tagged ORF1 products on cell viability. 293T cells were left untreated (NT) or transfected with an empty vector (EV) or plasmids coding for FLAG-tagged ORF1, MetPCP, Y, PCP or X. Twenty four h later, cells were lysed and cell viability determined using a luminescent-based assay. Luciferase activities (\pm standard deviations) are expressed as percentage relative to non-transfected cells. Results are representative of one experiment performed in triplicates and were reproduced in 2 independent experiments. (D) Effect of full-length ORF1, MetPCP, Y, PCP and macro domain (X) on ISRE promoter activation. 293T cells were transfected with pISRE-Luc, pRSV- β Gal and a pCI-Neo empty vector (EV) or a plasmid coding for SOCS-3, ORF1, MetPCP, Y, PCP or X. Eighteen h later, cells were treated or not (-) with IFN- β for 7 h and lysed to determine β -galactosidase and luciferase activity. Mean ratios between luciferase and β -galactosidase activities were calculated and are presented as percentages of the treated EV control (\pm standard deviations). Results shown represent the mean of 4 independent experiments performed in triplicates. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0005$ compared to EV control for treated samples (unequal variances t tests). (E) Effect of Met, MetY and YPCP on ISRE promoter activation. 293T cells were transfected with pISRE-Luc, pRSV- β Gal and a pCI-Neo empty vector (EV) or a plasmid coding for SOCS-3, Met, MetY or YPCP. Cells were then treated and analyzed as described in (D). Results shown represent the mean of 3 independent experiments performed in triplicates.

MetPCP of HEV ORF1 inhibits the IFN-I response. To assess the ability of the different HEV ORF1 products to interfere with the IFN-I response, we first examined their effect on ISRE promoter activation using a luciferase reporter assay. 293T cells were transfected with an ISRE-reporter plasmid (pISRE-Luc), a control vector (pRSV- β Gal) to normalize for transfection and a pCI-Neo empty vector (EV) or plasmids coding for SOCS3, ORF1, MetPCP, Y, PCP or X. Cells were treated 18 h later with IFN- β for 7 h. SOCS3 was used as a positive control as it is a known inhibitor of the JAK/STAT pathway (35). As shown in Fig. 1D, the expression of MetPCP was able to inhibit significantly ISRE promoter activation after stimulation with IFN- β . In contrast, no inhibition was detected when PCP alone was expressed. It is interesting to note that both MetPCP and PCP were able to significantly inhibit IFN β promoter activity after stimulation of the RLR pathway in a luciferase reporter assay (data not shown). This result is in agreement with previous findings showing that PCP from HEV-1 ORF1 is an inhibitor of the RLR pathway (27) and suggests that the PCP domain expressed in our study is functional. ORF1 had no impact on ISRE promoter activation in our assay but the relatively low expression of full-length ORF1 in 293T cells (Fig. 1B) might have limited a putative inhibitory effect. To determine whether the entire MetPCP product is necessary to inhibit ISRE promoter activation, we then tested the effect of Met, MetY and YPCP of HEV ORF1 (Fig. 1A) on ISRE promoter activity using the same luciferase reporter assay. As shown in Fig. 1E, expression of Met alone or MetY or YPCP had no effect on ISRE promoter activation, suggesting that expression of the amino-terminal region of ORF1 containing the Met, Y and PCP domains is necessary to inhibit the signaling pathway triggered by IFN-I.

To further confirm the effect of MetPCP as an antagonist of the IFN-I response, we examined the effect of the viral protein on the level of expression of 3 ISG mRNAs after IFN- β

treatment by RT-qPCR (Fig. 2A-C). 293T cells were transfected with an empty vector or a plasmid coding for PCP or MetPCP for 40 h before stimulation with IFN- β for 6 h. As a positive control, we also transfected 293T cells with a plasmid coding for the V protein of the Schwarz strain of measles virus (MV-V) fused to a FLAG tag at its amino-terminal. This viral protein inhibits the IFN-I response by interacting with STAT1 and JAK1 and interfering with STAT1 and TYK2 phosphorylation (36). We found that, following IFN- β treatment, expression of MetPCP and, as expected, MV-V were able to significantly downregulate the mRNA levels of ISG56 (Fig. 2A), melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) (Fig. 2B) and 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) (Fig. 2C). This inhibition was not due to a cytotoxic effect of the viral proteins tested as transfection of the different constructs for 40 h did not affect cell viability (Fig. 2D). The results from this experiment confirm our previous observation (Fig. 1D) that MetPCP, but not PCP alone, is able to counteract the IFN-I response.

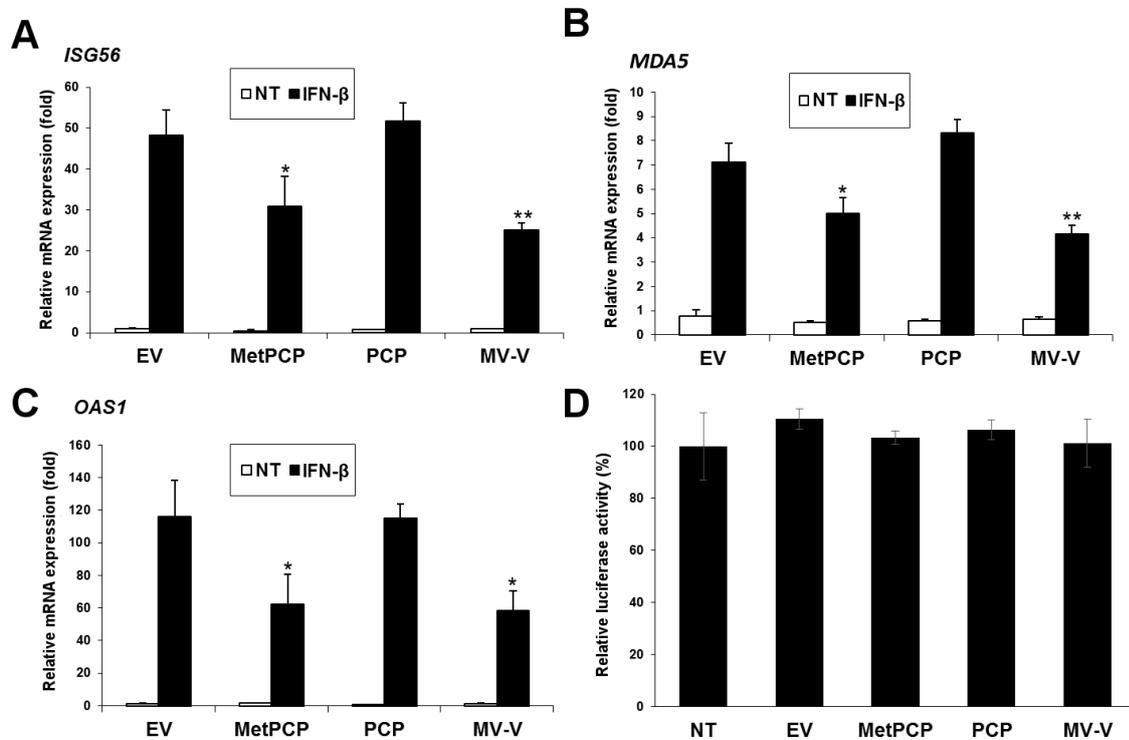


FIG 2. Expression of MetPCP of HEV ORF1 downregulates mRNA levels of several ISGs following IFN- β treatment. (A-C) 293T cells were transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP, PCP or MV-V fused to 3 FLAG tags. Forty h post-transfection, cells were stimulated for 6 h with 500 UI/ml of IFN- β . Total RNA was extracted and expression of the mRNA coding for ISG56 (A), MDA5 (B) and OAS1 (C) were measured by RT-qPCR. *GAPDH* was used as reference gene. Data are presented as fold induction (\pm standard deviations) relative to the non-stimulated EV control. Results are representative of one experiment and were reproduced in 2 independent experiments performed in triplicates. *, P < 0.05; **, P < 0.005 compared to EV control for treated samples (unpaired *t* tests). (B) Cell viability assays at 40 h post-transfection. 293T cells were transfected or not (NT) with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP, PCP or MV-V fused to 3 FLAG tags. Forty h after transfection, cells were lysed and cell viability determined using a luminescent-based assay. Luciferase activities (\pm standard deviations) are expressed as percentage relative to non-transfected cells. Results represent the mean of 3 independent experiments performed in triplicates.

MetPCP of HEV ORF1 interferes with the JAK/STAT pathway after IFN- β treatment.

To better understand the mechanisms involved in the inhibition of the IFN-I response by MetPCP, we examined whether the viral protein is able to interfere with the JAK/STAT pathway. First, we assessed the ability of MetPCP to modulate STAT1 nuclear translocation after IFN- β stimulation by immunofluorescence. In the absence of IFN treatment, STAT1 was localized mainly in the cytoplasm of 293T cells transfected with an empty vector or plasmids coding for FLAG-tagged MetPCP, PCP or MV-V (Fig. 3A). IFN- β treatment led to the nuclear translocation of STAT1 in around 85% of cells transfected with an empty vector or a plasmid coding for PCP (Fig. 3A and 3B). In contrast, STAT1 translocated into the nucleus of around 65% of cells expressing MetPCP (Fig. 3B). In the remaining cells, STAT1 distribution remained diffuse in the cytoplasm (Fig. 3A), suggesting that MetPCP interferes with STAT1 nuclear translocation. As expected, expression of MV-V inhibited STAT1 translocation into the nucleus upon IFN- β treatment (Fig. 3A and 3B). Similar results were obtained in cells expressing MetPCP fused to a GFP tag (Fig. 3C), indicating that the nature of the tag fused to MetPCP did not affect its antiviral function. In contrast, significantly less STAT1 was found in the nuclei of cells expressing ORF1 fused to a GFP tag (Fig. 3C) as compared to cells expressing a FLAG-tagged version of ORF1 (Fig. 3B). It is possible that ORF1 is expressed and/or processed more efficiently when fused to a GFP tag, then enabling the detection of an inhibitory effect of ORF1 and/or its cleavage products on the JAK/STAT pathway. Similarly,

GFP-PCP affected STAT1 nuclear translocation while FLAG-PCP did not (Fig. 3), suggesting that PCP might be a weak inhibitor of IFN- β -driven STAT1 nuclear translocation.

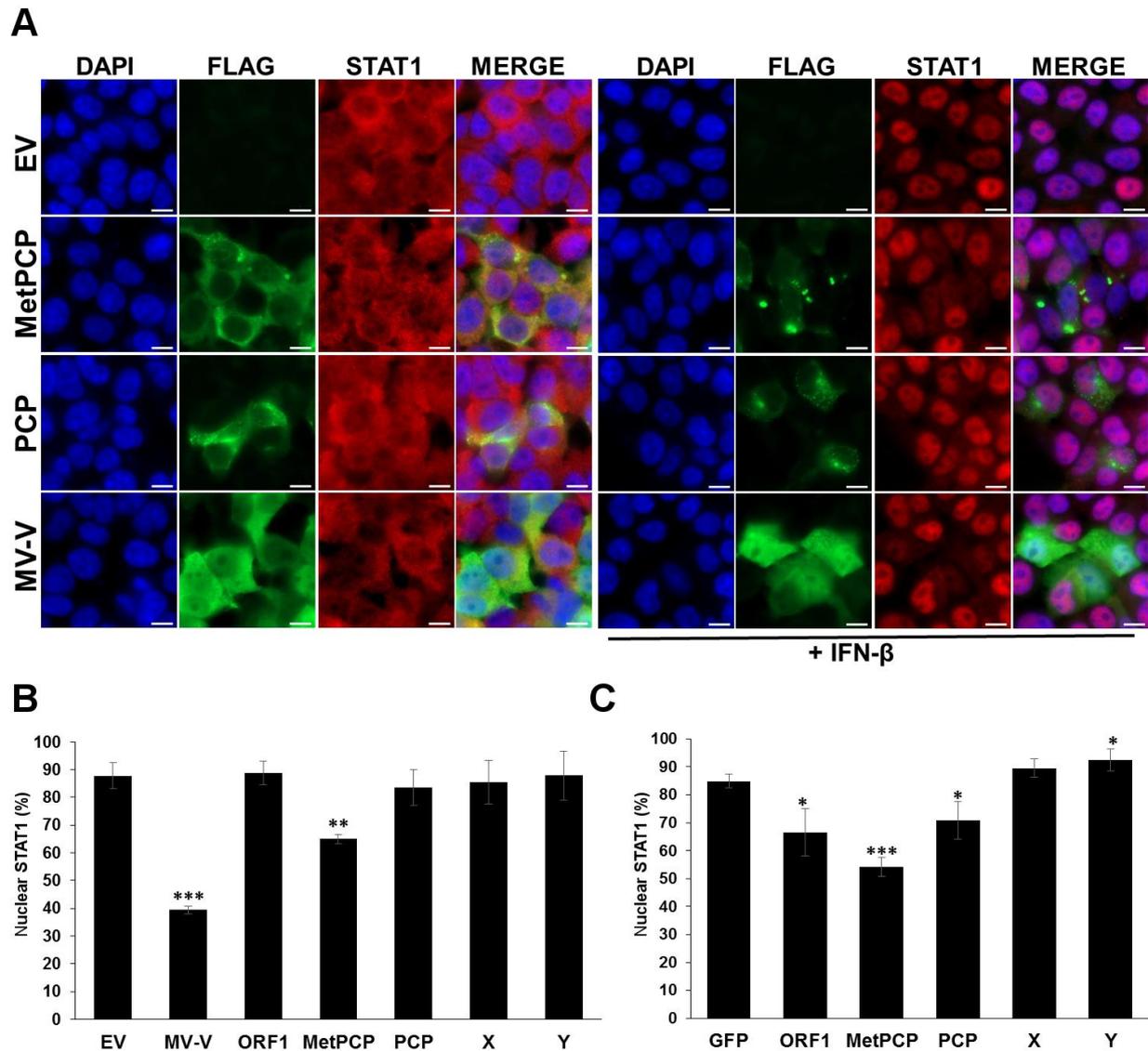


FIG 3. Expression of MetPCP of HEV ORF1 decreases STAT1 nuclear translocation upon IFN- β treatment. (A) 293T cells were transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP, PCP or MV-V fused to 3 FLAG tags. Twenty four h post-transfection, cells were stimulated or not for 30 min with 1000 UI/ml of IFN- β . Cells were then washed, fixed and stained with primary antibodies raised against STAT1 and FLAG, followed by fluorescent dye-conjugated secondary antibodies. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), FLAG (green) and STAT1 (red) was visualized by microscopy (magnification, x630). Scale bars, 10 μ m. (B) STAT1 localization was visualized after immunostaining as described in (A) in 293T cells transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for ORF1, MetPCP, PCP, X, Y or MV-V fused to a FLAG tag. For each condition, STAT1 localization was determined in 58 to 181 cells expressing the corresponding FLAG-tagged protein (except for the EV control for which 356 to 384 cells were randomly assessed). The mean percentage (\pm standard deviation) of cells showing a predominant nuclear localization of STAT1 from 3 independent experiments is shown. ** p <0.005 ; *** p <0.0005 compared to EV control for treated samples (unpaired t tests). (C) 293T cells were transfected with a plasmid coding for GFP, GFP-ORF1, GFP-MetPCP, GFP-PCP, GFP-X or GFP-Y. 24 h post-transfection, cells were stimulated with 1000 UI/ml of IFN- β . Cells were then washed, fixed and stained with a primary antibody specific for STAT1, followed by a fluorescent dye-conjugated secondary antibody and nuclei stained with DAPI. For each condition, STAT1 localization was determined in 91 to 255 cells expressing the GFP-tagged protein.

The mean percentage (\pm standard deviation) of cells showing a predominant nuclear localization of STAT1 from 3 independent experiments is shown. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$ compared to GFP control for treated samples (unpaired *t* tests).

MetPCP of HEV ORF1 inhibits STAT1 but not STAT2 phosphorylation after IFN- β treatment. To investigate which step of the JAK/STAT pathway is targeted by MetPCP, we then assessed the phosphorylation status of STAT1 and STAT2 after IFN- β treatment by immunoblot analysis in 293T cells expressing MetPCP or PCP. Cells expressing MV-V were used as a positive control. As shown in Fig. 4A, the level of phosphorylated STAT1 detected after IFN- β treatment was significantly reduced in 293T cells expressing MetPCP in comparison to cells transfected with an empty vector or expressing PCP (Fig. 4A and 4B). No change in the total level of STAT1 was observed in cells expressing MetPCP, indicating that the viral protein did not interfere with the expression or stability of STAT1. Moreover, no difference was observed in the level of phosphorylated STAT2 (Fig. 4A), suggesting that MetPCP interferes with the activation of STAT1 but not STAT2 following IFN-I treatment.

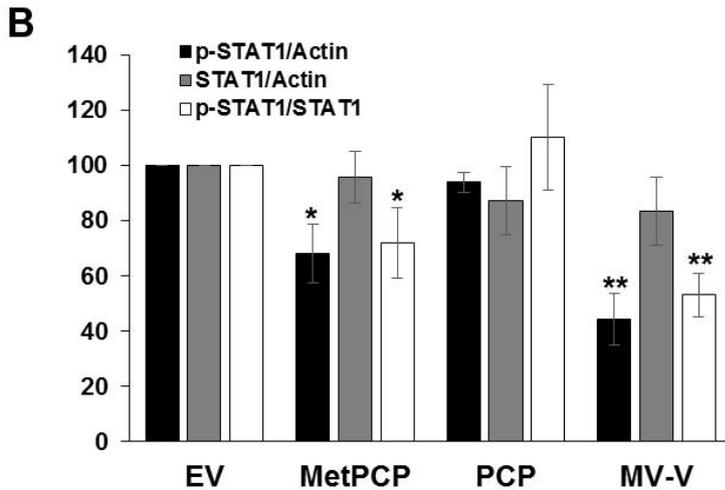
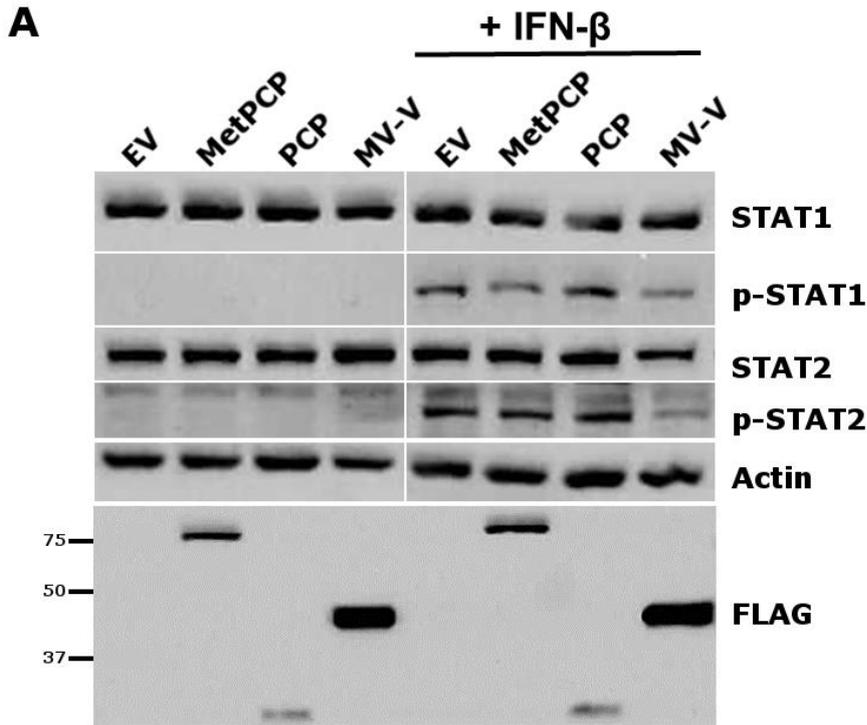


FIG 4. Expression of MetPCP of HEV ORF1 inhibits STAT1 but not STAT2 phosphorylation upon IFN- β treatment. (A) 293T cells were transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP, PCP or MV-V fused to 3 FLAG tags. Twenty four h post-transfection, cells were stimulated for 30 min with 500 UI/ml of IFN- β . Cell lysates were extracted and used for the detection of FLAG-tagged proteins, total STAT1, phosphorylated STAT1 (p-STAT1), total STAT2 and phosphorylated STAT2 (p-STAT2) by immunoblotting. Actin served as internal control. (B) Band intensities were quantified using ImageJ software and relative levels of STAT1, p-STAT1 and actin were determined for each treated sample. Ratio between p-STAT1 and actin, STAT1 and actin, and p-STAT1 and STAT1 were calculated and expressed as relative percentage in comparison to the EV control. The mean percentage (\pm standard deviation) of 4 independent experiments is presented. *, P < 0.05; **, P < 0.005 compared to EV control for IFN-treated samples (unequal variances *t* tests).

MetPCP of HEV ORF1 inhibits more efficiently the JAK/STAT pathway after IFN-I than IFN-II treatment. To determine whether MetPCP has the ability to inhibit the

JAK/STAT pathway in response to IFN-II, we assessed the effect of MetPCP expression on STAT1 nuclear translocation after IFN- γ stimulation by immunofluorescence. IFN- γ treatment led to the nuclear translocation of STAT1 in around 94% of cells transfected with an empty vector and around 78% of cells expressing MetPCP (Fig. 5A), thus suggesting that MetPCP is able to inhibit STAT1 translocation in response to IFN- γ . However, this antagonist effect was less pronounced than the one observed after IFN- β treatment for which 64% of cells expressing MetPCP displayed a predominant localization of STAT1 in the nucleus (Fig. 5A). We also assessed the ability of MetPCP to inhibit STAT1 phosphorylation after IFN-II treatment. Cells expressing MetPCP were treated with IFN- γ for 30 minutes and the level of phosphorylated STAT1 was assessed by immunoblotting. As shown in Fig. 5B and 5C, no inhibition of STAT1 phosphorylation was detected in cells expressing MetPCP following IFN- γ treatment. These results suggest that MetPCP has a limited inhibitory impact on the JAK/STAT pathway after IFN-II treatment. Similarly to MetPCP, MV-V caused a slight decrease of STAT1 translocation (Fig. 5A) and did not inhibit STAT1 phosphorylation (Fig. 5B and 5C) after IFN- γ treatment. These results are in agreement with several studies showing that MV-V is not able to inhibit IFN- γ driven STAT1 phosphorylation (37) and is more efficient at antagonizing the response to IFN-I in comparison to IFN-II (38–40).

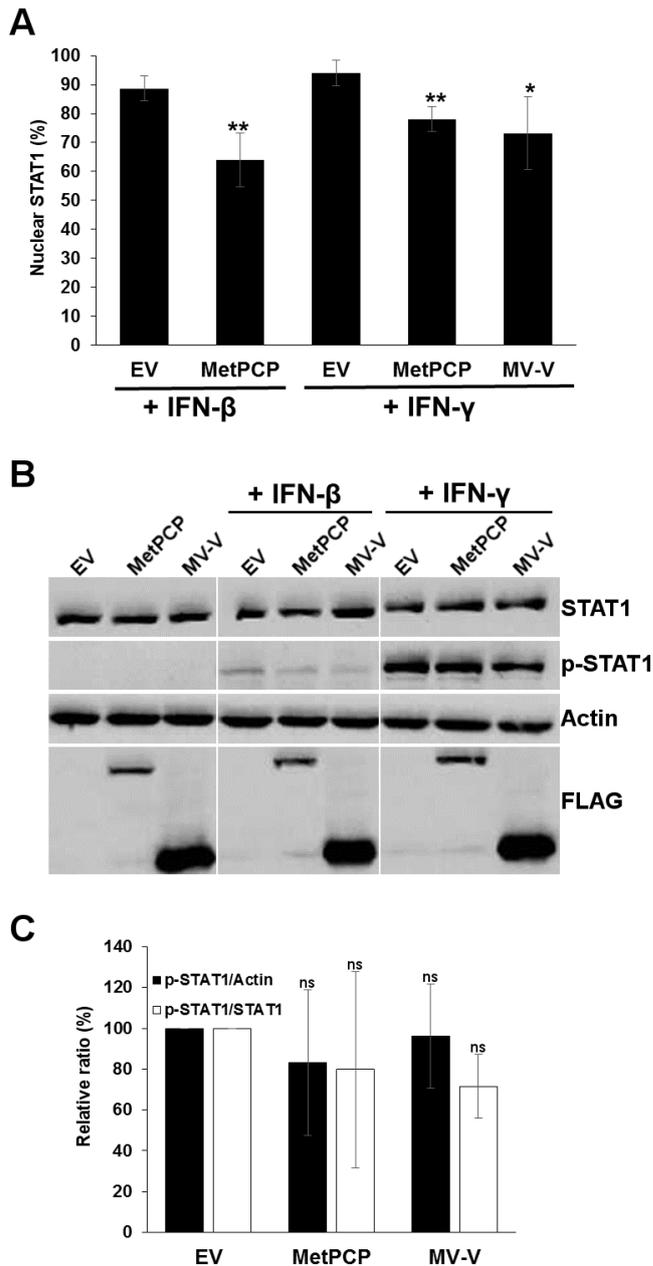


FIG 5. Expression of MetPCP of HEV ORF1 inhibits weakly STAT1 translocation but not STAT1 phosphorylation in response to IFN-II. (A) 293T cells were transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP or MV-V fused to a FLAG tag. Twenty four h post-transfection, cells were stimulated for 30 min with 1000 UI/ml of IFN- β or 250 ng/ml of IFN- γ . Cells were then washed, fixed and stained with primary antibodies raised against STAT1 and FLAG, followed by fluorescent dye-conjugated secondary antibodies. STAT1 localization was determined in 64 to 219 cells expressing the corresponding FLAG-tagged protein (except for the EV control for which 305 to 346 cells were randomly assessed). The mean percentage (\pm standard deviation) of cells showing a predominant nuclear localization of STAT1 from 4 independent experiments is shown. * p <0.05; ** p <0.005 compared to EV control for treated samples (unpaired t tests). (B) 293T cells were transfected with a pCINeo-3 \times FLAG empty vector (EV) or a plasmid coding for MetPCP, PCP or MV-V fused to 3 FLAG tags. Twenty four h post-transfection, cells were stimulated for 30 mins with 500 UI/ml of IFN- β or 250 ng/ml of IFN- γ . Cell lysates were extracted and used for the detection of FLAG-tagged proteins, total STAT1, phosphorylated STAT1 (p-STAT1) and actin as internal control by immunoblotting. (C) Band intensities were quantified using ImageJ software and relative level of STAT1, p-STAT1 and actin were determined for each sample treated with 125 or 250 ng/ml of IFN- γ . Ratio between p-STAT1 and actin and p-STAT1 and STAT1 were then calculated and expressed as relative percentage in comparison to the EV control. The mean percentage (\pm standard deviation) of 3 independent experiments is presented. ns, not significant compared to EV control (unequal variances t tests).

Discussion

Most viruses encode viral proteins that have multiple functions and counteract the host antiviral response at several steps of the IFN signaling pathway (26). As for HEV, a recent study has reported that the PCP domain and macrodomain of HEV ORF1 are both antagonists of IFN signaling. The macrodomain was shown to interfere with IRF-3 phosphorylation and PCP to deubiquitinate components of the RLR pathway such as RIG-I and TANK binding kinase 1 (TBK-1) in 293T cells (27). Here, we showed for the first time that a domain of HEV ORF1 is able to inhibit the IFN-I response by targeting the JAK/STAT pathway. This work provides further evidence that domains of the non-structural polyprotein ORF1 are able to counteract the host IFN system at different steps of the IFN signaling pathways.

We now show that a protein encompassing the predicted Met, Y and PCP domains of HEV ORF1 inhibits ISRE promoter activation and the expression of several ISGs in response to IFN- β . Further investigations revealed that MetPCP interfered with IFN- β -induced STAT1 nuclear translocation and phosphorylation, thus indicating that MetPCP targets the JAK/STAT pathway. Moreover, MetPCP seemed to act specifically on STAT1 activation as STAT2 phosphorylation was not affected by the expression of the ORF1 product. STAT1 is a key component of the JAK/STAT pathway that is targeted by a large number of viral proteins and multiple mechanisms of inhibition have been described (26, 41). Some viral proteins interact directly with STAT1 to block its phosphorylation while others act as phosphatase to dephosphorylate STAT1 or sequester STAT1 in the cytoplasm or induce its degradation (26, 41). Here, we found that MetPCP did not affect total level of STAT1 suggesting that MetPCP is not able to degrade the cellular protein or affect its expression. However, we found that MetPCP was able to inhibit STAT1 phosphorylation in response to IFN- β but not IFN- γ , thus suggesting that MetPCP interferes more specifically with a component or regulator of the JAK/STAT pathway specific to IFN-I signaling. Activation of the JAK/STAT pathway by

type II IFN involves a specific receptor (IFN α 1R) and the phosphorylation of JAK1, JAK2 and STAT1 but not TYK2 and STAT2 that are activated by IFN-I only. One can then hypothesize that MetPCP interferes with the recruitment of STAT1 to the IFN α 1R subunits or with the phosphorylation of STAT1 by TYK2. MetPCP could also interfere with cellular proteins involved in the regulation of IFN-I-driven STAT1 phosphorylation. Such regulators include receptor for activated protein kinase C (RACK1), an adaptor molecule that recruits unphosphorylated STAT1 (but not STAT2 or STAT3) to the IFN α 1R receptor (42). Several viral proteins have been shown to target RACK1 in order to modulate STAT1 activation (37, 43). For example, the C and V proteins of measles virus were found to form a complex with RACK1, STAT1 and IFN α 1R subunit and to interfere with IFN- α but not IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 (37).

We also found that only the ORF1 product containing the predicted functional Met, Y and PCP domains was able to inhibit ISRE promoter activation and not Met, Y or PCP alone or the combination of Met and Y or Y and PCP. A previous study has reported that a putative zinc-finger domain is present in Met (between amino acid 73 and 94) that might be critical for the enzymatic activity of PCP (34). Many viral cysteine proteases require a zinc-binding finger motif to be catalytically active and/or to function as antagonist of the IFN response. For example, the zinc-finger domain of Nsp1- α of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is critical for the viral protein to inhibit IFN- β synthesis (44). One can envisage that the enzymatic activity of HEV PCP is dependent on a zinc-finger domain present in Met and is important for the inhibitory action of MetPCP. This would then explain why MetPCP is able to inhibit the JAK/STAT pathway but not, or less efficiently, PCP alone. In future work, it would be interesting to assess the inhibitory effect of MetPCP mutants with a disrupted zinc-binding finger motif to check this hypothesis. It would also be of interest to

test the effect of Met and PCP co-expression on ISRE promoter activation to determine whether Y is needed for the antagonist function of MetPCP.

PCP domains encoded by several RNA-positive viruses including members of the *Togaviridae* and *Coronaviridae* family are able to deconjugate ubiquitin and/or ISG15 and modulate the host innate immune response (28, 32, 33). A study has reported that an ORF1 product containing Met, Y and PCP of HEV (amino acid 22 to 592 of ORF1) expressed using a prokaryotic system was able to hydrolyze ISG15 from conjugated substrates more efficiently than ubiquitin and to carry out deISGylation of ISGylated cellular proteins (34). ISG15 is an IFN-induced ubiquitin-like protein that plays an important role in the host antiviral response. Its expression negatively regulates the replication of several viruses such as Sindbis virus, influenza virus or herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (45). Interestingly, STAT1 is ISGylated after treatment with synthetic double-stranded RNA or with IFN- β and ISGylation was suggested to regulate STAT1 activation (46, 47). MetPCP might therefore interfere with STAT1 activation via its desISGylating activity. Further work is needed to determine whether the deISGylation activity of MetPCP is required for its function as an antagonist of the IFN-I response. ISG15 was recently shown to be up-regulated during HEV infection *in vitro* and *in vivo* and to play a role in the regulation of IFN-I signaling during HEV replication (48). ISG15 seems then to act as an important immunoregulator during HEV infection and thus, it would not be surprising that HEV has evolved mechanisms to modulate its activity.

Until recently, very few studies were undertaken to understand how HEV interacts with the immune system of its host. Data from this study expand our knowledge on the mechanisms evolved by HEV to counteract the IFN response and provide additional evidence that ORF1 plays multiple roles in this evasion strategy. A better understanding of the signaling pathways targeted by HEV proteins to modulate the host antiviral response will help to identify new

therapeutic targets and improve the prevention and control of HEV infection. This is critical as no anti-HEV drug has been approved yet and will be particularly relevant for the treatment of chronic cases of hepatitis E in immunosuppressed patients.

Materials and methods

Cells. Human embryonic kidney 293T cells were grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% pyruvate and 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PS). Cells were maintained at 37°C in 95% air/5% CO₂.

HEV *ORF1* cloning and plasmid constructs. The serum of a French patient suffering from severe hepatitis E was provided by the Reference National Centre for HEV, France. A strain of HEV-3F was extracted from this sample using QiAmp viral RNA kit (Qiagen). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed with a Primescript reverse transcriptase (Takara, Ozyme). A total of seven overlapping fragments were amplified using the hot start high-fidelity Phusion polymerase (Finnzymes, Ozyme) or a 5'RACE and 3' RACE kit (Invitrogen, Life Technologies) and cloned into the plasmid pCR2.1. The 7 overlapping fragments were then digested with restriction enzymes and ligated 2 by 2 with the T4 DNA ligase (Takara, Ozyme) to generate a DNA fragment corresponding to the full-length viral genome downstream of a T7 promoter and a unique *Swa*I restriction site. This fragment was subsequently cloned into a pUC19 vector to generate pUC19-FR-HuFulHEV3f. The complete nucleotide sequence coding for ORF1 was then determined by sequencing (Genbank accession number MG197988). The position of the different putative functional domains of ORF1 was identified by comparison with a previous computer-based analysis (3). DNA sequences coding for full-length ORF1 as well as MetPCP, Y, PCP, X, Met, MetY and YPCP (Fig. 1A) were amplified using pUC19-FR-HuFulHEV3f as a template and specific primers (Table 1) by standard PCR using the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo

Scientific). The PCR products were then cloned by *in vitro* recombination into pDONR207 (Gateway system, Invitrogen) as described previously (36). These coding sequences were subsequently recombined into a translation optimized pCINeo-3×FLAG (49) or a pEGFP-C1 (Clontech) expression vector using the Gateway cloning procedure (Invitrogen).

The modified pCI-Neo empty vector (50), the p3Flag-V plasmid coding for the V protein of a Schwarz strain of measles virus (MV) fused to a 3xFLAG tag (36) and the pCR3.1/SOCS-3 plasmid (35) have been described previously.

Gene product	Primers
<i>ORF1</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGCCACCAGTTCATT R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCATTCCAACCTCTGTATGAT
<i>Met</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGCCACCAGTTCATT R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGATCCATGCACGAAGTATAG
<i>Y</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCGCGCCGTCGTGACTTATGAG R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGCACTGTGCATAAACTGTAG
<i>PCP</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCAGTGCCGCCGCTGGCTCTCA R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTACAAAACATACTGTTCCGGGACCGTTG
<i>MetPCP</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGCCACCAGTTCATT R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTACAAAACATACTGTTCCGGGACCGTTG
<i>X</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCGCCGCACTCGCCGGCTCCTT R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGCCGGCGCAAGCACGACCCAC
<i>MetY</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGCCACCAGTTCATT R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGCACTGTGCATAAACTGTAG
<i>YPCP</i>	F : GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCGCGCCGTCGTGACTTATGAG R : GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTACAAAACATACTGTTCCGGGACCGTTG
<i>ISG56</i>	F : GGACAGGAAGCTGAAGGAG R : AGTGGGTGTTTCCTGCAA
<i>MDA5</i>	F : ACACGTTCTTTGCGATTTC R : ACCAAATACAGGAGCCATGC
<i>OAS1</i>	F : CATCCGCCTAGTCAAGCACTG R : CACCACCAAGTTTCCTGTAG
<i>GADPH</i>	F : GGTCCGAGGTCAACGGATTTG R : ACTCCACGACGTACTCAGCG

Table 1. Primers used for the amplification of DNA sequences coding for full-length or parts of HEV-3 ORF1 and for the quantification of ISG expression by RT-qPCR. F: forward primer, R: reverse primer.

Reagents and antibodies. Recombinant human IFN- β 1a was purchased from PBL Interferon Source and recombinant human IFN- γ from PeproTech. The mouse anti-actin monoclonal antibody (clone AC-40) and the mouse anti-FLAG (clone M2) were from Sigma-Aldrich. Polyclonal antibodies against STAT1 (06-501), phospho-STAT1 (Tyr701) (07-307) and phospho-STAT2 (Tyr 689) (07-224) were from Millipore. The rabbit polyclonal antibody against STAT2 (SC-476) was from Santa-Cruz Biotechnology.

Transfections. 293T cells were transfected with plasmids using JetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) according to the manufacturer's instructions.

Cell viability test. 293T cells were seeded into a 96-well plate (7.5×10^4 cells/well) and transfected one day later with the different p3xFLAG constructs. 24 h or 40 h post-transfection, cells were lysed and cell viability was determined using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay (Promega) according to the manufacturer's recommendations. This assay is based on ATP quantification as indicator of metabolically active cells.

Immunoblot analysis. Cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris HCl pH 8.8, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 and 0.1% sodium dodecyl sulphate supplemented with cocktails of protease and phosphatase inhibitors) as previously described (51). Insoluble material was centrifuged at 16,000 g for 20 min at 4°C and discarded. Total protein concentration of the soluble fraction was determined by Micro BCA™ Protein assay (Thermo Scientific, Pierce). Equal amount of protein extract was reduced by heating in the presence of β-mercaptoethanol and resolved by 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by transfer to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham). Membranes were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry milk and 0.05% Tween-20. The membrane was then incubated with the required dilution of specific antibodies. Bound primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Pierce) and an enhanced luminol-based chemiluminescent detection system. Band intensity was measured on scanned immunoblot images using the ImageJ software.

Reporter gene assay. 293T cells (4×10^5 cells/well) were seeded in 24-well plates. 24 h later, cells were transfected with 100 ng of firefly luciferase ISRE reporter plasmid containing the ISRE enhancer element upstream of the firefly luciferase gene (pISRE-Luc, Clontech), 50 ng of the plasmid expressing β-galactosidase under the control of Rous sarcoma virus promoter

(pRSV- β Gal) for normalization of the data and 250 ng of a plasmid coding for ORF1 or its domains of interest fused to 3 FLAG tags at their amino-terminal end or 250 ng of a modified pCI-Neo empty vector as negative control or 250 ng pCR3.1/SOCS-3 as positive control. 18 h later, the supernatant was removed and replaced with fresh complete medium containing 1,000 IU/ml of IFN- β . Seven h later, cells were lysed in luciferase lysis buffer (25 mM Tris pH 7.8, 0.8 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 15% glycerol). Firefly luciferase activity was determined using the Bright-Glo™ luciferase assay system (Promega). β -galactosidase activity was determined by mixing 50 μ l of cell lysate with 50 μ l of β -galactosidase assay buffer (200 mM Na₂HPO₄ pH7.3, 1.33 mg/ml ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG), 2 mM MgCl₂ and 0.1 M β -mercaptoethanol) and measuring the optical density of the mixture at 450 nm. The normalized luciferase activity was calculated for each sample by dividing the luciferase activity by the β -galactosidase activity.

RNA extraction, reverse transcription (RT) and real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Total RNA was extracted using the RNeasy minikit (Qiagen) including a digestion step on column with DNase I (Qiagen). A second digestion step was performed using a TURBO DNase (Ambion) and the RNA cleaned up on a column using the RNeasy minikit (Qiagen). RT was done using 500 ng of RNA with PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc.) according to the manufacturer's instruction. RT-qPCR was performed on 2 μ l of cDNA using the SYBR Green Master Mix kit (Roche) and specific primers (Table 1). A LightCycler 96 apparatus (Roche) was used for sample analysis. Samples were denatured for 15 min at 95°C, then DNA was amplified with 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The final extension was followed by cooling at 40°C for 30 s. Relative quantification was realized using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (52). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous control for normalization. The mean ΔCT obtained in non-stimulated cells transfected with the empty vector was used as the calibrator.

Immunostaining and fluorescent microscopy. Cells were seeded onto 12-mm-diameter coverslips previously coated with poly-lysine and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated in blocking buffer (0.5% BSA in PBS). The appropriate dilution of primary antibodies was then added for 1 h at room temperature. Cells were then washed several times in PBS and DyLight™ 488 anti-mouse and DyLight™ 550 anti-rabbit secondary antibodies (Thermo Scientific) were used to detect bound primary antibodies. Samples were mounted in Mowiol containing 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich). Microscopy was carried out with an Axio observer Z1 fluorescent microscope (Zeiss) and images were acquired using the Zen 2012 software.

Statistical analyses. Unpaired *t* test or an unequal variances *t* test were used to analyze the data. Differences were considered to be significant if the *P* value was < 0.05.

Accession number. The ORF1 sequence of the HEV-3 strain FR-HuFulmHEV3f cloned in this study have been deposited in the GenBank database under accession number MG197988.

Acknowledgments

This work was funded by the European Union Seventh Framework Programme PREDEMICS (grant number 278433) and by the Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR-16-CE35-0002-01). EB PhD studentship was supported by the DIM Malinf from the Conseil Régional d'Ile-de-France (Grant DIM140079). We thank Jérôme Bouquet, Pierre-Olivier Vidalain, Damien Vitour, Grégory Caignard, Yves Jacob, Frédéric Tangy and Christoph Auernhammer for providing reagents and for useful discussions.

References

1. Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng X-J, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA. 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 95:2223–2232.
2. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 161:47–58.
3. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8259–8263.
4. Pavio N, Meng X-J, Doceul V. 2015. Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* 10:34–41.
5. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. 2016. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses* 8.
6. Kamar N, Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Izopet J. 2014. Hepatitis E virus: Chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*.
7. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, Radenne S, Coilly A, Garrigue V, D’Alteroche L, Buchler M, Couzi L, Lebray P, Dharancy S, Minello A, Hourmant M, Roque-Afonso A-M, Abravanel F, Pol S, Rostaing L, Mallet V. 2014. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 370:1111–1120.
8. Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. 1993. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 366:583–585.
9. Gauzzi MC, Velazquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S. 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* 271:20494–20500.
10. Krishnan K, Yan H, Lim JT, Krolewski JJ. 1996. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene* 13:125–133.
11. Plataniias LC, Colamonici OR. 1992. Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of its receptor. *J Biol Chem* 267:24053–24057.
12. Plataniias LC, Uddin S, Colamonici OR. 1994. Tyrosine phosphorylation of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. Interferon-beta selectively induces tyrosine phosphorylation of an alpha subunit-associated protein. *J Biol Chem* 269:17761–17764.
13. Zhao W, Lee C, Piganis R, Plumlee C, de Weerd N, Hertzog PJ, Schindler C. 2008. A conserved IFN-alpha receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs. *J Immunol* 180:5483–5489.
14. Abramovich C, Shulman LM, Ratovitski E, Harroch S, Tovey M, Eid P, Revel M. 1994. Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. *EMBO J* 13:5871–5877.
15. Yan H, Krishnan K, Greenlund AC, Gupta S, Lim JT, Schreiber RD, Schindler CW, Krolewski JJ. 1996. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J* 15:1064–1074.
16. Schoggins JW, Rice CM. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* 1:519–525.
17. Najjar I, Fagard R. 2010. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie* 92:425–444.
18. Devhare PB, Chatterjee SN, Arankalle VA, Lole KS. 2013. Analysis of antiviral response in human epithelial cells infected with hepatitis E virus. *PLoS ONE* 8:e63793.

19. Lee YH, Ha Y, Chae C. 2010. Expression of interferon-alpha and Mx protein in the livers of pigs experimentally infected with swine hepatitis E virus. *J Comp Pathol* 142:187–192.
20. Moal V, Textoris J, Ben Amara A, Mehraj V, Berland Y, Colson P, Mege J-L. 2013. Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis* 207:125–132.
21. Yu C, Boon D, McDonald SL, Myers TG, Tomioka K, Nguyen H, Engle RE, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH. 2010. Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol* 84:11264–11278.
22. Zhang F, Qi Y, Harrison TJ, Luo B, Zhou Y, Li X, Song A, Huang W, Wang Y. 2014. Hepatitis E genotype 4 virus from feces of monkeys infected experimentally can be cultured in PLC/PRF/5 cells and upregulate host interferon-inducible genes. *J Med Virol* 86:1736–1744.
23. Zhou X, Xu L, Wang W, Watashi K, Wang Y, Sprengers D, de Ruiter PE, van der Laan LJW, Metselaar HJ, Kamar N, Peppelenbosch MP, Pan Q. 2016. Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 23:294–304.
24. Todt D, François C, Anggakusuma null, Behrendt P, Engelmann M, Knegeendorf L, Vieyres G, Wedemeyer H, Hartmann R, Pietschmann T, Duverlie G, Steinmann E. 2016. Antiviral Activities of Different Interferon Types and Subtypes against Hepatitis E Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2132–2139.
25. Dong C, Zafrullah M, Mixson-Hayden T, Dai X, Liang J, Meng J, Kamili S. 2012. Suppression of interferon- α signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* 55:1324–1332.
26. Hoffmann H-H, Schneider WM, Rice CM. 2015. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol* 36:124–138.
27. Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khatrar SK, Fredericksen B, Zhang Y-J. 2014. Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J Virol* 88:11924–11932.
28. Clementz MA, Chen Z, Banach BS, Wang Y, Sun L, Ratia K, Baez-Santos YM, Wang J, Takayama J, Ghosh AK, Li K, Mesecar AD, Baker SC. 2010. Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases. *J Virol* 84:4619–4629.
29. Fehr AR, Channappanavar R, Jankevicius G, Fett C, Zhao J, Athmer J, Meyerholz DK, Ahel I, Perlman S. 2016. The Conserved Coronavirus Macrodomein Promotes Virulence and Suppresses the Innate Immune Response during Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *MBio* 7.
30. Kuri T, Eriksson KK, Putics A, Züst R, Snijder EJ, Davidson AD, Siddell SG, Thiel V, Ziebuhr J, Weber F. 2011. The ADP-ribose-1''-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J Gen Virol* 92:1899–1905.
31. Park E, Griffin DE. 2009. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* 388:305–314.
32. Sun Z, Li Y, Ransburgh R, Snijder EJ, Fang Y. 2012. Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15. *J Virol* 86:3839–3850.
33. Wang G, Chen G, Zheng D, Cheng G, Tang H. 2011. PLP2 of mouse hepatitis virus A59 (MHV-A59) targets TBK1 to negatively regulate cellular type I interferon signaling pathway. *PLoS ONE* 6:e17192.
34. Karpe YA, Lole KS. 2011. Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J Gen Virol* 92:2088–2092.

35. Vlotides G, Sørensen AS, Kopp F, Zitzmann K, Cengic N, Brand S, Zachoval R, Auernhammer CJ. 2004. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun* 320:1007–1014.
36. Caignard G, Guerbois M, Labernardière J-L, Jacob Y, Jones LM, Infectious Mapping Project I-MAP, Wild F, Tangy F, Vidalain P-O. 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* 368:351–362.
37. Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. 2003. Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology* 306:135–146.
38. Takeuchi K, Kadota S, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545:177–182.
39. Chinnakannan SK, Nanda SK, Baron MD. 2013. Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PLoS ONE* 8:e57063.
40. Ramachandran A, Parisien J-P, Horvath CM. 2008. STAT2 is a primary target for measles virus V protein-mediated alpha/beta interferon signaling inhibition. *J Virol* 82:8330–8338.
41. Versteeg GA, García-Sastre A. 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* 13:508–516.
42. Usacheva A, Smith R, Minshall R, Baida G, Seng S, Croze E, Colamonici O. 2001. The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J Biol Chem* 276:22948–22953.
43. Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N. 2002. Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. *J Virol* 76:12676–12682.
44. Shi X, Zhang X, Wang F, Wang L, Qiao S, Guo J, Luo C, Wan B, Deng R, Zhang G. 2013. The zinc-finger domain was essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein-1 α to inhibit the production of interferon- β . *J Interferon Cytokine Res* 33:328–334.
45. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, García-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch K-P, Horak I, Virgin HW 4th. 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1371–1376.
46. Giannakopoulos NV, Luo J-K, Papov V, Zou W, Lenschow DJ, Jacobs BS, Borden EC, Li J, Virgin HW, Zhang D-E. 2005. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336:496–506.
47. Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang D-E. 2003. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem* 278:16608–16613.
48. Sooryanarain H, Rogers AJ, Cao D, Haac MER, Karpe YA, Meng X-J. 2017. ISG15 modulates type-I interferon signaling and antiviral response during hepatitis E virus replication. *J Virol*.
49. Mendoza J-A, Jacob Y, Cassonnet P, Favre M. 2006. Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. *J Virol* 80:12420–12424.

50. Caignard G, Lucas-Hourani M, Dhondt KP, Labernardière J-L, Petit T, Jacob Y, Horvat B, Tangy F, Vidalain P-O. 2013. The V protein of Tioman virus is incapable of blocking type I interferon signaling in human cells. *PLoS ONE* 8:e53881.
51. Doceul V, Chauveau E, Lara E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, Vitour D. 2014. Dual modulation of type I interferon response by Bluetongue virus. *J Virol*.
52. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

I- Recherche des partenaires potentiels du domaine MetPCP parmi les protéines de la voie JAK-STAT par GPCA.

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV-3 inhibe la phosphorylation de STAT1 et son entrée dans le noyau, conduisant ainsi à une diminution de l'expression de certains ISGs. Cependant, le mécanisme responsable de cette inhibition n'a pas encore été identifié. Une hypothèse possible serait, qu'en se liant à STAT1 ou une autre protéine de la voie JAK-STAT, le domaine MetPCP inhiberait cette voie de signalisation. Nous avons donc réalisé un crible en utilisant la méthode de la GPCA (pour *Gaussia luciferase princeps complementation assay*) afin d'identifier, au sein de la voie JAK-STAT, des partenaires potentiels d'interaction directe avec le domaine MetPCP.

A- Matériels et méthodes : la technique de la GPCA

La technique de la GPCA est une méthode permettant d'évaluer l'interaction entre deux protéines en utilisant les propriétés de la *Gaussia luciférase* (Figure 35). L'interaction d'une protéine A couplée à la moitié N-terminale de la luciférase (Gluc1) avec une protéine B couplée à la moitié C-terminale de la luciférase (Gluc2) conduit à la reconstruction de la luciférase *Gaussia* et donc restaure son activité qui peut être mesurée par luminescence. La NLR (pour *normalized luminescence ratio*) correspond au calcul de la valeur de luminescence normalisée. La normalisation est réalisée en divisant la valeur obtenue pour l'interaction protéine A + protéine B par les valeurs de l'interaction de la protéine A avec le Gluc1 vide (pSPICA-N1) et de la protéine B avec le Gluc2 vide (pSPICA-N2). Dans un crible portant sur de nombreuses interactions connues, il a été considéré que la NLR minimum représentant des interactions reconnues entre des protéines était de 3.5⁵⁷⁴. Cependant, ce seuil peut également varier en fonction du bruit de fond généré à chaque expérience et des protéines criblées.

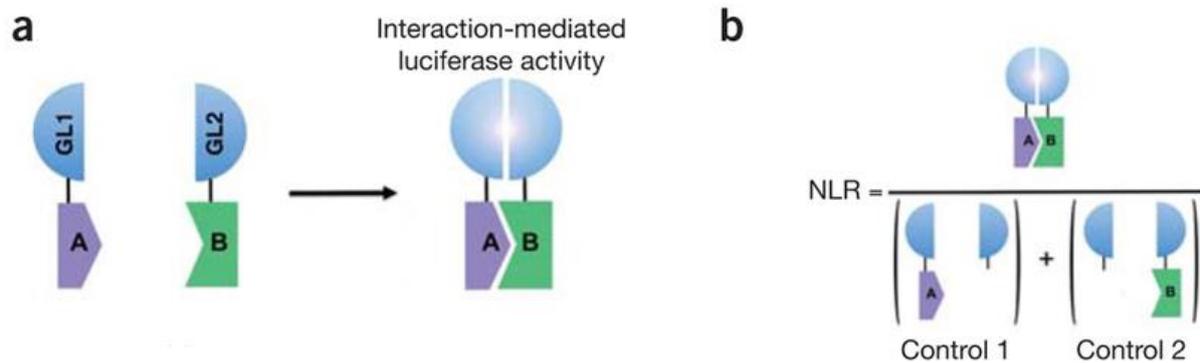


Figure 35. Schéma du principe de la GPCA.
(A) principe de la GPCA. **(B)** calcul de la NLR.

Afin de réaliser cette expérience, nous avons, dans un premier temps, construit des plasmides en insérant la séquence codant pour le domaine MetPCP dans le vecteur pSPICA-N1, codant pour la moitié N-terminale de la Gaussia luciférase (Gluc1) et et le vecteur pSPICA-N2, codant pour la moitié C-terminale de la Gaussia luciférase (Gluc2) par la technique de Gateway. Nous avons ainsi obtenu les plasmides pGluc1-MetPCP et pGluc2-MetPCP, dont la séquence a été vérifiée (Eurofins MWG, Ebersberg, Allemagne). Afin de tester l'interaction de Gluc1-MetPCP et Gluc2-MetPCP avec les protéines de la voie de réponse à l'IFN-I associées à des étiquettes Gluc1 ou Gluc2 à leur extrémité N-terminale (Annexe 2 ; fournis par Yves Jacob ⁵⁷⁵).

Des cellules 293T ont été mises en culture en plaque 96 puits 24h avant la transfection (7.5×10^4 cellules/puits). Ensuite, 100ng de chacun des plasmides codant pour le domaine MetPCP fusionné à Gluc1 ou Gluc2 et 100ng des plasmides codant pour des protéines de la voie JAK-STAT fusionnées à Gluc1 ou Gluc2 ont été transfectés. A 24h post-transfection, les cellules ont été lysées et l'activité de la luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (EnSpire® Alpha ; Perkin Elmer, Wellesley, MA, Etats-Unis) en utilisant le kit Renilla luciferase assay system (Promega ; Madison, WI, États-Unis) selon les instructions du fabricant.

B- Résultats obtenus

Les résultats obtenus ont montré des valeurs de NLR inférieures à 10 pour les interactions du domaine MetPCP avec les différentes protéines de la voie JAK-STAT alors que des valeurs de NLR supérieures à 1000 ont été obtenues pour l'interaction STAT1-STAT2 qui a été utilisée

comme contrôle positif (Figure 36). Ces résultats suggèrent que le domaine MetPCP de l'ORF1 n'interagit pas directement avec les protéines de la voie JAK-STAT testées.

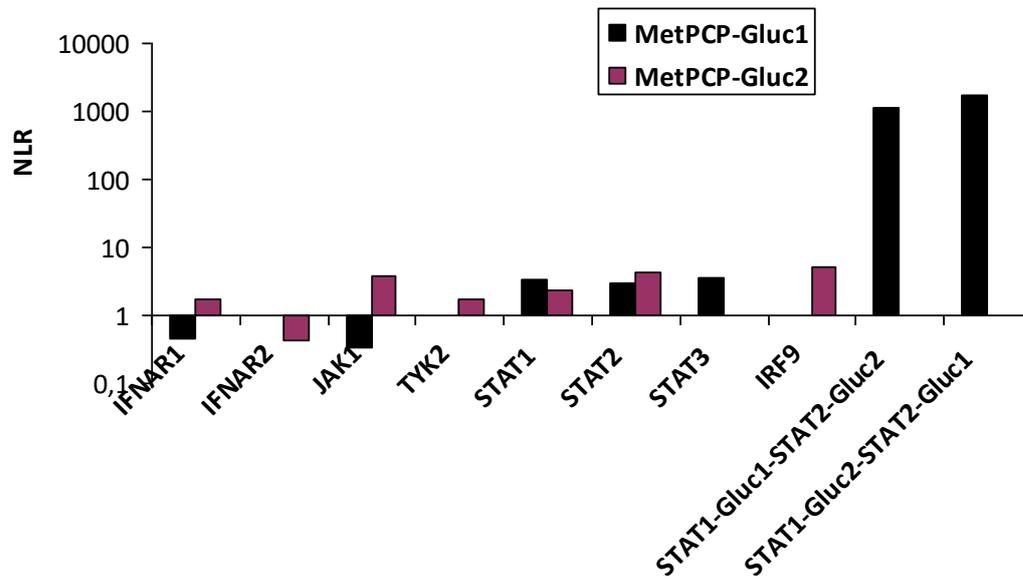


Figure 36. Analyse par GPCA des interactions potentielles entre le domaine MetPCP de l'ORF1 et différentes protéines de la voie JAK-STAT.

Des vecteurs d'expression codant pour le domaine MetPCP de l'ORF1 associé à son extrémité N-terminale aux deux moitiés de la luciférase Gluc1 ou Gluc2 (100ng) ont été transfectés avec 100ng de vecteurs d'expression codant pour les différentes protéines de la voie JAK-STAT (IFNAR1/2, JAK1, TYK2, STAT1/2/3 et IRF9) associées aux Gluc1/2. Les cellules ont été lysées 24 plus tard, la luminescence a été mesurée après ajout du substrat et les valeurs de NLR ont été calculées. L'expérience est représentative de trois expériences indépendantes pour les interactions impliquant MetPCP-Gluc2 et de deux expériences indépendantes pour celles impliquant MetPCP-Gluc1.

C- Discussion

Grâce à la technique de crible en GPCA, nous avons recherché des partenaires cellulaires potentiels du domaine MetPCP au sein de la voie JAK-STAT. Nous n'avons pas obtenu de valeur de NLR supérieures à 10, suggérant que le domaine MetPCP n'interagit pas directement avec les protéines de la voie de signalisation JAK-STAT. Cependant, nous n'avons pas testé toutes les protéines de la voie JAK-STAT avec des étiquettes Gluc1 et Gluc2. En effet, certaines interactions ont été testées qu'avec Gluc1 ou Gluc2. C'est le cas des interactions impliquant l'IFNAR2, TYK2, STAT3 et l'IRF9. Il est possible que certaines interactions n'aient pas été observées dans ce crible du fait de ce manque. Il peut arriver que pour des raisons de conformation des protéines de fusion, l'interaction ne soit observée qu'avec une des deux étiquettes. Il est également possible que la méthode utilisée ne soit

pas appropriée et qu'il y ait besoin d'une stimulation avec l'IFN- β pour observer une interaction du domaine MetPCP avec un partenaire de la voie JAK-STAT. De plus, ici, nous avons étudié seulement l'interaction du domaine MetPCP avec des protéines majeures de la voie JAK-STAT et de nombreuses autres protéines impliquées dans cette voie de signalisation, notamment les protéines régulatrices, n'ont pas été testées. Il serait donc intéressant d'élargir le crible à d'autres acteurs de cette voie comme la protéine RACK1 ou certaines phosphatases cellulaires.

II- Etude de l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur la voie de signalisation RLR

En plus d'étudier l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur la voie de signalisation JAK-STAT, nous avons également étudié l'effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur la voie d'induction de l'IFN-I, la voie RLR. Nous avons dans un premier temps étudié la capacité de l'ORF1 et de ses différents domaines à inhiber l'activation du promoteur IFN- β .

A- Résultats

1. Effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur l'activité du promoteur IFN- β

Afin d'évaluer la capacité de l'ORF1 et de ses différents domaines à inhiber l'activation du promoteur IFN- β , un test rapporteur luciférase a été réalisé en utilisant un plasmide codant pour le gène de la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur IFN- β (pIFN- β). Un plasmide codant pour une forme constitutivement active de RIG-I (p Δ RIG-I) a été utilisé pour stimuler la voie de signalisation RLR. Un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase a été utilisé pour évaluer l'efficacité de la transfection et normaliser les résultats (pRSV- β gal). Un plasmide codant pour la protéine NS3 du BTV a été utilisé comme contrôle positif car cette protéine inhibe la voie de signalisation RLR au niveau de l'activation de TBK1⁵⁶⁰. Le plasmide vide pCINeo3Flag (pVF₃) a été utilisé comme contrôle négatif et les analyses statistiques ont été réalisées en comparaison de ce contrôle. Comme le montre la figure 37A, l'ORF1 complète n'a pas d'effet sur l'activation du promoteur IFN- β . Les domaines X et Y de l'ORF1 n'ont pas non plus d'effet sur l'activation du promoteur IFN- β (Figure 37B). Au

contraire, les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 inhibent l'activation du promoteur IFN- β , suggérant une potentielle activité inhibitrice de ces domaines sur la voie de signalisation RLR.

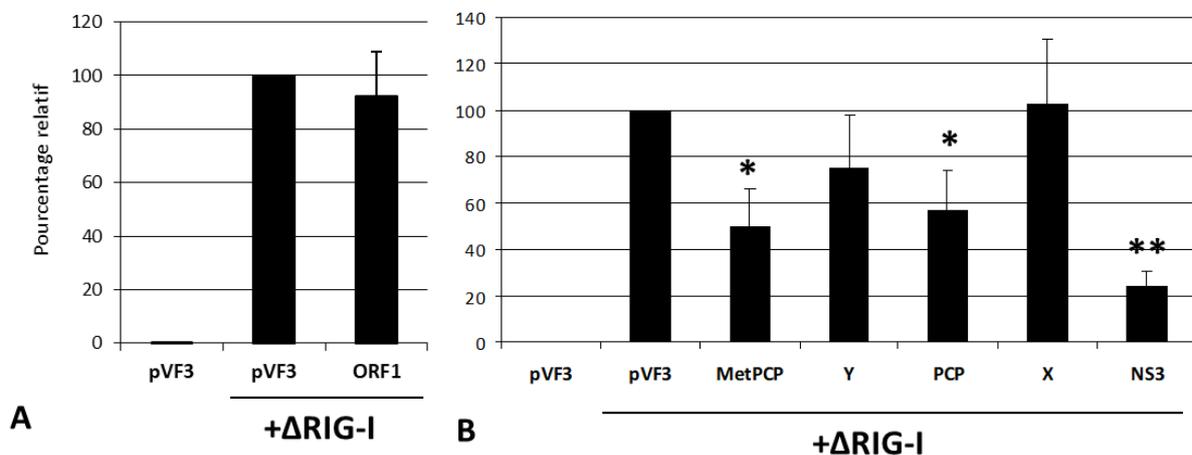


Figure 37. Effet des différents domaines de l'ORF1 sur l'activation du promoteur IFN- β .

Des cellules 293T ont été transfectées avec pIFN- β (100ng), p Δ RIG-I (200ng), pRSV- β gal (50ng) et le vecteur vide pCINeo3Flag (pVF3) ou les plasmides codant pour l'ORF1 (A) ou les différents domaines de l'ORF1 (B) ou la protéine NS3 du BTV (250ng). Après 18h de transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase et β -galactosidase a été mesurée. Les résultats représentent la moyenne de 2 (A) ou 3 (B) expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au vecteur vide pVF₃. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle (pVF₃). *, p<0.05 ; **, p<0.005 (test t de Student avec la correction de Welsh).

2- Recherche de partenaires cellulaires potentiels des domaines PCP et MetPCP parmi les protéines de la voie RLR par GPCA

Afin de déterminer si les domaines PCP et MetPCP interagissent directement avec des composants clé de la voie de signalisation RLR, un crible des partenaires potentiels de ces domaines a été réalisé en utilisant la technique de la GPCA.

Nous avons construit des vecteurs d'expression codant pour les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 du HEV-3 associé par leur extrémité N-terminale à la partie N-terminale (pGluc1-MetPCP et pGluc1-PCP) ou à la partie C-terminale (pGluc2-MetPCP et pGluc2-PCP) de la luciférase *Gaussia* en utilisant le système Gateway.

Les vecteurs pGluc1-MetPCP, pGluc2-MetPCP, pGluc1-PCP ou pGluc2-PCP ont été transfectés avec une banque de plasmides codant pour des protéines de la voie de synthèse de l'IFN-I liées par leur extrémité N-terminale aux étiquettes Gluc1 et/ou Gluc2 (voir Annexe 2). Après 24h de transfection, nous avons mesuré la luminescence et calculé les valeurs de NLRs (Figure 38). Les plasmides codant pour l'IRF3 et MDA5 ont été utilisés comme témoin négatif d'interaction et TRAF3 avec TANK comme témoin positif d'interaction. Comme on peut le voir figure 38, les domaines MetPCP et PCP semblent interagir avec IKK- ϵ . En effet, les valeurs de NLR obtenues pour les domaines MetPCP et PCP sont respectivement de 35.7 et 55.6 pour l'interaction avec IKK- ϵ -Gluc2 et de 23.8 et 9.7 pour l'interaction avec IKK- ϵ -Gluc1. Des valeurs de NLR de 19.9 et 113.7 ont également été obtenues pour l'interaction du domaine PCP avec IKK- ϵ -Gluc1 et IKK- ϵ -Gluc2.

De plus, il semblerait également que le domaine MetPCP interagisse avec la protéine NEMO. En effet, une valeur de NLR de 72.2 a été obtenue pour l'interaction de MetPCP avec NEMO-Gluc1 et de 17.6 avec NEMO-Gluc2. Des valeurs de NLR élevées pour les interactions entre TANK et les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1, respectivement de 30.5 et 19.3 ont également été observées. Les valeurs de NLR obtenues ne sont pas forcément les mêmes pour les protéines fusionnées avec Gluc1 ou avec Gluc2. En effet, une interaction peut être obtenue avec une protéine associée à une étiquette Gluc1 et non avec la même protéine associée à une étiquette Gluc2. La conformation des protéines associées à une étiquette Gluc1 ou Gluc2 peut être différente et donner des résultats de NLR différents. Une interaction du domaine PCP avec TBK1 a également été obtenue dans un autre crible réalisé dans le laboratoire (NLR de 34 ; non montré).

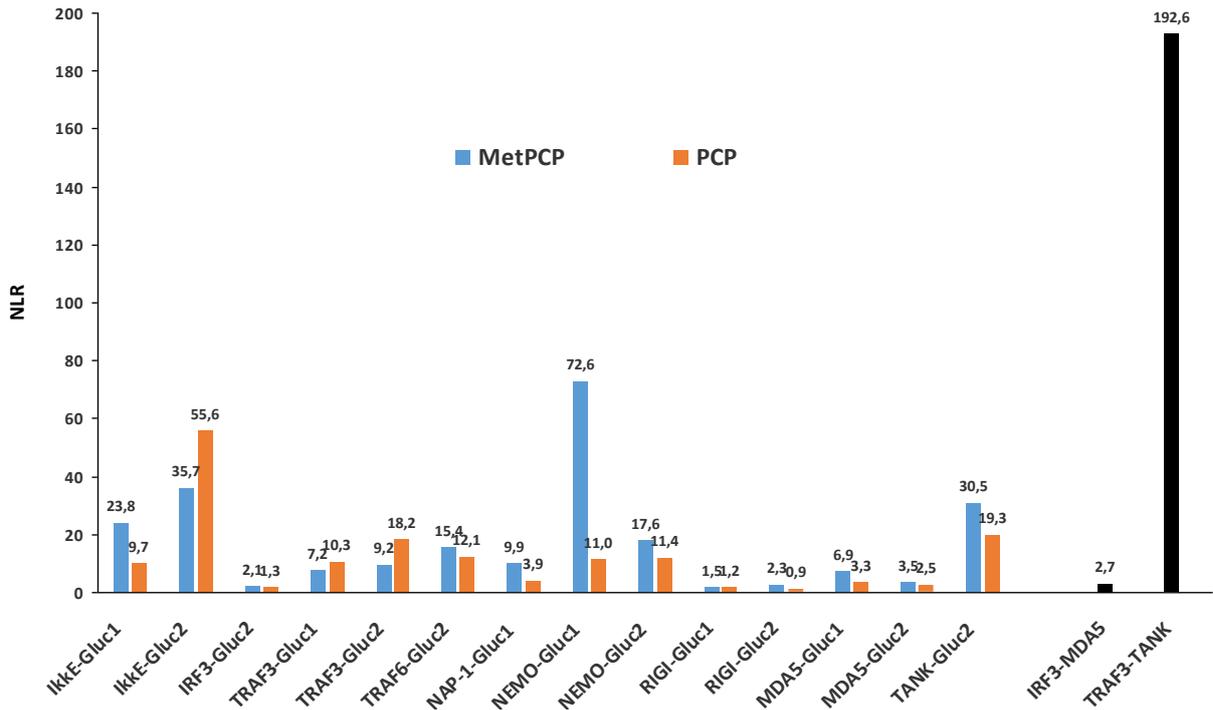


Figure 38. Analyse par GPCA des interactions potentielles entre les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 et différentes protéines des voies de synthèse de l'IFN-I.

Des plasmides codant pour les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 associés à leur extrémité N-terminale aux fragments de la luciférase Gluc1 ou Gluc2 (100ng) ont été transfectés avec 100ng de plasmides codant pour différentes protéines des voies de synthèse de l'IFN-I associées à Gluc1 ou Gluc2 (IKKε, IRF3, TRAF3, TRAF6, NAP-1, NEMO, RIG-I, MDA5 et TANK). Les interactions IRF3-MDA5 et TRAF3-TANK ont été respectivement utilisées comme contrôle négatif et positif. Les cellules ont été lysées 24h post-transfection, la luminescence a été mesurée après ajout du substrat et les valeurs de NLR ont été calculées.

B- Discussion et perspectives

En étudiant l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur la voie de signalisation RLR, nous avons observé par test rapporteur luciférase une inhibition de l'activité du promoteur IFN-β par les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 du HEV (Figure 37). Afin de déterminer par quel mécanisme les domaines PCP et MetPCP inhibent la voie RLR, nous avons réalisé un crible en GPCA avec certaines protéines de cette voie de signalisation. Ce crible nous a permis d'identifier IKK-ε, TANK et NEMO comme de potentiels partenaires cellulaires des domaines PCP et MetPCP du HEV. De plus, une interaction potentielle entre le domaine PCP et la protéine TBK1 a été rapportée dans un crible réalisé par Damien Vitour (données non montrées).

Les protéines IKK-ε, TBK1, NEMO et TANK font partie du même complexe (voir Introduction Figure 12), suggérant que les domaines MetPCP et PCP interagiraient avec une ou plusieurs protéines de ce complexe. Les valeurs NLRs élevées obtenues avec certaines de ces protéines cellulaires pourrait alors indiquer un rapprochement de MetPCP et PCP au sein de ce complexe, plutôt qu'une interaction directe.

En perspective, la potentielle interaction entre les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 du HEV et les différentes protéines du complexe devra être confirmée par d'autres méthodes que la GPCA telles que par co-immunoprécipitation ou par co-précipitation avec les domaines MetPCP et PCP fusionnés à la GST. Ces vecteurs d'expression-GST sont déjà disponibles grâce à la méthode de clonage Gateway. D'autres techniques seront utilisées pour valider l'inhibition de l'activité du promoteur IFN-β par les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 et examiner le mécanisme impliqué comme par exemple l'analyse du niveau de phosphorylation des protéines IRF3, IRF7, IKK-ε et TBK1 par immunoblot ou l'analyse de la translocation de IRF3 et IRF7 dans le noyau par IF.

Le domaine MetPCP et le domaine PCP seul possèdent une activité de déubiquitinylation des protéines^{104,557}. Notamment, le domaine PCP d'une souche de HEV-1 déubiquitinylyle RIG-I et TBK1⁵⁵⁷. Il est possible qu'en se liant à une des protéines du complexe NEMO-IKKε-TBK1, les domaines MetPCP et PCP déubiquitinylent ces protéines, ce qui inhibe leur activation. Nous avons vu dans l'introduction (paragraphe II-C-1-a-) que TBK1 est ubiquitinylé en K63 par différentes protéines cellulaires et que cette ubiquitinylation est nécessaire à son activation. La polyubiquitinylation en K29 de NEMO par TRAF7 et sa polyubiquitinylation en K63 sont nécessaires à son activité. Il est donc possible qu'en déubiquitinylant TBK1 ou NEMO, les domaines PCP et MetPCP inhibent la voie RLR. Certaines protéines virales présentant un domaine similaire au PCP du HEV possèdent une activité de DUB et sont capables de déubiquitinyler TBK1. Par exemple, la protéine Nsp3 du MHV et la protéine L^{pro} du FMDV déubiquitinylent TBK1 pour inhiber l'induction de l'IFN-I^{462,576}. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'en se liant à TBK1 ou NEMO, les domaines PCP et MetPCP du HEV le déubiquitinylyle, ce qui inhibe son activation et par conséquent l'activité du promoteur IFN-β. L'interaction la plus forte du domaine PCP rapportée dans notre étude en GPCA est une interaction avec IKK-ε. Cependant, aucun mécanisme régulateur d'ubiquitinylation n'a été

mis en évidence pour cette protéine et il est possible que PCP utilise un autre mécanisme pour bloquer la signalisation IFN-I en se liant à cette protéine.

Le domaine PCP d'un HEV-1 déubiquitinyler RIG-I⁵⁵⁷. Cependant, aucune interaction entre le PCP du HEV-1 et RIG-I n'a été rapportée dans cette étude. Dans notre crible en GPCA, nous n'avons pas observé d'interaction entre le domaine PCP du HEV-3 et RIG-I, suggérant que soit le domaine PCP du HEV-3 est capable de déubiquitinyler la protéine cible sans se lier à elle, soit que le PCP du HEV-1 interagirait avec RIG-I et pas celui du HEV-3. Afin de tester ces hypothèses, le clonage des différents domaines de l'ORF1 d'un HEV-1 a été entrepris.

III- Comparaison de l'effet de l'ORF1 du HEV-3 sur les voies de signalisation de l'IFN-I avec l'effet de l'ORF1 du HEV-1

Au début de ce travail de thèse, une étude a été publiée sur l'effet des domaines de l'ORF1 du HEV-1 (souche pSK-E2) sur la voie de signalisation RLR et a montré que les domaines PCP et X inhibent l'activité du promoteur IFN- β . En analysant plus en détail l'effet de ces domaines sur la voie de signalisation, il a été montré que le domaine X inhibe la phosphorylation de l'IRF3 et que le domaine PCP déubiquitinyler RIG-I et TBK1⁵⁵⁷. L'effet du domaine MetPCP du HEV-1 sur la voie RLR n'a pas été analysé dans cette étude.

Nous avons montré au cours de notre travail que le domaine X du HEV-3 n'a pas d'effet sur l'activation du promoteur IFN- β . Nous avons alors souhaité savoir quelles étaient les différences entre les deux géotypes HEV-1 et HEV-3 (Tableau 3). Le domaine X de la souche de HEV-3 utilisée dans nos expériences présente 83% d'identité de séquence en acides aminés avec le domaine X de la souche de HEV-1 pSK-E2. Cette différence au niveau de la séquence pourrait expliquer une différence de fonction des deux domaines. De plus, le domaine PCP de la souche de HEV-3 présente seulement 69% d'identité de séquence en acides aminés avec le domaine PCP de la souche de HEV-1 pSK-E2. Il est donc possible que le PCP du HEV-3 ait la même fonction que le PCP du HEV-1 grâce à des motifs conservés mais aussi que certaines fonctions pas encore caractérisées ne soient pas conservées entre géotypes.

Nous avons alors souhaité comparer l'effet des différents domaines d'intérêt de l'ORF1 d'une souche de HEV-1 et de ceux d'une souche de HEV-3 sur les voies de signalisation du

système IFN-I. Nous nous sommes également demandé si le domaine PCP du HEV-3 possédait la même activité DUB de RIG-I et TBK1 que le domaine PCP du HEV-1. Nous avons également souhaité comparer l'effet du domaine MetPCP du HEV-3 avec l'effet du MetPCP du HEV-1 sur la voie JAK-STAT.

Afin de comparer l'effet des deux génotypes sur les voies de signalisation RLR et JAK-STAT, nous avons construit des vecteurs d'expression codant pour les domaines MetPCP, Y, PCP et X de l'ORF1 d'une souche de HEV-1 lié à leur extrémité N-terminale à une étiquette 3FLAG, GFP, Gluc1 et Gluc2.

	MetPCP	Met	PCP	X	Y
HEV-1 (pSKE2) vs HEV-1	99%	99%	99%	99%	99%
HEV-1 (pSKE2) vs HEV-3	85%	88%	69%	83%	95%
HEV-1 vs HEV-3	85%	89%	69%	82%	94%

Tableau 3. Tableau comparatif du pourcentage d'identité en acides aminés entre les différentes souches de HEV décrites ici pour chaque domaine de l'ORF1 étudié.

La souche de HEV-1 (pSK-E2) a permis de montrer dans une publication un effet inhibiteur des domaines PCP et X du HEV-1. Les souches HEV-1 et HEV-3 sont celles utilisées dans le laboratoire.

A- Construction des plasmides codant pour les différents domaines de l'ORF1 d'une souche de HEV-1

Le HEV de génotype 1 utilisé pour le clonage provient d'un extrait de fèces d'un patient atteint d'une hépatite aiguë (Ancien CNR Hépatite E, HIA Val de Grâce, Paris). Après extraction de l'ARN viral avec le kit RNeasy (Qiagen; Hilden, Allemagne), une transcription inverse a été réalisée sur 5µl d'ARN en utilisant des hexamères aléatoires et l'enzyme PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio USA, Inc. CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. Une PCR a ensuite été réalisée sur 2µl d'ADNc en utilisant la polymérase Ex Taq (Takara Bio Inc. Shiga, Japon) avec les oligonucélotides répertoriés dans l'annexe 1. Les différents produits PCR (A, B et C ; Figure 39) ont ensuite été insérés dans des vecteurs TOPO pCR2.1 en utilisant le kit TOPO TA cloning (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. Après séquençage des différents vecteurs TOPO

construits, nous avons pu déterminer la séquence de ce HEV-1, qui présente 98% d'identité de séquence nucléotidique avec une souche de HEV-1 décrite en Inde (numéro GenBank : JF443726) et 92% avec la souche pSK-E2 utilisée dans la publication sur l'interaction de l'ORF1 du HEV-1 avec la voie RLR⁵⁵⁷ (numéro GenBank : AF444002). L'identité de séquence en acides aminés est de l'ordre de 99% pour les différents domaines d'intérêt MetPCP, PCP, X et Y entre la souche de HEV-1 étudiée dans notre laboratoire et la souche pSK-E2.

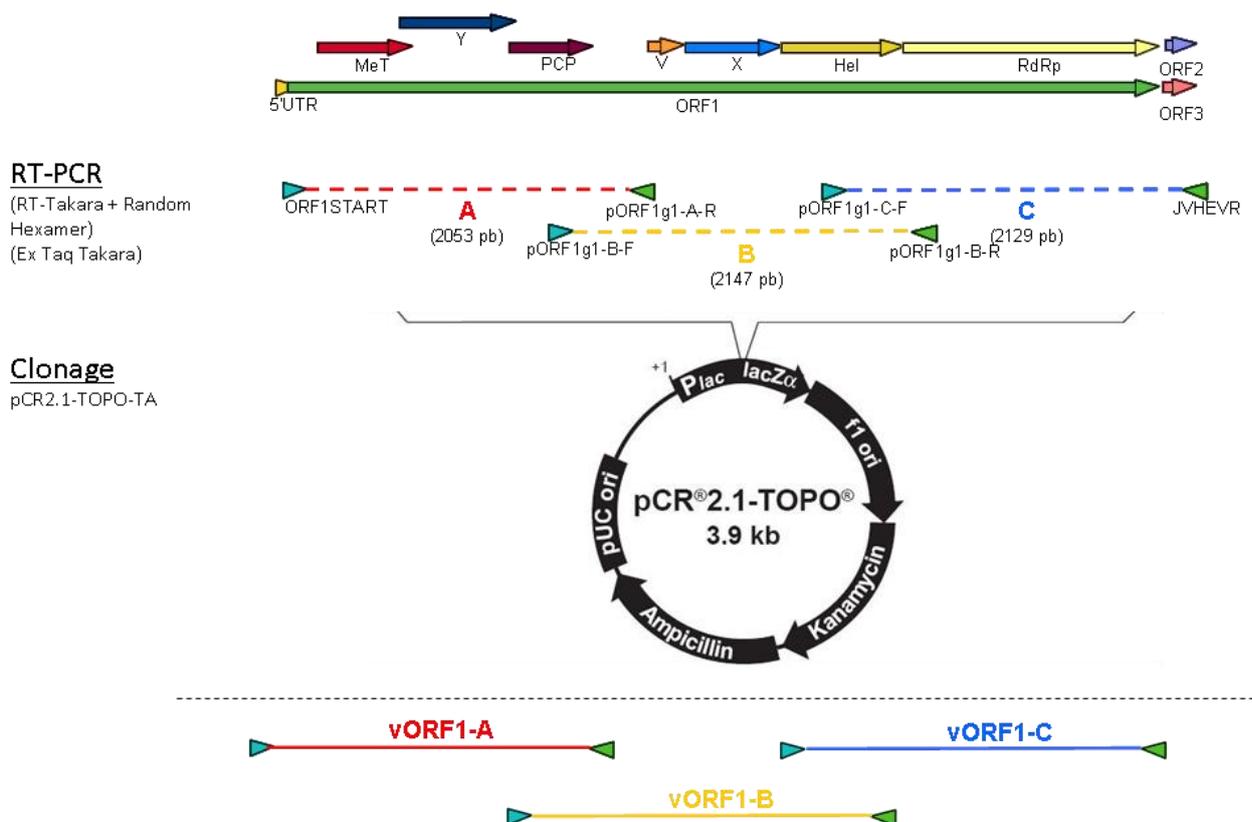


Figure 39. Stratégie de clonage de l'ORF1 du génotype 1 du HEV.

Après extraction de l'ARN viral à partir d'un extrait de fèces d'un patient atteint d'une hépatite aiguë à HEV-1, les différents fragments A, B et C ont été amplifiés par RT-PCR en utilisant les amorces indiquées. Les différents fragments ont ensuite été insérés dans un vecteur pCR2.1-TOPO-TA pour permettre la construction des vecteurs vORF1-A, vORF1-B et vORF1-C.

Les séquences codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines putatifs MetPCP, Y, PCP et X ont été amplifiés par PCR en utilisant les oligonucléotides répertoriés dans l'annexe 1. Les vecteurs vORF1-A ou vORF1-B ont été utilisés comme matrice pour l'amplification des séquences codant pour les différents domaines de l'ORF1 du HEV-1 (Figure 40). Ces produits

de PCR ont ensuite été insérés dans des vecteurs d'expression pCINeo3xFlag, pEGFP-C1, pSPICA-N1 et pSPICA-N2 en utilisant la technique du Gateway.

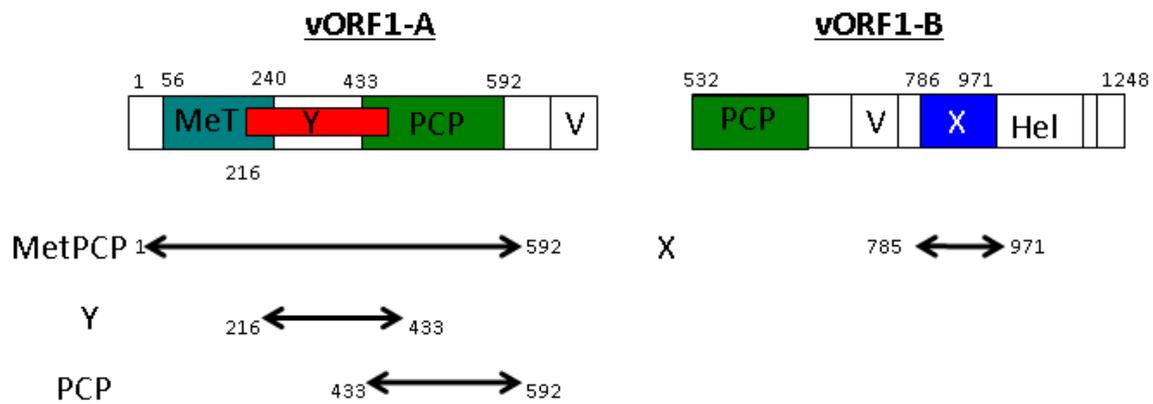


Figure 40. Schéma des différents fragments amplifiés.

Les fragments codant pour les différents domaines de l'ORF1 du génotype 1 ont été amplifiés à partir de vecteurs TOPO vORF1-A, vORF1-B. vORF1-A a permis l'amplification des domaines MetPCP, Y et PCP alors que vORF1-B a permis l'amplification du domaine X.

B- Perspectives

Ces constructions nous permettront dans un premier temps de comparer l'effet des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 avec les différents domaines de l'ORF1 du HEV-1 sur l'activation des promoteurs IFN- β et ISRE par des tests rapporteurs luciférase.

En parallèle, les potentiels partenaires des domaines PCP, MetPCP et X du HEV-1 seront déterminés par un crible GPCA avec les différentes protéines des voies de signalisation RLR et JAK-STAT. Dans l'étude portant sur l'inhibition de la voie RLR par les domaines de l'ORF1 du HEV-1, les auteurs n'ont pas étudié le mécanisme responsable de l'inhibition de la phosphorylation de l'IRF3 par le domaine X. Les auteurs ont observé une inhibition de la phosphorylation de l'IRF3 après transfection d'un plasmide codant pour le domaine X et stimulation des cellules pendant 8h avec le poly(I:C). Ils ont également observé cette inhibition en réalisant un test rapporteur luciférase IFN- β après stimulation de la voie de signalisation RLR par surexpression de RIG-I, MDA5, TBK1 et IKK ϵ . Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la voie de signalisation RLR par le domaine X du HEV-1 se fait entre le complexe IKK ϵ /TBK1 et l'IRF3 mais le mécanisme exact n'a pas été déterminé. Notamment, les auteurs n'ont pas étudié une potentielle interaction entre le domaine X et les protéines

ciblées et il serait intéressant de déterminer si ces inhibitions sont dues à des interactions directes entre le domaine X et l'IRF3. De même, il serait intéressant d'investiguer si le domaine PCP du HEV-1 est capable d'interagir directement avec RIG-I et TBK1. Si des différences sont observées entre les deux génotypes, les résultats pourraient permettre de mieux comprendre les différences de pathogénèse observées entre le HEV-1 et le HEV-3 au niveau de l'interaction HEV-hôte. En effet, le HEV-1 étant plus pathogène pour l'homme que le HEV-3, il est possible que la modulation du système IFN-I par ce génotype soit plus élevée. De plus, la comparaison entre les propriétés des protéines virales d'un génotype infectant strictement l'homme et celles d'un génotype zoonotique pourrait également donner des informations sur les adaptations nécessaires au passage de la barrière d'espèce.

CHAPITRE 2 :

**ETUDE DE LA CAPACITE DU HEV A INDUIRE LA PRODUCTION D'IFN-I
PAR LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOIDES**

I- INTRODUCTION

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, ces cellules sont la source principale d'IFN-I, un composant clé de la réponse antivirale de l'hôte. Certains virus sont capables de stimuler directement les pDCs en les infectant alors que d'autres sont capables de stimuler indirectement les pDCs sans les infecter, mais par contact entre une cellule infectée et les pDCs. Cependant, aucune étude n'a encore été publiée sur la stimulation des pDCs par le HEV. L'objectif de ce projet est de déterminer la capacité du HEV à stimuler la production d'IFN-I par les pDCs et de caractériser les mécanismes impliqués dans cette induction potentielle. Dans un premier temps, nous avons recherché des lignées cellulaires dans lesquelles le HEV pourrait se répliquer sans induire la production d'IFN-I et ceci dans le but de réaliser des co-cultures pDCs/cellules infectées. Dans un second temps, la lignée sélectionnée a été infectée et mise en co-culture avec des pDCs afin d'étudier la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV.

II- STRATEGIE EXPERIMENTALE

Afin d'étudier la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV, deux stratégies complémentaires peuvent être mises en œuvre : la première consiste en la co-culture des pDCs avec des cellules infectées par le HEV et la seconde constitue en la culture des pDCs en présence de virus libres. Cette seconde stratégie permet de définir si le HEV peut infecter directement les pDCs ou s'il y a besoin d'un contact entre la cellule infectée et les pDCs pour induire la production d'IFN-I par ces dernières.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'évaluer si le contact entre les pDCs et les cellules infectées par le HEV pouvait induire une production d'IFN-I. Pour cela, des modèles cellulaires appropriés permissifs à l'infection par le HEV et ne produisant pas d'IFN-I ont été recherchés (étape 1, Figure 41). En effet, une production d'IFN-I par les cellules infectées lors des expériences de co-culture avec les pDCs ne permettrait pas d'analyser spécifiquement la production d'IFN-I par les pDCs.

Ensuite, les pDCs ont été co-cultivées avec les cellules infectées sélectionnées et la production d'IFN-I a été mesurée par ELISA (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*) et RT-PCRq (étape 2, Figure 41).

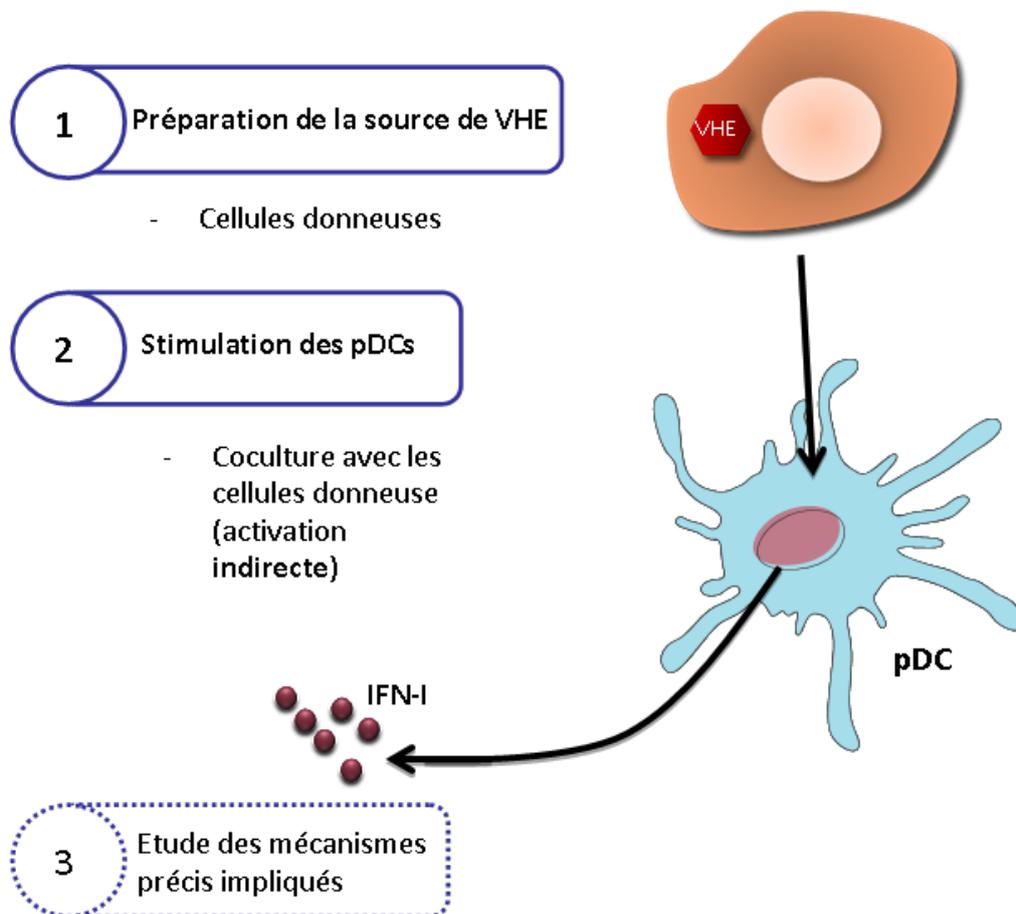


Figure 41. Schéma de la stratégie expérimentale mise en place.

III- MATERIELS ET METHODES

A- Cellules

Les cellules HepG2/C3A sont un sous clone des cellules HepG2 isolées à partir d'un carcinome hépatocellulaire sélectionné pour sa forte capacité d'inhibition de contact et sa capacité à produire différents marqueurs d'hépatocytes tels que l'albumine. Les cellules HepaRG, isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 développé consécutivement à une hépatite C chronique, présentent de nombreuses caractéristiques des hépatocytes primaires humains. Elles sont capables de se différencier en cellules hépatocytaires et

biliaires, ce qui en fait un modèle très pertinent pour l'étude des virus infectant le foie comme le HEV.

Les cellules d'origine hépatocytaires humaines HepG2/C3A ont été cultivées dans du milieu MEM supplémenté avec 10% de SVF, P/S, 1% pyruvate et 1% NEAA. Les cellules hépatocytaires humaines HepaRG (BIOPREDIC international ; Saint Grégoire, France) ont été cultivées dans du milieu de croissance William's E (Thermo Fisher scientific ; Waltham, MA, États-Unis) supplémenté avec 5µg/ml d'insuline (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis), 5x10⁻⁵M d'hydrocortisone hemisuccinate (VWR international ; Radnor, PA ; États-Unis), P/S et 10% SVF. Pour permettre leur différenciation, les cellules ont ensuite été cultivées dans un milieu de différenciation (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis).

Les cellules A549-D3 (un sous clone de cellules A549 sélectionné car il permet une réplication plus efficace du HEV) ont été données par le Pr. Reimar Johne (Département de la sécurité biologique, Institut fédéral d'évaluation des risques, Berlin,, Allemagne) ¹⁸⁷. Ces cellules sont cultivées dans un milieu MEM supplémenté par 10% de SVF, P/S, 1% Gentamicine, et 1% NEAA. Les cellules A549-N5, chroniquement infectées par un HEV de génotype 3, ont également été données par le Pr. Reimar Johne ¹⁰⁹. Elles sont cultivées dans du milieu contenant 5% de SVF au lieu de 10%.

B- Anticorps et réactifs

L'anticorps monoclonal de souris anti-ISG15 provient de Santa Cruz Biotechnology (clone F-9 ; Dallas, TX, États-Unis) et a été utilisé au 1/200^{ème}. L'anticorps monoclonal de souris anti-ORF2 (MAB8002) provient de chez Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne) et a été utilisé au 1/500^{ème}.

Le poly(I:C), qui est un ARNdb synthétique, provient de Sigma-Aldrich (réf : P0913 ; Saint-Louis, MO, États-Unis). Le poly(I:C) a été transfecté avec le réactif JetPRIME dans des cellules HepG2/C3A, A549-D3 et HepaRG en suivant les instructions du fabricant.

L'IFN-β et l'IFN-α humains utilisés pour activer la voie JAK-STAT proviennent de PBL (Piscataway, NJ, États-Unis). Les cellules HepaRG ont été stimulées avec 200 et 500UI/ml d'IFN-β et les cellules A549-D3 avec 1000UI/ml d'IFN-β. La stimulation a été effectuée en retirant le milieu de culture et ajoutant du nouveau milieu dans lequel l'IFN-β est dilué. La

stimulation a été effectuée pendant 8h ou 18h pour étudier l'expression des ISGs. A la fin de la stimulation, les cellules sont récoltées pour l'extraction des ARNs.

C- Infections virales

1- Infections par le HEV

Un système de culture du HEV en cellules HepaRG produisant de forts titres viraux a été mis en place dans le laboratoire par Virginie Doceul (non publié). Brièvement, des cellules HepaRG cultivées pendant 2 semaines en milieu de croissance puis 2 semaines en milieu de différenciation ont été infectées avec un extrait de fèces d'un patient infecté avec un HEV de génotype 3f (FR-humHEV-3f ; numéro GenBank : JN906974) ⁵⁷⁷. La moitié du surnageant (environ 1ml) a été prélevée tous les 2 à 3 jours et remplacée par du milieu frais. L'extraction de l'ARN de ces surnageants a permis de suivre la réplication virale par RT-PCRq dans le temps. Des titres élevés (de l'ordre de 10^8 copies du génome du HEV/ml de surnageant) ont été obtenus après 70 jours de culture. A partir de ce premier passage, du surnageant de cellules infectées récolté 91 jours après l'infection a été utilisé pour infecter de nouvelles cellules HepaRG différenciées à une MI (multiplicité d'infection) de 25-30, ceci correspondant à un deuxième passage du virus. La réplication virale a été suivie comme précédemment. Des surnageants récoltés à J99 et J109 ont ensuite été utilisés pour infecter respectivement des cellules HepG2/C3A ou de nouvelles cellules HepaRG différenciées à une MI de 2 (Figure 42). Les MIs sont ici exprimées en nombre de génome équivalent (GE)/cellule et non en nombre de particules infectieuses/cellule.

Les infections de cellules HepaRG et HepG2/C3A ont été réalisées selon le protocole suivant : Le surnageant contenant du virus a été dilué dans du milieu de croissance afin d'infecter les cellules à une MI de 2 (sous un volume d'1ml). La même expérience a été réalisée avec du surnageant de cellules HepaRG non infectées prélevé dans les mêmes conditions comme contrôle négatif (non infecté). Ce contrôle permet de s'affranchir de l'effet que le surnageant de culture de cellules HepaRG pourrait avoir sur les cellules HepG2/C3A. De même, 1ml de suspension virale ou de surnageant contrôle provenant de cellules non infectées a été déposé sur les cellules HepaRG différenciées. Le surnageant a été retiré 24h plus tard et 3 lavages au PBS ont été réalisés afin d'éliminer toute trace d'inoculum, ensuite

2ml de milieu frais ont été ajoutés sur les cellules. Tous les deux à trois jours, 1ml de milieu a été prélevé et 1ml de milieu de croissance frais a été ajouté afin de pouvoir suivre la réplique virale au cours du temps.

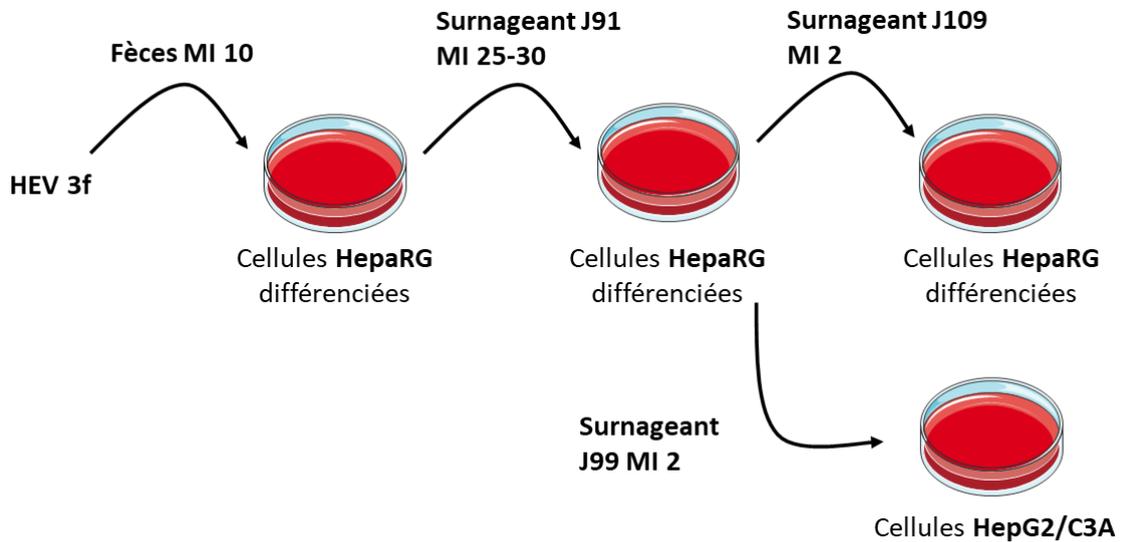


Figure 42. Protocole de la mise en place des systèmes de culture du HEV en cellules HepaRG ou en cellules HepG2/C3A.

2- Infections avec le BTV-8

La souche sauvage de BTV de sérotype 8 (BTV8) provient de la collection du laboratoire nationale de référence (Laboratoire de santé animale, ANSES, Maisons-Alfort ; isolée dans les Ardennes en 2006). L'infection des cellules avec le BTV8 a été réalisée suivant le protocole suivant : des cellules HepaRG ont été infectées à une MI de 0.01 ou 0.05 (ici la MI est exprimée en TCID50) dans 1ml de milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C sous faible agitation pendant 2h avant que le milieu soit changé pour 2ml de milieu de croissance avec sérum. Les cellules ont ensuite été récoltées 24h plus tard et l'ARN total a été extrait.

D- Co-culture avec les cellules dendritiques plasmacytoides

La culture des pDCs et la co-culture avec les cellules HepaRG infectées ont été réalisées par Laura Sinigaglia, de l'équipe de Nolwenn Jouvenet à l'Institut Pasteur. Brièvement, le sang de

donneurs adultes sains a été fourni par l'Etablissement français du sang et les PBMCs ont été isolées avec le kit Ficoll-Paque (GE Healthcare ; Little Chalfont, Royaume-Uni). Les pDCs ont été isolées des PBMCs en utilisant le kit MicroBead CD304 (Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Allemagne) suivi d'une deuxième étape d'enrichissement avec le kit pDC isolation II (Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Allemagne). La pureté des pDCs isolées a ensuite été évaluée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD303 et anti-CD123. La fraction négative a été collectée et constitue la fraction de PBMCs déplétées des pDCs. Les PBMCs, ainsi que la fraction de PBMCs déplétée de pDCs, ont été utilisées à 1×10^5 cellules/conditions. Les pDCs isolées ont été utilisées à 2.5×10^4 cellules/condition, avec une pureté de >94%. Les pDCs isolées, les PBMCs ou les PBMCs déplétées des pDCs ont été mises en co-cultures avec les cellules HepaRG pendant 24h. Les cellules ont ensuite été récoltées, l'ARN total a été extrait pour analyse en RT-PCRq et les surnageants ont été récoltés pour analyse de la production d'IFN- α par ELISA.

E- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)

1- Extraction de l'ARN du HEV et quantification par RT-PCRq

L'ARN viral présent dans 200 μ l de surnageant a été extrait en utilisant le kit QIAamp viral RNA (Qiagen ; Hilden, Allemagne) et l'ARN viral présent dans les culots cellulaires a été extrait en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Une RT-PCR TaqMan a été réalisée en utilisant le kit RT-PCR Quanti'Tech Probe (Qiagen ; Hilden, Allemagne) en utilisant 2 μ l d'ARN et avec les amorces décrites dans l'annexe 1 (ORF2-3 HEV) et une sonde Taqman HEV (TaqMan MGB probes, Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis ; séquence : TGATTCTCAGCCCTTCGC). Un appareil LightCycler480 (Roche Molecular Biochemicals) a été utilisé pour l'analyse. La transcription inverse a été effectuée en chauffant les échantillons pendant 20 minutes à 50°C, suivi d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes. L'ADN a ensuite été amplifié par 45 cycles à 95°C pendant 10 secondes et 58°C pendant 45 secondes. L'extension finale a été réalisée en refroidissant à 40°C pendant 30 secondes. Les données ont été analysées après le calcul des Ct (*Cycle threshold*). Une courbe standard a été obtenue en fonction des valeurs de Ct et du logarithme du nombre de copies de l'ARN standard. L'ARN standard a été obtenu

après transcription *in vitro* d'un plasmide pCDNA3.1 ORF2-3 HEV, comme décrit précédemment ⁸³.

2- Extraction des ARN cellulaires totaux et mesure de l'expression de gènes cellulaires par RT-PCRq

Pour les cellules HepaRG, HepG2/C3A et A549, l'ARN total a été extrait des culots cellulaires en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne). La transcription inverse (RT) et La PCR en temps réel ont été réalisés comme indiqués dans le chapitre 1 (II-E-)

Pour les pDCs, l'extraction des ARN a été réalisée grâce au kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel ; Düren, Allemagne). La synthèse de l'ADNc a été réalisée avec la transcriptase inverse RevertAid H Minus (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis). La PCRq a été réalisée sur un appareil de PCR en temps réel (ABI PRISM 7900HT) en utilisant le kit SYBR Green Master Mix (Roche, Bâle, Suisse).

F- Dosage de l'IFN- α par ELISA

L'analyse par ELISA de la production d'IFN- α dans les surnageants des co-cultures pDCs-cellules infectées a été effectuée à l'Institut Pasteur par Laura Sinigaglia en utilisant le kit ELISA Verikine Huma IFN α Multi-Subtype (PBL assay science ; Piscataway, NJ, États-Unis).

G- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests t de Student avec correction de Welsh. Les valeurs-p ont été considérées comme significatives quand $p < 0.05$.

IV- RESULTATS

A- Préparation de la source de HEV

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de l'IFN-I et de différents ISGs dans des cellules HepG2/C3A, HepaRG et A549 infectées par le HEV. En effet, afin de pouvoir étudier la production d'IFN- α par les pDCs lors des expériences de co-cultures, les cellules infectées ne doivent pas produire d'IFN- α . Nous avons alors testé les deux lignées hépatocytaires HepG2/C3A et HepaRG ainsi que la lignée constitutivement infectée par le HEV A549-N5.

1- *Etude de la production d'IFN-I dans des cellules HepG2/C3A suite à une infection par le HEV*

Des cellules HepG2/C3A ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant de cellules HepaRG prélevé au 99^{ème} jour post-infection. Le surnageant de culture a ensuite été prélevé tous les 2/3 jours pour analyse de la réplication virale par RT-PCRq (Figure 43A). Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection et analysés pour la présence d'ARN viral et d'ARN codant pour l'IFN- α (Figures 43B et C). Comme le montrent les figures 43A et B, les cellules HepG2/C3A permettent bien la réplication du HEV au cours du temps. Cependant, la réplication du virus dans ces cellules, après un pic de l'ordre de 10^5 GE/ml dans le surnageant ou 10^3 copies de HEV/ μ g d'ARN total dans les culots cellulaires, décroît à partir de 7 jours post-infection.

Les résultats présentés dans la figure 43C indiquent que les cellules HepG2/C3A n'induisent pas la synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α en réponse à l'infection par le HEV. Nous avons souhaité vérifier que les cellules HepG2/C3A sont bien capables de produire de l'IFN- α en réponse à d'autres stimuli ou si elles présenteraient un défaut dans la voie de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN-I. Pour cela, nous avons stimulé les cellules avec du poly(I:C) et analysé par RT-PCRq la présence d'ARNm codant pour l'IFN- α . Comme le montre la figure 43D, les cellules HepG2/C3A induisant bien la synthèse des ARNm codant

pour l'IFN- α en réponse au poly(I:C). Les cellules HepG2/C3A infectées par le HEV ne produisent pas d'IFN- α et semblent pouvoir être utilisées pour la co-culture avec les pDCs.

2- Etude de la production d'IFN-I dans les cellules HepaRG suite à une infection par le HEV

De la même manière que pour les cellules HepG2/C3A, des cellules HepaRG différenciées ont été infectées avec un surnageant prélevé au 109^{ème} jour post-infection d'un deuxième passage du virus dans les cellules HepaRG. Du surnageant a ensuite été prélevé tous les 2/3 jours pour analyse de la réplication virale par RT-PCRq (Figure 44A). Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection et analysés pour la présence d'ARN codant pour l'IFN- α , - β , ISG15, ISG56 et MxA (Figure 44 B à F). Comme le montre la figure 44A, les cellules HepaRG permettent un bon niveau de réplication du HEV au cours du temps. En effet, le nombre de génome équivalent/ml de surnageant augmente constamment, jusqu'à atteindre un titre de 10^5 GE/ml au bout de 21 jours de culture.

Les résultats des figures 44 C à F ne montrent pas de différence dans l'expression des gènes codant pour l'IFN- α , l'IFN- β , l'ISG15, l'ISG56 ou MxA entre les cellules infectées et les cellules témoin au cours du temps, suggérant que l'infection des cellules HepaRG par le HEV n'induit pas la synthèse d'IFN-I et d'ISGs.

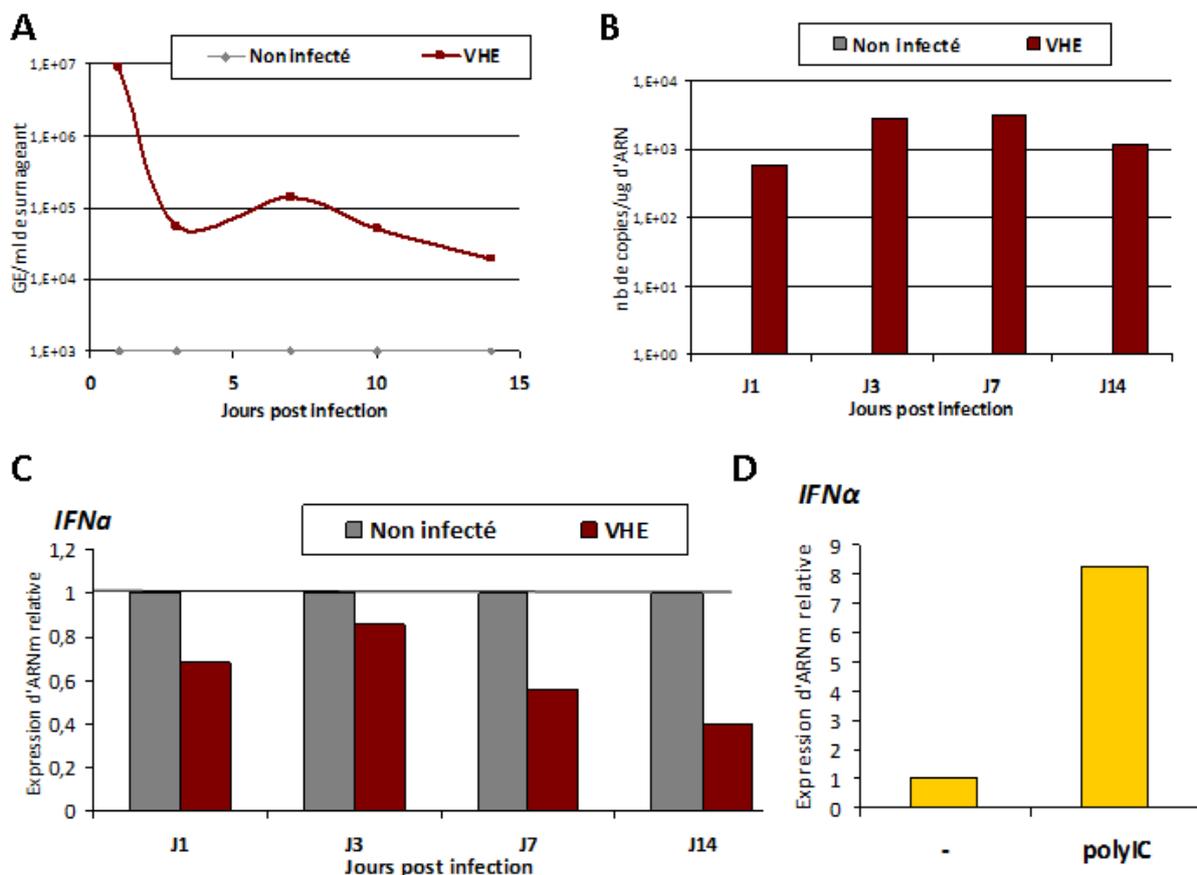


Figure 43. Les cellules HepG2/C3A peuvent être infectées par le HEV mais la présence du virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α .

Des cellules HepG2/C3A ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant provenant de cellules HepaRG infectées. **(A)** Tous les 2/3 jours post-infection, le surnageant des cellules est prélevé et la production d'ARN viral (en génome équivalent(GE)/ml de surnageant) est mesurée par RT-PCRq. **(B et C)** Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection (à J1, 3, 7 et 14). Après extraction de l'ARN, le niveau d'expression de l'ARN viral dans les culots (B) ainsi que des ARN codant pour l'IFN- α (C) ont été mesurés par RT-PCRq. La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne et les résultats ont été normalisés pour chaque jour en fonction du contrôle non infecté. **(D)** Les cellules HepG2/C3A ont été stimulées pendant 18h par transfection du poly(I:C) (4 μ g/ml). Les ARN totaux ont ensuite été extraits et des expériences de RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des ARN codant pour l'IFN- α . La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne. L'expérience a été répétée deux fois de manière indépendante.

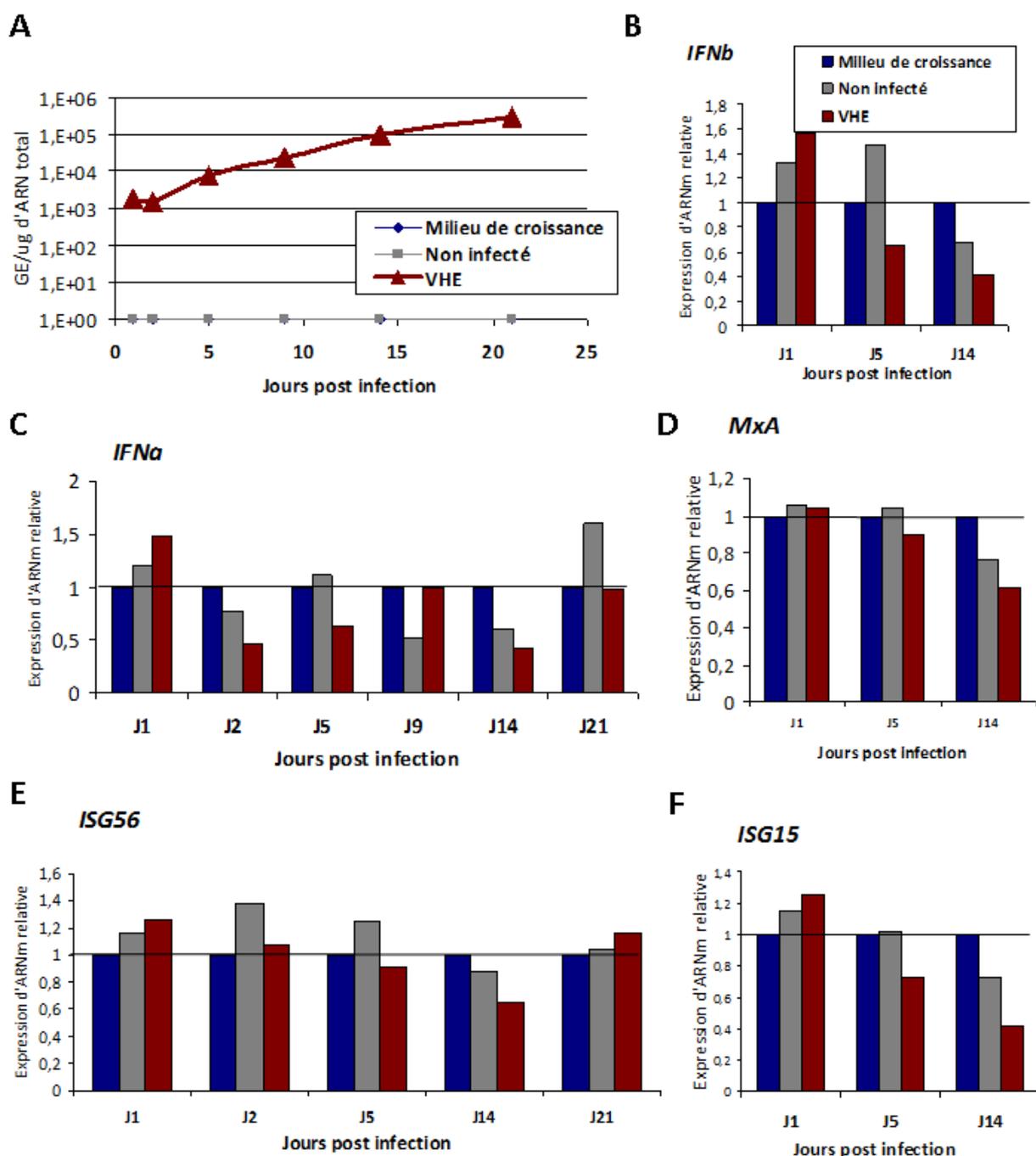


Figure 44. Les cellules HepaRG peuvent être infectées par le HEV mais le virus n'affecte pas le niveau d'expression de l'IFN- α - β , MxA, ISG56 et ISG15.

Des cellules HepaRG ont été infectées à une MI de 2 avec du surnageant provenant de cellules HepaRG infectées. Les culots cellulaires ont été prélevés à différents temps post-infection (à J1, 3, 5, 9, 14 et 21). Après extraction des ARN totaux, la production d'ARN viral (en GE/ μ g d'ARN total) (**A**) et le niveau d'expression des ARN codant pour l'IFN- β (**B**), IFN- α (**C**), MxA (**D**), l'ISG56 (**E**) et l'ISG15 (**F**) a été mesuré par RT-PCRq. La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne et les résultats ont été normalisés sur chaque jour en fonction du contrôle « milieu de croissance » (bleu).

Afin de vérifier si l'absence de réponse des cellules HepaRG est spécifique de l'infection par le HEV, différents stimuli ont été utilisés : une stimulation au poly(I:C) à 1µg/ml pendant 18h, une infection avec le BTV8 à une MI de 0.01 pendant 18h ou des stimulations avec 200UI/ml ou 500UI/ml d'IFN-β ou 500UI/ml d'IFN-α pendant 18h (Figure 45). L'expression des ARN codant pour l'IFN-α et l'ISG56 a été analysée par RT-PCRq. Les résultats présentés figure 45A montrent que la stimulation au poly(I:C) induit l'expression de l'IFN-α, confirmant l'intégrité de la voie d'induction de l'IFN-I dans les cellules HepaRG. Cependant, cette induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN-α n'est pas observée après infection avec le BTV8. Une forte induction de l'ISG56 a été observée après infection par le BTV8, ou stimulation par le poly(I:C) ou l'IFN-α/β (Figure 45B), confirmant que la voie de réponse à l'IFN-I est également fonctionnelle. De plus, une induction de l'expression de l'ISG56 est également observée après infection par le BTV8, suggérant que malgré l'absence d'expression des ARNm codant l'IFN-I, une activation de l'expression des ISGs peut être observée pour d'autres virus. Dans le cas du HEV, nous n'avons observé ni une synthèse d'IFN-I, ni une synthèse des différents ISGs testés, suggérant que le HEV ne serait soit pas détecté par les PRRs cellulaires, soit qu'il utiliserait un mécanisme pour bloquer le signal IFN-I comme suggéré dans le premier chapitre. Les cellules HepaRG semblent être un très bon modèle pour la co-culture avec les pDCs. En effet, elles permettent la réplication du HEV au cours du temps et n'expriment pas les ARNm codant pour l'IFN-I.

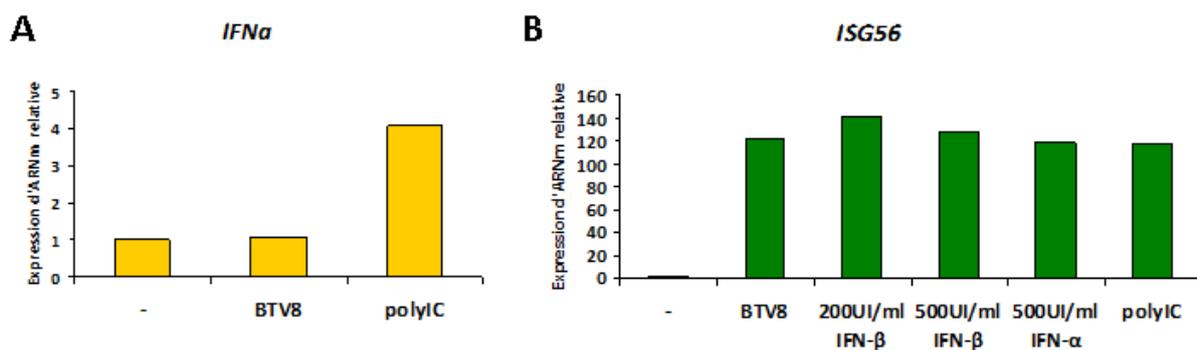


Figure 45. Evaluation de l'intégrité des voies d'induction (A) et de réponse (B) à l'IFN-I dans les cellules HepaRG.

Des cellules HepaRG ont été stimulées pendant 18h avec le poly(I:C) (1µg/ml), 200UI ou 500UI/ml d'IFN-β, 500UI/ml d'IFN-α ou infectées avec le BTV8 à une MI de 0,01. Les ARN totaux ont ensuite été extraits et des expériences de RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des ARN codant pour l'IFN-α (A) et l'ISG56 (B). La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne. Les résultats de l'infection par le BTV8 et des stimulations par l'IFN-β sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

3- Réponse des cellules A549 à une infection par le HEV

α- La lignée A549-N5

La lignée A549-N5 a été générée après infection de cellules d'origine pulmonaire A549 avec du virus isolé à partir du sérum d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3) développée suite à une transplantation de rein et sous thérapie immunosuppressive. Ce virus présente la particularité d'avoir une insertion de 186 nucléotides dans la région HVR, dérivée de duplications de deux parties de l'ORF1. Le virus a ensuite été passé plusieurs fois sur ces cellules. Les cellules A549-N5 qui nous ont été données correspondent au 36^{ème} passage des cellules.

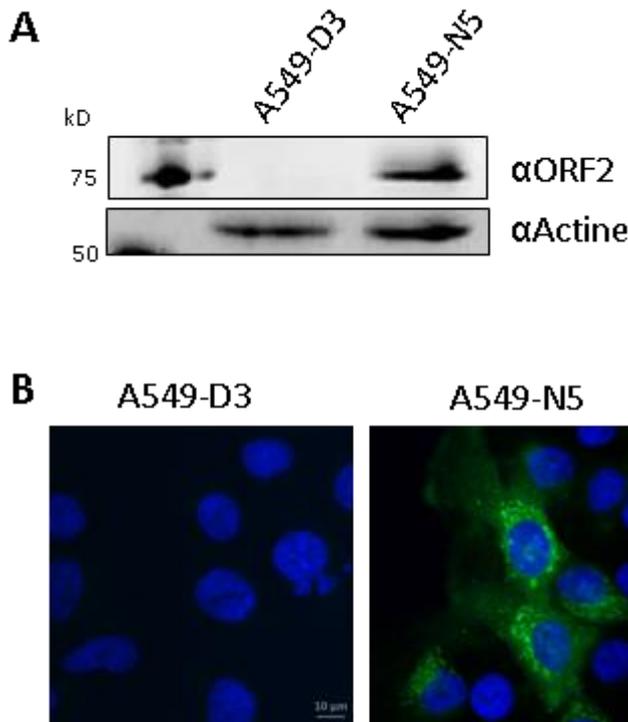


Figure 46. Caractérisation de la réplication virale dans la lignée A549-N5.

(A) Analyse par immunoblot de lysats de cellules A549-D3 et A549-N5. Les expressions de l'ORF2 (75KDa) et de l'actine (42KDa) ont été analysées. **(B)** Etude de l'expression de l'ORF2 par microscopie à fluorescence. Après fixation, les cellules A549-D3 et A549-N5 ont été incubées avec un anticorps anti-ORF2 de souris, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 488 (vert). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

Les cellules ont été mises en culture et l'analyse du surnageant a permis de montrer que le titre viral restait stable au cours des passages successifs des cellules avec des titres allant de 10^7 à 10^8 GE/ml de surnageant. De plus, contrairement aux cellules HepaRG pour lesquelles l'analyse de l'expression de l'ORF2 par immunoblot ou IF est difficile à mettre en place, du fait d'un bruit de fond important et probablement d'un faible nombre de cellules infectées, l'expression de l'ORF2 dans les cellules A549-N5 peut être observée à la fois par immunoblot

(Figure 46A) et par IF (Figure 46B). L'analyse par IF a permis de montrer qu'environ 50% des cellules sont infectées dans la lignée A549-N5. Les cellules A549-D3, un sous clone de cellules A549 non infectées, ont été utilisées comme contrôle négatif.

b- Etude de la production d'IFN-I dans les cellules A549-N5

Afin de déterminer si les cellules A549-N5 pourraient être utilisées pour la co-culture avec les pDCs, nous avons analysé la production d'IFN-I et des ISGs dans ces cellules infectées par le HEV. Pour cela, nous avons extrait l'ARN des cellules A549-N5 et de cellules A549-D3 non infectées, qui ont servi de contrôle négatif dans nos expériences. Nous avons également stimulé les cellules A549-D3 avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h ou 4 μ g/ml de poly(I:C) pendant 24h, afin de pouvoir comparer l'activation des cellules A549 après infection par le HEV avec l'activation des cellules suite à d'autres stimuli. Comme le montrent les figures 47A et B, le niveau d'expression des ARNm codant pour l'IFN- α et l'IFN- β n'est pas modifié entre des cellules A549-D3 non infectées et des cellules A549-N5 infectées par le HEV. Au contraire, dans les cellules A549-D3 stimulées avec le poly(I:C), une induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- α d'environ 100 fois le niveau basal d'expression des ARNm sans stimulation et une induction de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- β d'environ 1800 fois le niveau basal est observé. Cependant, une faible augmentation de la quantité des ARN codant pour certains ISGs dans les cellules infectées A549-N5 est observée (Figures 47C et D), mais le niveau d'expression reste très faible en comparaison avec celui observé après stimulation avec le poly(I:C). Pour confirmer la production de certains ISGs pendant l'infection par le HEV, nous avons ensuite comparé l'expression de certaines protéines codées par les ISGs par immunoblot entre les cellules A549-N5 et A549-D3. Comme le montre la figure 47E, les cellules A549-N5 présentent un niveau d'expression de deux ISGs, STAT1 et STAT2, plus élevé que les cellules A549-D3, confirmant ainsi les résultats de PCRq. De plus, une ISGylation des protéines dans les cellules A549-N5 est observée, suggérant qu'une réponse IFN-I a bien été mise en place dans ces cellules. Les cellules A549-N5 semblent donc produire des IFN-I en quantité indétectable par qPCR ou dans les conditions de l'expérience. Il est également possible que ces cellules induisent une autre voie de signalisation indépendante de la synthèse d'IFN-I pour activer l'expression des ISGs.

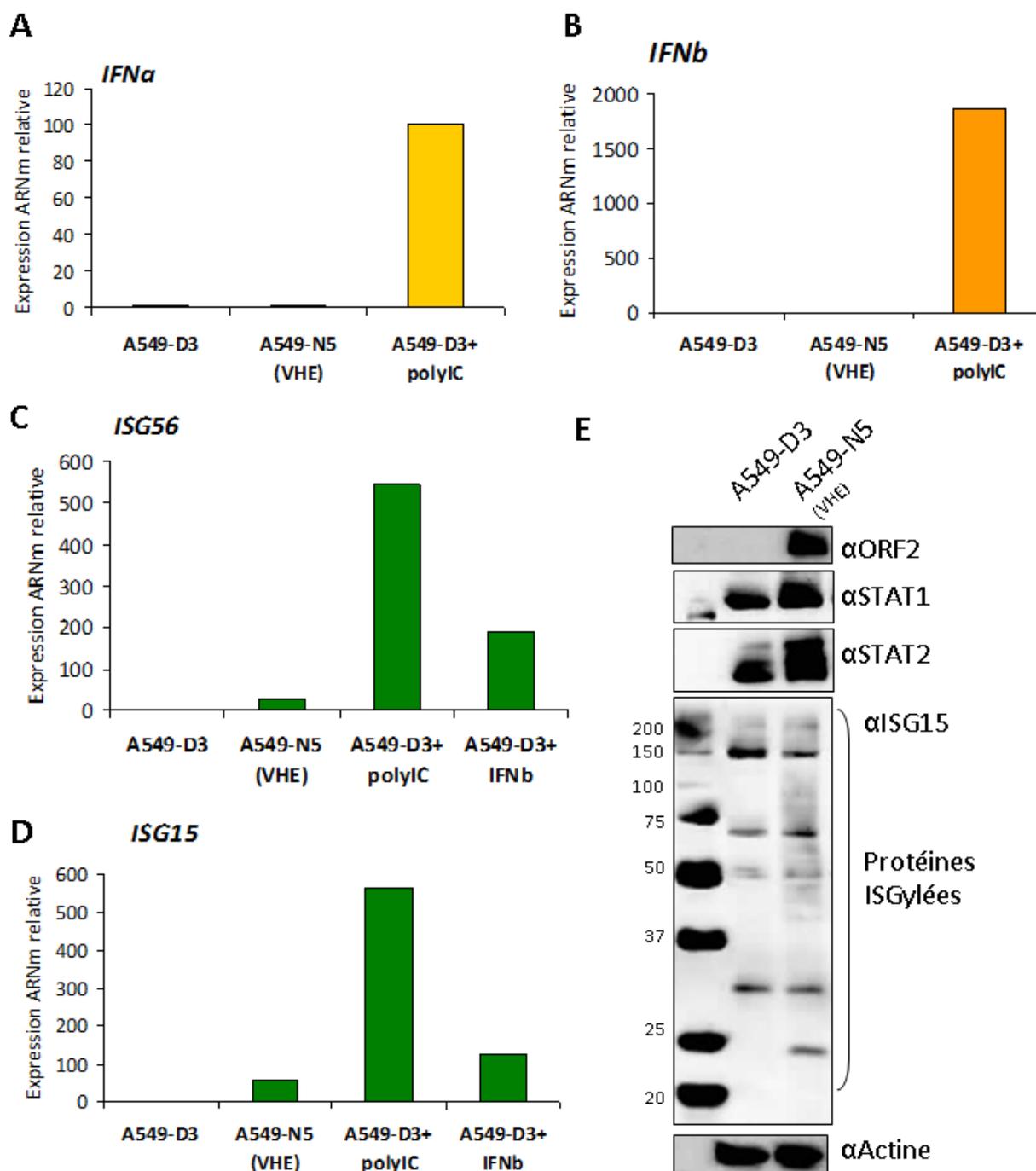


Figure 47. Le HEV n'affecte pas le niveau d'expression des ARN codant pour l'IFN-I dans les cellules A549-N5 mais est capable d'augmenter le niveau d'expression de certains ISGs. (A à D) L'expression des ARN codants pour l'IFN- α , IFN- β , ISG56 et ISG15 a été analysé par RT-PCRq dans des cellules A549-N5, des cellules contrôle A549-D3 et des cellules A549-D3 stimulées soit avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h soit avec 4 μ g/ml de poly(I:C) pendant 24h. (E) La production de certaines protéines codées par les ISGs (STAT1 et STAT2) et l'induction de l'ISGylation des protéines ont été analysées par immunoblot dans les cellules A549-N5 en comparaison des cellules contrôle A549-D3.

B- Etude de la stimulation des pDCs par co-culture avec des cellules HepaRG infectées par le HEV

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont permis de sélectionner différentes lignées cellulaires qui peuvent être utilisées pour la co-culture avec les pDCs. Les cellules HepG2/C3A sont de bonnes candidates du fait de leur origine hépatocytaires et de l'absence d'augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- α après infection par le HEV. Cependant, la réplication du virus y est peu efficace. Les cellules A549-N5 présentent l'intérêt d'être déjà infectées en produisant de forts titres viraux et avec un nombre de cellules infectées important (de l'ordre de 50%). Cependant, ces cellules étant d'origine pulmonaire, elles ne représentent pas un modèle très pertinent pour étudier l'infection par le HEV. De plus, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour différents ISGs a pu être observée dans ces cellules, suggérant qu'une réponse immunitaire est quand même mise en place et qu'il est possible que de l'IFN-I soit produit, mais à un niveau non détectable par PCRq. Les cellules HepaRG, au contraire, semblent être un bon modèle pour étudier la stimulation des pDCs par les cellules infectées. En effet, ce sont des cellules proches de cellules hépatocytaires primaires, et représentent donc bien les cellules cibles du HEV. De plus, ces cellules présentent un titre viral élevé, qui ne diminue pas au cours du temps, et elles ne présentent pas un niveau d'expression détectable des gènes codant pour l'IFN-I et des ISGs après infection. Nous avons donc choisi ces cellules pour la co-culture avec les pDCs.

Les cellules HepaRG infectées à une MI de 100 avec du HEV provenant de surnageant de cellules HepaRG infectées au 6^{ème} passage ont été mises en co-culture avec les PBMCs totales, les pDCs ou les PBMCs déplétées des pDCs pendant 24h. Les ARN totaux des cellules ont ensuite été extraits et des analyses par RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer le titre viral (Figure 49A) et la quantité relative des ARNm codant pour l'IFN- α 1 et l'IFN- α 2 (Figure 48B). En parallèle, le surnageant des cellules a été analysé par ELISA pour déterminer la quantité d'IFN-I sécrété par les pDCs (Figure 48C).

Tout d'abord, comme le montre la figure 48A, les cellules mises en contact avec les pDCs étaient bien infectées. Les résultats des figures 48B et C montrent que les pDCs sont activées par le HEV. En effet, on observe une augmentation de la synthèse des ARNm codant pour les IFN- α 1 et - α 2 ainsi qu'une production d'IFN-I dans le surnageant des co-cultures pDCs-

HepaRG infectées alors que cette augmentation n'est pas ou peu observée dans les co-cultures HepaRG infectées-PBMC et HepaRG infectées-PBMC déplétés des pDCs.

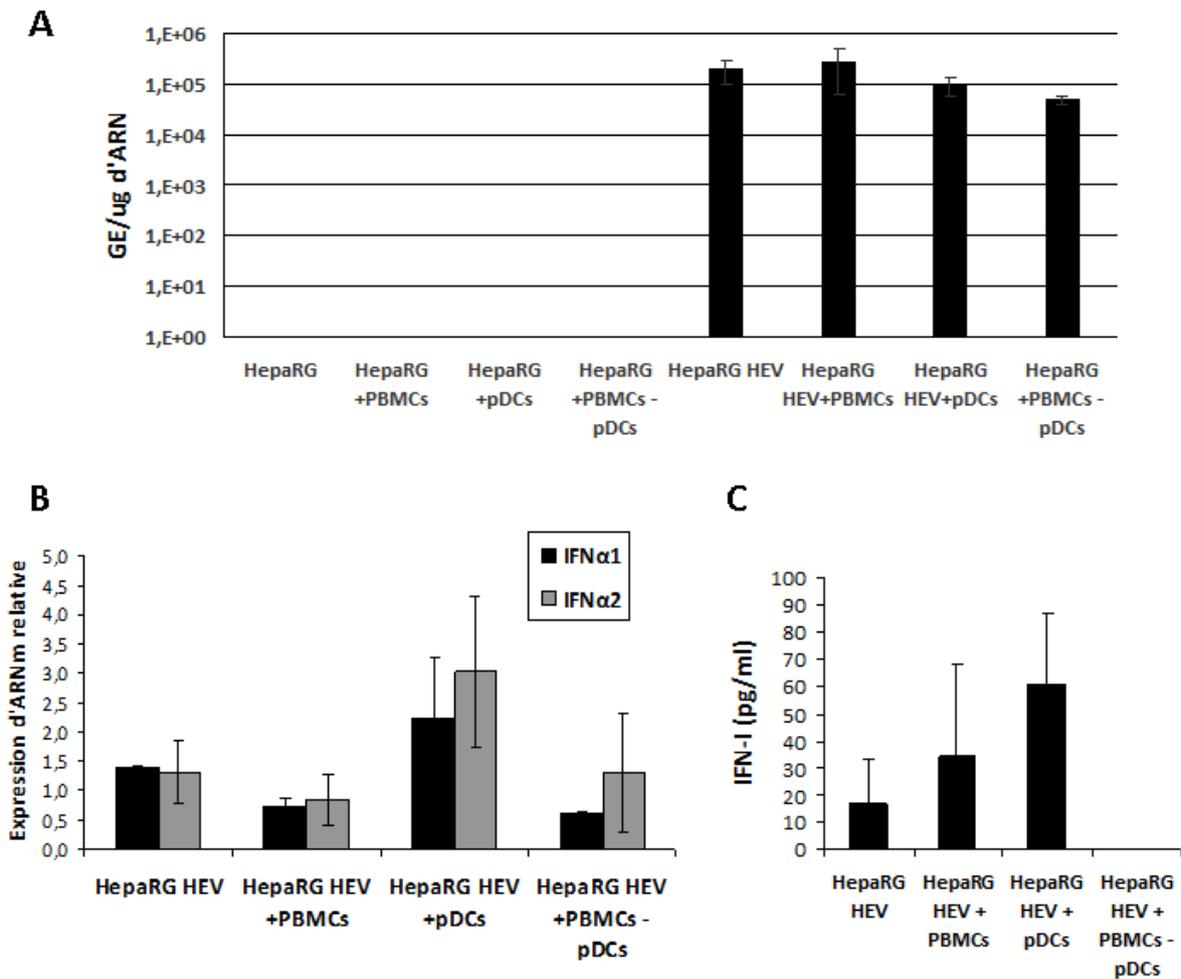


Figure 48. Co-culture des cellules HepaRG infectées avec les PBMCs, les pDCs ou les PBMCs déplétées des pDCs.

Après 24h de co-culture, l'ARN total des cellules HepaRG mises en co-culture avec les pDCs, PBMCs ou PBMCs déplétées des pDCs a été extrait et des analyses par RT-PCRq ont été réalisées afin de déterminer le titre viral (A) (en GE/μg d'ARN total) ainsi que la quantité d'ARN codant pour les IFN-α1 et IFN-α2 (B). (C) Analyse de la sécrétion d'IFN-I dans le surnageant de culture par ELISA.

V- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Parce que les pDCs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative en produisant de grandes quantités d'IFN-I en réponse à une infection virale, un des objectifs de ce projet de thèse a consisté en l'étude de la production d'IFN-I en réponse au HEV par les

pDCs. La première étape a été de trouver une lignée cellulaire qui soit permissive au HEV mais qui ne produise pas d'IFN- α en réponse à l'infection. En effet, une production d'IFN- α par les cellules infectées ne permettrait pas de conclure sur la production d'IFN- α par les pDCs lors de nos expériences de co-culture. Nous avons donc infecté différentes lignées cellulaires et étudié leur capacité à synthétiser de l'IFN- α en réponse au HEV. Ces expériences nous ont permis de sélectionner la lignée cellulaire la plus adaptée, qui permette la réplication du HEV et qui ne produise pas d'IFN- α . La deuxième étape a été de mettre la lignée sélectionnée en co-culture avec les pDCs et d'étudier la production d'IFN- α par les pDCs.

Nous avons sélectionné les cellules HepaRG pour la co-culture avec les pDCs et étudié la production d'IFN-I par les pDCs en réponse au HEV. Cependant, nous n'avons observé qu'une faible induction des ARNm codant pour l'IFN- α , d'environ 3 fois la quantité d'ARNm basale mais également une faible production d'IFN-I dans le surnageant des cellules (de l'ordre de 60pg/ml) dans la condition de stimulation des pDCs avec des cellules HepaRG infectées (Figure 48). Les pDCs induisent donc bien la production d'IFN-I, mais de manière faible en comparaison par exemple au YFV qui induit une synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α dans les PBMCs totales d'environ 1500 fois le niveau basal et une production dans le surnageant de l'ordre de 300pg/ml⁴⁰⁵. Cependant, ces résultats restent encore à confirmer car nous n'avons pu réaliser à ce jour qu'une seule expérience.

La synthèse d'IFN-I n'est pas observé dans les co-cultures HepaRG infectées-PBMC du fait du faible pourcentage de pDCs au sein des PBMC (<0.4%). Comme 10^5 cellules ont été déposées sur les cellules HepaRG dans la condition de co-culture avec les PBMC totales, cela représente au maximum 400 pDCs contre 2.5×10^4 pDCs dans la condition de co-culture avec les pDCs seules. Il est donc normal que la production d'IFN-I soit différente entre les deux conditions.

Les cellules HepaRG utilisées pour la co-culture avec les pDCs présentent un titre viral élevé, de l'ordre de 10^5 GE/ μ g d'ARN. Cependant, l'étude par IF en utilisant des anticorps anti-ORF2 (résultats non montrés ici) des cellules HepaRG infectées suggèrent que peu de cellules sont infectées. Cette faible proportion de cellules infectées pourrait expliquer la faible induction

d'IFN-I par les pDCs. Cependant, il a été montré dans le cas du virus Foamy que seulement 20 cellules infectées suffisent à induire la production d'IFN-I par les pDCs ⁴¹⁹, suggérant que la faible proportion de cellules HepaRG infectées ne serait peut-être pas la cause de la faible production d'IFN-I.

Enfin, il est également possible que les pDCs ne puissent être stimulées qu'en étant infectées directement par le HEV. En effet, il est possible que la production de particules virales dans le surnageant pendant les 24h de contact avec les pDCs ne soit pas suffisante pour induire une activation des pDCs. Au contraire, en utilisant du surnageant prélevé de cellules HepaRG infectées ayant un titre de HEV élevé pour stimuler les pDCs, ce surnageant contiendrait peut-être plus de particules virales et permettrait donc une meilleure stimulation des pDCs que le surnageant des cellules après seulement 24h de culture.

La faible induction de la réponse IFN-I observée après co-culture de cellules infectées par le HEV avec les pDCs ne semble cependant pas spécifique des pDCs. En effet, après infection des lignées hépatocytaires HepaRG et HepG2/C3A avec du HEV-3 provenant de surnageant de culture de cellules HepaRG infectées, nous n'avons pas observé de synthèse des ARNm codant pour l'IFN- α , l'IFN- β et pour les différents ISGs testés (MxA, ISG56 et ISG15) (Figures 43 et 44). De même, nous n'avons pas observé d'induction de différents types d'IFN-I en réponse au HEV dans les cellules A549-N5 mais nous avons quand même observé une synthèse faible d'ISG56 et d'ISG15 dans ces cellules (Figure 47).

Une explication à l'absence de synthèse d'IFN-I observée dans nos expériences serait la sensibilité de la méthode utilisée. Il est possible que l'induction de l'IFN-I soit difficile à détecter par PCRq. D'autres méthodes de détection, telle que la quantification de l'IFN-I dans le surnageant par test ELISA, devraient alors être utilisées afin de confirmer les résultats obtenus par PCRq. Il est également possible que les temps après infection analysés lors de cette étude ne soient pas appropriés pour détecter une potentielle synthèse d'IFN-I. De plus, nous avons étudié l'expression de quelques ISGs seulement dans nos expériences. Il est donc possible que le HEV induise la synthèse d'ISGs différents que ceux testés.

La faible réponse des cellules à l'infection par le HEV pourrait aussi s'expliquer par une faible reconnaissance du HEV par les PRRs cellulaires ou par l'inhibition des voies de synthèse et de réponse à l'IFN-I par le HEV.

Les résultats obtenus dans les pDCs, les cellules HepaRG, HepG2/C3A et A549-N5 sont en accord avec des résultats publiés qui ont montré une faible induction des réponses immunitaires en réponse au HEV. Notamment, il a été rapporté une faible induction de l'expression de l'IFN-I en réponse au HEV-1 dans des cellules humaines A549 par PCRq⁵³⁷, mais aucune sécrétion d'IFN-I n'a pu être mise en évidence par ELISA dans le surnageant des cellules infectées. Récemment, dans une autre étude, aucun IFN-I n'a été détecté par ELISA dans le surnageant de culture de cellules HepG2 et d'hépatocytes primaires humains après infection par le HEV-3⁵³⁸.

D'autres études ont rapporté une induction faible des ISGs après infection par le HEV. Il a récemment été montré une induction de l'ISG15 à J1 et J5 post-infection dans des cellules Huh7-S10-3 transfectées avec un clone infectieux d'un HEV-3 (Kernow-C1)⁵⁴³. Cependant, l'étude de l'expression de l'ISG15 aux même temps post-infection dans les cellules HepaRG dans nos expériences n'a pas montré d'augmentation de l'expression de l'ISG15 (Figure 44). Au contraire, dans les cellules A549-N5, une augmentation de l'expression de l'ISG15 a été observée par RT-PCRq et l'ISGylation des protéines a pu être observée par immunoblot. Cela suggère que les ISGs induits seraient dépendant du type cellulaire infecté.

Chez le chimpanzé, il a été observé une augmentation de l'expression d'ISG15, OAS1, Mx1, STAT1 et IRF7 après infection avec le HEV-1⁵⁴². Cependant, cette induction est faible en comparaison de l'induction des ISGs observés après infection avec le HCV. De plus, de nombreux ISGs induits en réponse au HCV ne sont pas induits après infection avec le HEV. La réponse atténuée des cellules au HEV, la virémie plus courte et la séroconversion plus précoce suggère que le HEV serait plus susceptible aux effets des ISGs et pourrait expliquer l'absence de signes cliniques observés lors de la plupart des infections par le HEV.

Dans des cellules Huh7.5, A549 et HepaRG transfectées avec un clone infectieux du HEV-3 (Kernow-C1), il a été rapporté que RIG-I était un des ISGs les plus exprimés et que cette protéine était capable d'inhiber la réplication du HEV⁵⁴⁶. Il a été montré que RIG-I induit la synthèse d'ISGs, mais que cette induction est indépendante d'une production d'IFN-I et qu'elle impliquerait que partiellement la phosphorylation de STAT1 et la voie JAK-STAT. Il

semblerait donc que RIG-I induise l'expression de deux types d'ISGs : certains seraient induits par la voie dépendante de la phosphorylation de STAT1 alors que d'autres seraient induits par une autre voie inconnue, indépendante de la voie JAK-STAT. Il a été rapporté que le complexe NF- κ B peut s'associer directement au promoteur ISRE ⁵⁷⁸. Une hypothèse serait que la deuxième voie activée par RIG-I, indépendante de la voie JAK-STAT, impliquerait l'activation de la voie NF- κ B et ainsi la liaison de NF- κ B au promoteur ISRE.

Il semble donc que l'induction d'IFN-I après infection par le HEV soit faible ou modérée et il est possible que l'induction des ISGs passe par une voie indépendante de l'IFN-I. Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

Une autre hypothèse pouvant expliquer qu'aucun ou peu d'IFN-I n'ait été détecté dans cette étude en réponse au HEV, pourrait être que le virus bloque les voies de signalisation de l'IFN-I dans les différentes lignées étudiées et notamment dans les pDCs. De nombreux virus sont capables d'inhiber les voies de synthèse et de réponse à l'IFN-I (voir introduction A-III-A-). Parmi eux, certains virus sont capables de bloquer l'activation des pDCs. C'est notamment le cas du HBV et du HCV. Il a été montré que la production d'IFN- α par les pDCs en réponse au HCV est faible en comparaison de la production observée en réponse aux virus Influenza et HSV-1 ⁵⁷⁹. En effet, le HCV inhibe la production d'IFN- α dans les pDCs. D'un côté, la glycoprotéine d'enveloppe E2 se lie aux immunorécepteurs de type lectine-C BDAC-2 (pour blood DC antigen 2) et DCIR (pour DC-immunoreceptor) présents à la surface des pDCs. Ces récepteurs sont des immunomodulateurs et leur activation induit une inhibition de la production des IFN-I et des cytokines pro-inflammatoires induites par TLR7 et TLR9. La liaison de la glycoprotéine d'enveloppe E2 avec BDAC-2 et DCIR va ainsi entraîner leur activation et donc l'inhibition de la production d'IFN-I ⁵⁸⁰. D'un autre côté, la protéine Core du HCV induit une diminution de l'expression de l'IRF7 ⁵⁸¹. Chez des patients atteints d'une hépatite B chronique, il a été montré un déficit de production d'IFN- α par les pDCs ^{582,583} dû à une diminution de l'expression des TLR7 et TLR9 ^{584,585}. La protéine C du paramyxovirus est également capable d'inhiber la voie de signalisation dépendante de TLR7 et TLR9 dans les pDCs en inhibant la phosphorylation de l'IRF7 ⁵⁸⁶. Différents virus sont donc capables de bloquer l'induction d'IFN-I par les pDCs. Il est donc possible que le HEV ait une activité inhibitrice similaire.

Perspectives

Afin de déterminer si la faible production d'IFN-I par les pDCs est due à une faible reconnaissance du HEV ou à une inhibition par le HEV des voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN- α dans les pDCs, différentes expériences pourront être réalisées. Dans un premier temps, afin de vérifier si le faible nombre de cellules HepaRG infectées est responsable de la faible induction observée, nous pourrions utiliser des cellules A549-N5 pour stimuler les pDCs. En effet, même si ce n'est pas le meilleur modèle pour étudier l'infection par le HEV du fait de leur origine pulmonaire, cette lignée présente environ 50% des cellules infectées. Si le même phénomène est observé, nous pourrions éliminer l'hypothèse du faible nombre de cellules infectées.

Dans la stratégie expérimentale initiale, nous avons prévu de comparer l'effet du contact des cellules infectées avec les pDCs (stimulation indirecte) avec l'infection des pDCs par du HEV libre provenant d'un surnageant de culture (stimulation directe) sur la production d'IFN- α par les pDCs. La mise en contact des pDCs avec du surnageant de cellules infectées nous permettrait de déterminer si la production d'IFN-I observée vient du contact cellule infectée-pDC ou vient de l'infection directe des cellules avec le surnageant infecté (Figure 49).

Afin d'étudier quelle(s) voie(s) de signalisation est(sont) activée(s) dans les pDCs, nous utiliserons la lignée Gen2.2 qui présente tous les marqueurs des pDCs. Des lignées de cellules Gen2.2 dans lesquelles l'expression de TLR7, RIG-I et MDA5 est réduite grâce à la transduction de lentivirus codant pour des shRNA appropriés sont déjà disponibles dans le laboratoire de Nolwenn Jouvenet (institut Pasteur). Des siRNAs dirigés contre différents composants des voies de signalisation des pDCs pourront également être utilisés⁵⁸⁷.

Afin de déterminer si certaines voies sont inhibées par le HEV dans les pDCs, nous pourrions étudier le niveau d'expression des récepteurs RIG-I, TLR7 et TLR9 ou des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Nous pourrions également étudier l'état de phosphorylation des facteurs de transcription.

De plus, il serait intéressant de pouvoir comparer l'effet de la stimulation des pDCs humaines avec l'effet de la stimulation de pDCs porcines. En effet, il est possible que les pDCs porcines ne produisent pas la même quantité d'IFN-I que des pDCs humaines en réponse au HEV. Il a notamment été montré une synthèse d'IFN-I *in vivo* chez le porc après infection par le HEV⁵³⁶. Si une synthèse plus importante d'IFN-I est observée dans les pDCs porcines, cela pourrait expliquer l'absence de symptômes cliniques chez le porc par rapport

aux symptômes tels que l'hépatite aiguë ou chronique observée chez l'homme. En effet, en produisant plus d'IFN-I, le système immunitaire porcin pourrait être capable d'éliminer plus facilement le HEV. Aucune étude n'a encore été publiée comparant l'effet de la stimulation par le même virus de pDCs porcines et de pDCs humaines. Les pDCs porcines, comme les pDCs humaines, sont les cellules produisant le plus d'IFN- α . Elles expriment fortement le facteur de transcription IRF7 et sont activées en réponse à des ligands de TLR7 et TLR9⁵⁸⁸, ce qui suggère que des voies de signalisations similaires sont activées dans les pDCs porcines et humaines. Les mêmes expériences pourraient donc être réalisées en parallèle dans les deux types de pDCs afin de pouvoir comparer leur activation en réponse au HEV.

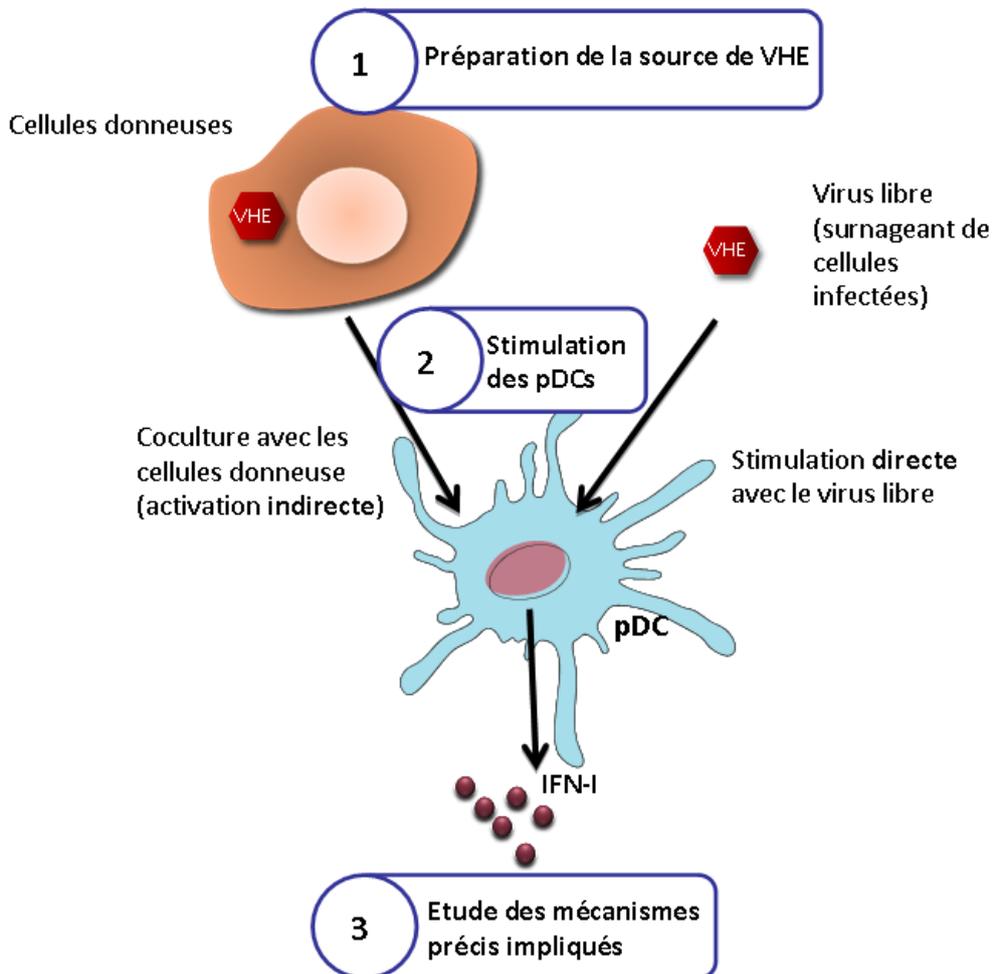


Figure 49. Perspectives sur l'étude de l'activation des pDCs par le HEV.

CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que l'ORF1 du HEV-3 contribue à l'échappement du virus à la réponse antivirale. L'ORF1 inhibe l'activité du promoteur ISRE induite par l'IFN- β via son domaine MetPCP. De plus, le domaine MetPCP inhibe l'expression de certains ISGs. En étudiant à quel niveau de la voie JAK-STAT l'inhibition avait lieu, nous avons montré que le domaine MetPCP bloque la phosphorylation de STAT1 et son entrée dans le noyau. Cette inhibition est spécifique de la voie de signalisation induite par l'IFN-I car aucune inhibition de la phosphorylation de STAT1 n'a pu être observée dans des cellules traitées avec l'IFN- γ . Nous avons également montré que le domaine MetPCP n'a pas d'effet sur l'état de phosphorylation de JAK1 ni sur celui de STAT2. Cependant, l'effet de MetPCP sur l'activation de TYK2, nécessaire à la phosphorylation de STAT1, n'a pas encore pu être caractérisé. Le domaine MetPCP pourrait donc inhiber la voie JAK-STAT en bloquant spécifiquement l'activation de STAT1 ou celle de TYK2. En réalisant un crible en GPCA, aucun composant clé de la voie de signalisation JAK-STAT n'a été identifié comme interagissant avec le domaine MetPCP. Cela suggère que l'inhibition pourrait se faire au niveau d'une protéine régulatrice de STAT1 telle que RACK1 ou qu'elle serait liée à l'activité du MetPCP, qui pourrait déISGylé STAT1. L'ORF1 du HEV inhibe également l'activité du promoteur IFN- β induite par la stimulation de la voie RLR via ses domaines PCP et MetPCP. En effectuant un crible en GPCA visant à rechercher des potentiels partenaires cellulaires des domaines PCP et MetPCP, nous avons déterminé que les domaines PCP et MetPCP sembleraient interagir avec une ou plusieurs protéines du complexe constitué de TBK1-IKK ϵ -NEMO, dont l'activation permet la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF1. Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de la voie RLR par les domaines PCP et MetPCP se ferait via une interaction avec une ou plusieurs protéines de ce complexe, inhibant ainsi son activation. Cependant, d'autres expériences complémentaires doivent être réalisées afin de confirmer cette hypothèse.

L'ORF1 est une protéine multifonctionnelle capable d'agir à différents niveaux des voies de signalisation de l'IFN-I (Figure 50). Cependant, certaines fonctions restent encore à découvrir, comme la fonction du domaine Y, qui est encore inconnue.

Les résultats obtenus pendant cette thèse semblent également indiquer que le HEV induit la synthèse d'IFN-I par les pDCs, mais cette synthèse est faible en comparaison de celle observée après stimulation des pDCs avec d'autres virus. Ces résultats suggèrent que le HEV serait un inducteur modéré de la réponse IFN-I ou pourrait inhiber les voies de signalisations conduisant à la synthèse d'IFN-I dans les pDCs. Cependant, la stimulation directe des pDCs avec du virus libre n'ayant pas été testé ici, l'hypothèse qu'une infection directe des pDCs par le HEV permettrait une induction d'IFN-I plus importante ne peut pas être exclue.

L'étude de l'interaction entre le HEV et le système IFN-I de l'hôte nous a permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués au cours de l'infection par le HEV et en particulier comment le HEV parvient à moduler le système IFN-I. Les résultats présentés dans cette thèse et dans les précédentes études indiquent que l'infection par le HEV induit modérément une réponse IFN de type I. Une des hypothèses de cette faible induction des réponses immunitaires serait que le HEV inhibe le système IFN-I de l'hôte. Cette hypothèse est corroborée par les résultats que nous avons obtenus sur l'inhibition des voies d'induction de l'IFN-I et de réponse à l'IFN-I par les domaines PCP et MetPCP du HEV. L'ORF2 et l'ORF3 sont également capables de bloquer ces voies de signalisation, suggérant que le HEV utilise plusieurs mécanismes pour contrer la réponse antivirale de l'hôte. Cette étude a également permis de mettre en évidence des différences d'activité entre des protéines virales d'un génotype strictement humain (HEV-1) et un génotype zoonotique (HEV-3). En effet, la protéine X du HEV-1 a un effet inhibiteur sur les voies de signalisation de l'IFN-I, contrairement à la protéine X du HEV-3. De telles différences pourraient être liées à des évolutions divergentes de ces génotypes chez leur hôte respectif et leur étude pourrait permettre de mieux comprendre les différences de pathogénèse entre les deux génotypes ou le passage de la barrière d'espèce.

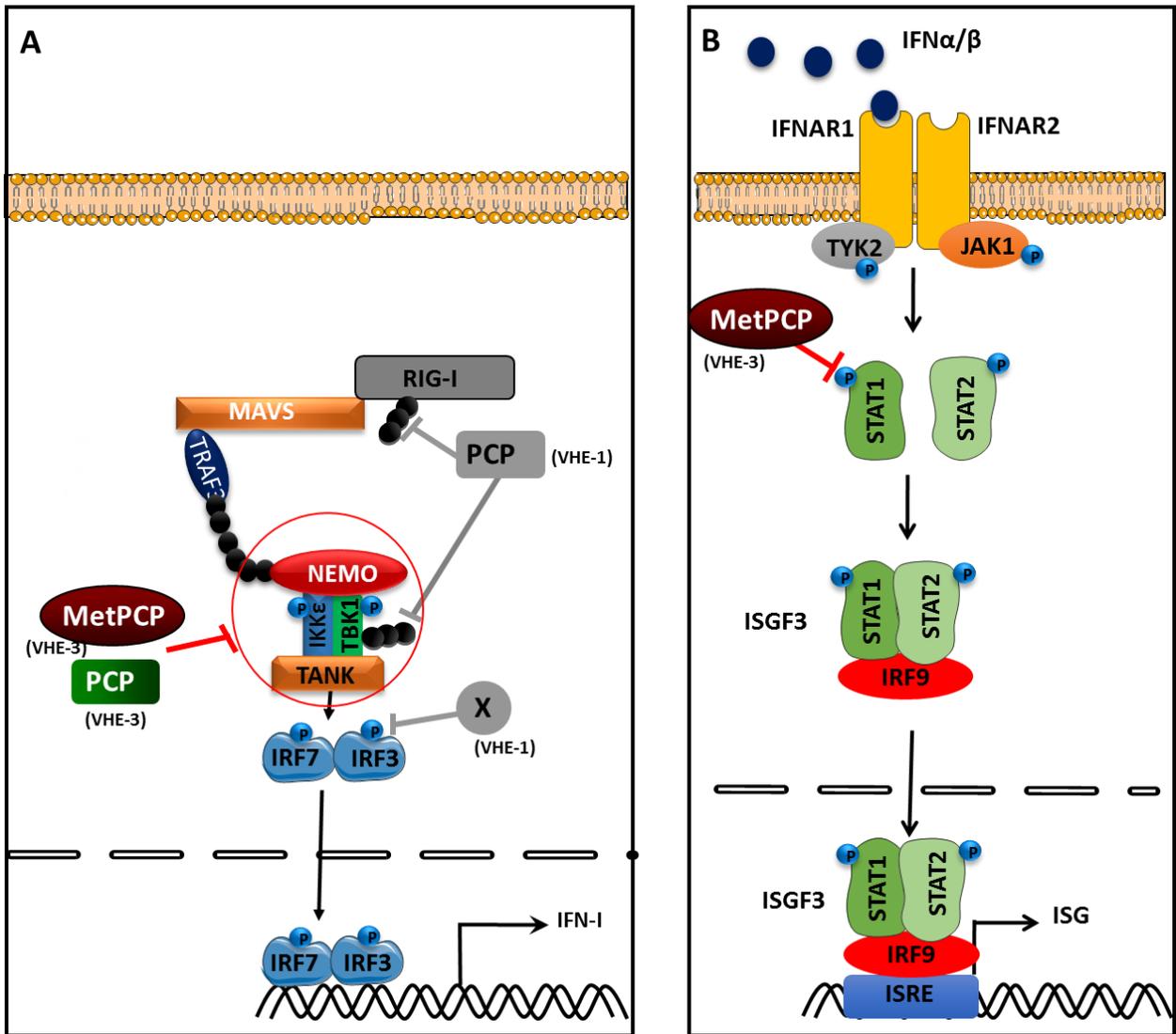


Figure 50. Modèle proposé de l'effet des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 sur les voies de synthèse de l'IFN-I (A) et de réponse à l'IFN-I (B) basés sur les travaux de cette thèse (en rouge).

Les autres mécanismes identifiés dans une étude précédente pour les domaines X et PCP du HEV-1 sont également indiqués (en gris)⁵⁵⁷.

BIBLIOGRAPHIE

1. Khuroo, M. S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* **68**, 818–824 (1980).
2. Balayan, M. S. *et al.* Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**, 23–31 (1983).
3. Reyes, G. R. *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **247**, 1335–1339 (1990).
4. Tam, A. W. *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**, 120–131 (1991).
5. Smith, D. B. *et al.* Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **96**, 1191–1192 (2015).
6. Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A. & Pavio, N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses* **8**, 270 (2016).
7. Khuroo, M. S., Khuroo, M. S. & Khuroo, N. S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.* **22**, 7030–7045 (2016).
8. Garbuglia, A. R. *et al.* Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 110–114 (2013).
9. Clayson, E. T. *et al.* Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 228–232 (1995).
10. Meng, X. J. *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9860–9865 (1997).
11. Kazuaki Takahashi, Terada, S., Hiroyuki Kokuryu, Arai, M. & Shunji Mishiro. A wild boar-derived hepatitis E virus isolate presumably representing so far unidentified 'genotype 5'. (2010).
12. Takahashi, M. *et al.* Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* **92**, 902–908 (2011).
13. Nakamura, M. *et al.* Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **34**, 137–140 (2006).
14. Nidaira, M. *et al.* Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* **74**, 1665–1668 (2012).
15. Zhao, C. *et al.* A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* **81**, 1371–1379 (2009).
16. Jirintai, S. *et al.* Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res.* **170**, 126–137 (2012).
17. Cossaboom, C. M., Córdoba, L., Dryman, B. A. & Meng, X.-J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 2047–2049 (2011).
18. Lhomme, S. *et al.* Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **58**, 357–362 (2013).
19. Hammerschmidt, F. *et al.* Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany. *Zoonoses Public Health* (2017).

20. Caruso, C. *et al.* Hepatitis E Virus: First Description in a Pet House Rabbit. A New Transmission Route for Human? *Transbound. Emerg. Dis.* **62**, 229–232 (2015).
21. Xu, F. *et al.* Hepatitis E virus genotype 4 in yak, northwestern China. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 2182–2184 (2014).
22. Woo, P. C. Y. *et al.* New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1044–1048 (2014).
23. Lin, J., Norder, H., Uhlhorn, H., Belák, S. & Widén, F. Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J. Gen. Virol.* **95**, 557–570 (2014).
24. Sridhar, S., Teng, J. L. L., Chiu, T.-H., Lau, S. K. P. & Woo, P. C. Y. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 869 (2017).
25. Payne, C. J., Ellis, T. M., Plant, S. L., Gregory, A. R. & Wilcox, G. E. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.* **68**, 119–125 (1999).
26. Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. & Meng, X. J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* **82**, 2449–2462 (2001).
27. Huang, F. F. *et al.* Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4197–4202 (2002).
28. Thiry, D. *et al.* Hepatitis E Virus and Related Viruses in Animals. *Transbound. Emerg. Dis.* **64**, 37–52 (2017).
29. Reuter, G. *et al.* A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (*Egretta garzetta*), in Hungary. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **46**, 74–77 (2016).
30. Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr. Opin. Virol.* **10**, 34–41 (2015).
31. Drexler, J. F. *et al.* Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.* **86**, 9134–9147 (2012).
32. Reuter, G. *et al.* Divergent hepatitis E virus in birds of prey, common kestrel (*Falco tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*), Hungary. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **43**, 343–346 (2016).
33. Batts, W., Yun, S., Hedrick, R. & Winton, J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* **158**, 116–123 (2011).
34. Guillois, Y. *et al.* High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **62**, 351–357 (2016).
35. Lhomme, S. *et al.* Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* **8**, 212 (2016).
36. Pavio, N. & Mansuy, J.-M. Hepatitis E in high-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**, 521–527 (2010).
37. Teshale, E. H. *et al.* Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 126–129 (2010).
38. Navaneethan, U., Al Mohajer, M. & Shata, M. T. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **28**, 1190–1199 (2008).
39. Dalton, H. R. *et al.* Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 77–85 (2016).

40. Drave, S. A. *et al.* Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J. Viral Hepat.* **23**, 512–521 (2016).
41. Helsen, N. *et al.* Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. *J. Hepatol.* **64**, 565–573 (2016).
42. Kamar, N. *et al.* Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **10**, 1321–1324 (2010).
43. Zhou, X. *et al.* Hepatitis E virus infects neurons and brains. *J. Infect. Dis.* **215**, 1167–1206 (2017).
44. Khuroo, M. S., Khuroo, M. S. & Khuroo, N. S. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries. *Viruses* **8**, 253 (2016).
45. Kane, M. A. *et al.* Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* **252**, 3140–3145 (1984).
46. Naik, S. R., Aggarwal, R., Salunke, P. N. & Mehrotra, N. N. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull. World Health Organ.* **70**, 597–604 (1992).
47. Viswanathan, R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study-epidemiology. 1957. *Natl. Med. J. India* **26**, 362–377 (2013).
48. Ippagunta, S. K., Naik, S., Sharma, B. & Aggarwal, R. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J. Med. Virol.* **79**, 1827–1831 (2007).
49. Ishida, S. *et al.* Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.* **157**, 2363–2368 (2012).
50. Vaidya, S. R., Tilekar, B. N., Walimbe, A. M. & Arankalle, V. A. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 1167–1170 (2003).
51. Teshale, E. H. *et al.* Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, 1006–1010 (2010).
52. Khuroo, M. S., Kamili, S. & Yattoo, G. N. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 778–784 (2004).
53. Hewitt, P. E. *et al.* Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet Lond. Engl.* **384**, 1766–1773 (2014).
54. Mansuy, J. M. *et al.* A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatol. Baltim. Md* **63**, 1145–1154 (2016).
55. Gallian, P. *et al.* Hepatitis E virus infections in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1914–1917 (2014).
56. Gallian, P. *et al.* Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors. *Transfusion (Paris)* **57**, 223–224 (2017).
57. Khuroo, M. S., Kamili, S. & Jameel, S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet Lond. Engl.* **345**, 1025–1026 (1995).
58. Khuroo, M. S., Kamili, S. & Khuroo, M. S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* **16**, 519–523 (2009).
59. Bose, P. D. *et al.* Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J. Gen. Virol.* **95**, 1266–1271 (2014).

60. Anty, R. *et al.* First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **54**, 76–78 (2012).
61. Tabatabai, J. *et al.* First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **61**, 170–172 (2014).
62. Bouquet, J. *et al.* Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 2018–2025 (2011).
63. Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 371–373 (2003).
64. Pavio, N., Merbah, T. & Thébault, A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1925–1927 (2014).
65. Feagins, A. R., Opriessnig, T., Guenette, D. K., Halbur, P. G. & Meng, X.-J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* **88**, 912–917 (2007).
66. Berto, A. *et al.* Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 264–266 (2013).
67. Takahashi, H. *et al.* A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch. Virol.* **157**, 235–246 (2012).
68. Said, B. *et al.* Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1738–1744 (2009).
69. Koizumi, Y. *et al.* Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3883–3885 (2004).
70. Liu, P. *et al.* Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 559–565 (2013).
71. Izopet, J. *et al.* Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1274–1281 (2012).
72. Abravanel, F. *et al.* Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1191–1193 (2017).
73. Lee, G.-H. *et al.* Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* **150**, 355–357.e3 (2016).
74. Huang, F. *et al.* Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* **64**, 350-359 (216).
75. Zhu, F.-C. *et al.* Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 895–902 (2010).
76. Gerolami, R. *et al.* Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **52**, 60–62 (2011).
77. Kamar, N. *et al.* Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* **140**, 1481–1489 (2011).
78. Kamar, N. *et al.* Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, e30-33 (2010).

79. Pischke, S. *et al.* Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **33**, 722–726 (2013).
80. Dao Thi, V. L. *et al.* Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology* **150**, 82–85.e4 (2016).
81. van der Valk, M., Zaaijer, H. L., Kater, A. P. & Schinkel, J. Sofosbuvir shows antiviral activity in a patient with chronic hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* **66**, 242–243 (2017).
82. Todesco, E. *et al.* Chronic hepatitis E in HIV/HBV coinfecting patient: lack of power of sofosbuvir-ribavirin. *AIDS Lond. Engl.* **31**, 1346–1348 (2017).
83. Barnaud, E., Rogée, S., Garry, P., Rose, N. & Pavio, N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5153–5159 (2012).
84. Johne, R., Trojnar, E., Filter, M. & Hofmann, J. Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 4225–4231 (2016).
85. Xing, L. *et al.* Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 33175–33183 (2010).
86. Qi, Y. *et al.* Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLoS One* **10**, e0132503 (2015).
87. Chapuy-Regaud, S. *et al.* Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* (2017).
88. Ahmad, I., Holla, R. P. & Jameel, S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* **161**, 47–58 (2011).
89. Graff, J., Torian, U., Nguyen, H. & Emerson, S. U. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* **80**, 5919–5926 (2006).
90. Nair, V. P. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* **12**, e1005521 (2016).
91. Osterman, A. *et al.* The Hepatitis E virus intraviral interactome. *Sci. Rep.* **5**, 13872 (2015).
92. Suppiah, S., Zhou, Y. & Frey, T. K. Lack of processing of the expressed ORF1 gene product of hepatitis E virus. *Viol. J.* **8**, 245 (2011).
93. Perttilä, J., Spuul, P. & Ahola, T. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J. Gen. Virol.* **94**, 807–816 (2013).
94. Panda, S. K., Ansari, I. H., Durgapal, H., Agrawal, S. & Jameel, S. The In Vitro-Synthesized RNA from a cDNA Clone of Hepatitis E Virus Is Infectious. *J. Virol.* **74**, 2430–2437 (2000).
95. Magden, J. *et al.* Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J. Virol.* **75**, 6249–6255 (2001).
96. Sehgal, D., Thomas, S., Chakraborty, M. & Jameel, S. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Viol. J.* **3**, 38 (2006).
97. Paliwal, D., Panda, S. K., Kapur, N., Varma, S. P. K. & Durgapal, H. Hepatitis E Virus (HEV) Protease: a Chymotrypsin-like Enzyme that Processes both Non-structural (pORF1) and Capsid (pORF2) Protein. *J. Gen. Virol.* **95**, 1689–1700(2014).
98. Parvez, M. K. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. *Virus Res.* **178**, 553–556 (2013).

99. Koonin, E. V. *et al.* Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8259–8263 (1992).
100. Parvez, M. K. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 ‘Y-domain’: Effects on RNA replication and virion infectivity. *World J. Gastroenterol.* **23**, 590–602 (2017).
101. Chen, J. P., Strauss, J. H., Strauss, E. G. & Frey, T. K. Characterization of the rubella virus nonstructural protease domain and its cleavage site. *J. Virol.* **70**, 4707–4713 (1996).
102. Ropp, S. L., Tam, A. W., Beames, B., Purdy, M. & Frey, T. K. Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch. Virol.* **145**, 1321–1337 (2000).
103. Parvez, M. K. & Khan, A. A. Molecular modeling and analysis of hepatitis E virus (HEV) papain-like cysteine protease. *Virus Res.* **179**, 220–224 (2014).
104. Karpe, Y. A. & Lole, K. S. Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J. Gen. Virol.* **92**, 2088–2092 (2011).
105. Pudupakam, R. S. *et al.* Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J. Virol.* **83**, 384–395 (2009).
106. Pudupakam, R. S. *et al.* Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J. Virol.* **85**, 10031–10040 (2011).
107. Shukla, P. *et al.* Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J. Virol.* **86**, 5697–5707 (2012).
108. Kenney, S. P. & Meng, X.-J. The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of hepatitis E virus are important for enhanced virus replication. *J. Virol.* **89**, 3793–3803 (2015).
109. Johne, R. *et al.* An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J. Viral Hepat.* **21**, 447–456 (2014).
110. Han, W., Li, X. & Fu, X. The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications. *Mutat. Res.* **727**, 86–103 (2011).
111. Gibson, B. A. & Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 411–424 (2012).
112. Egloff, M.-P. *et al.* Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J. Virol.* **80**, 8493–8502 (2006).
113. Neuvonen, M. & Ahola, T. Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J. Mol. Biol.* **385**, 212–225 (2009).
114. Eriksson, K. K., Cervantes-Barragán, L., Ludewig, B. & Thiel, V. Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1''-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J. Virol.* **82**, 12325–12334 (2008).
115. Park, E. & Griffin, D. E. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* **388**, 305–314 (2009).
116. Kuri, T. *et al.* The ADP-ribose-1''-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J. Gen. Virol.* **92**, 1899–1905 (2011).

117. Parvez, M. K. The hepatitis E virus ORF1 'X-domain' residues form a putative macrodomain protein/APP-1^h-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication. *Gene* **566**, 47–53 (2015).
118. Li, C. *et al.* Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation. *J. Virol.* **90**, 8478–8486 (2016).
119. Anang, S. *et al.* Identification of critical residues in Hepatitis E virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and ORF3 proteins. *Sci. Rep.* **6**, 25133 (2016).
120. Ojha, N. K. & Lole, K. S. Hepatitis E virus ORF1 encoded macro domain protein interacts with light chain subunit of human ferritin and inhibits its secretion. *Mol. Cell. Biochem.* **417**, 75–85 (2016).
121. Karpe, Y. A. & Lole, K. S. NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J. Virol.* **84**, 3595–3602 (2010).
122. Mhaindarkar, V., Sharma, K. & Lole, K. S. Mutagenesis of hepatitis E virus helicase motifs: effects on enzyme activity. *Virus Res.* **179**, 26–33 (2014).
123. Karpe, Y. A. & Lole, K. S. RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *J. Virol.* **84**, 9637–9641 (2010).
124. Agrawal, S., Gupta, D. & Panda, S. K. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* **282**, 87–101 (2001).
125. Mahilkar, S., Paingankar, M. S. & Lole, K. S. Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase: RNA template specificities, recruitment and synthesis. *J. Gen. Virol.* **97**, 2231–2242 (2016).
126. Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H. & Panda, S. K. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* **370**, 77–92 (2008).
127. Debing, Y. *et al.* A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology* **147**, 1008–1011.e7; quiz e15–16 (2014).
128. Lhomme, S. *et al.* Mutation in the Hepatitis E Virus Polymerase and Outcome of Ribavirin Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1608–1614 (2015).
129. Todt, D., Walter, S., Brown, R. J. P. & Steinmann, E. Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus-Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations. *Viruses* **8**, 283 (2016).
130. Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M. H. & Panda, S. K. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* **70**, 207–216 (1996).
131. Tyagi, S., Jameel, S. & Lal, S. K. A yeast two-hybrid study on self-association of the ORF2 protein of hepatitis E virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 614–621 (2001).
132. Lenggenhager, D. *et al.* Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *J. Hepatol.* **67**, 471–479 (2017).
133. Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K. & Jameel, S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J. Virol.* **73**, 4074–4082 (1999).
134. Surjit, M., Jameel, S. & Lal, S. K. Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **81**, 3339–3345 (2007).
135. Mori, Y. & Matsuura, Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* **161**, 59–64 (2011).

136. Torresi, J., Li, F., Locarnini, S. A. & Anderson, D. A. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **80 (Pt 5)**, 1185–1188 (1999).
137. Graff, J. *et al.* Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J. Virol.* **82**, 1185–1194 (2008).
138. Li, T. C. *et al.* Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **71**, 7207–7213 (1997).
139. Li, T.-C. *et al.* Essential Elements of the Capsid Protein for Self-Assembly into Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J. Virol.* **79**, 12999–13006 (2005).
140. Guu, T. S. Y. *et al.* Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12992–12997 (2009).
141. Yamashita, T. *et al.* Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12986–12991 (2009).
142. Surjit, M., Jameel, S. & Lal, S. K. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J. Virol.* **78**, 320–328 (2004).
143. Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S. & Lal, S. K. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J. Biol. Chem.* **277**, 22759–22767 (2002).
144. John, L., Thomas, S., Herchenröder, O., Pützer, B. M. & Schaefer, S. Hepatitis E Virus ORF2 Protein Activates the Pro-Apoptotic Gene CHOP and Anti-Apoptotic Heat Shock Proteins. *PLoS ONE* **6**, e25378 (2011).
145. Lal, S. K., Tulasiram, P. & Jameel, S. Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 63–67 (1997).
146. Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K. & Jameel, S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* **71**, 9045–9053 (1997).
147. Korkaya, H. *et al.* The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J. Biol. Chem.* **276**, 42389–42400 (2001).
148. Kar-Roy, A., Korkaya, H., Oberoi, R., Lal, S. K. & Jameel, S. The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase. *J. Biol. Chem.* **279**, 28345–28357 (2004).
149. Tyagi, S., Surjit, M., Roy, A. K., Jameel, S. & Lal, S. K. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBIP) and expedites their export from the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **279**, 29308–29319 (2004).
150. Surjit, M., Oberoi, R., Kumar, R. & Lal, S. K. Enhanced alpha1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J. Biol. Chem.* **281**, 8135–8142 (2006).
151. Tyagi, S., Surjit, M. & Lal, S. K. The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor. *J. Virol.* **79**, 12081–12087 (2005).
152. Tyagi, S., Jameel, S. & Lal, S. K. Self-association and mapping of the interaction domain of hepatitis E virus ORF3 protein. *J. Virol.* **75**, 2493–2498 (2001).

153. Ratra, R., Kar-Roy, A. & Lal, S. K. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with hemopexin by means of its 26 amino acid N-terminal hydrophobic domain II. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 1957–1969 (2008).
154. Moin, S. M., Panteva, M. & Jameel, S. The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J. Biol. Chem.* **282**, 21124–21133 (2007).
155. Emerson, S. U., Nguyen, H., Torian, U. & Purcell, R. H. ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Is Not Required for Replication, Virion Assembly, or Infection of Hepatoma Cells In Vitro. *J. Virol.* **80**, 10457–10464 (2006).
156. Yamada, K. *et al.* ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 1880–1891 (2009).
157. Ding, Q. *et al.* Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114(5)**, 1147–1152 (2017).
158. Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D. & Jameel, S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.* **83**, 12714–12724 (2009).
159. Zhang, L. *et al.* Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2. *J. Med. Virol.* **88**, 2186–2195 (2016).
160. Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z. & Jameel, S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic Cph. Den.* **16**, 398–416 (2015).
161. Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H. & Panda, S. K. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J. Viral Hepat.* **19**, 436–448 (2012).
162. Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y. & Feng, Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J. Virol.* **90**, 4232–4242 (2016).
163. Zheng, Z.-Z. *et al.* Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J. Gen. Virol.* **91**, 1728–1736 (2010).
164. Yu, H. *et al.* Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78. *J. Mol. Model.* **17**, 987–995 (2011).
165. Nanda, S. K., Panda, S. K., Durgapal, H. & Jameel, S. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J. Med. Virol.* **42**, 237–240 (1994).
166. Nagashima, S. *et al.* A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J. Gen. Virol.* **92**, 269–278 (2011).
167. Nagashima, S. *et al.* Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J. Gen. Virol.* **92**, 2838–2848 (2011).
168. Yin, X., Li, X. & Feng, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. *Viruses* **8**, (2016).
169. Nagashima, S. *et al.* Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* **95**, 2166–2175 (2014).
170. Nagashima, S. *et al.* The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch. Virol.* **159**, 979–991 (2014).
171. Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I. & Zhang, Y.-J. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J. Virol.* **83**, 6375–6382 (2009).

172. Emerson, S. U. *et al.* Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15270–15275 (2001).
173. Huang, Y. W. *et al.* Capped RNA transcripts of full-length cDNA clones of swine hepatitis E virus are replication competent when transfected into Huh7 cells and infectious when intrahepatically inoculated into pigs. *J. Virol.* **79**, 1552–1558 (2005).
174. Si, F. *et al.* Construction of an infectious cDNA clone of a swine genotype 3 HEV strain isolated in Shanghai, China. *Intervirology* **57**, 74–82 (2014).
175. Yamada, K. *et al.* Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 457–462 (2009).
176. Córdoba, L. *et al.* Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs. *J. Gen. Virol.* **93**, 2183–2194 (2012).
177. Zhu, Y. *et al.* Infectivity of a genotype 4 hepatitis E virus cDNA clone by intrahepatic inoculation of laboratory rats. *Vet. Microbiol.* **166**, 405–411 (2013).
178. Huang, F. F., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV. *J. Gen. Virol.* **86**, 2585–2593 (2005).
179. Kwon, H. M. *et al.* Construction of an infectious cDNA clone of avian hepatitis E virus (avian HEV) recovered from a clinically healthy chicken in the United States and characterization of its pathogenicity in specific-pathogen-free chickens. *Vet. Microbiol.* **147**, 310–319 (2011).
180. Debing, Y. *et al.* A rat model for hepatitis E virus. *Dis. Model. Mech.* **9**, 1203–1210 (2016).
181. Li, T.-C. *et al.* Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **96**, 1320–1327 (2015).
182. Emerson, S. U. *et al.* In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* **78**, 4838–4846 (2004).
183. Tam, A. W. *et al.* In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* **215**, 1–9 (1996).
184. Tam, A. W. *et al.* In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* **238**, 94–102 (1997).
185. Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E. & Okamoto, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 903–911 (2007).
186. Tanaka, T. *et al.* Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1906–1910 (2009).
187. Schemmerer, M. *et al.* Enhanced Replication of Hepatitis E Virus Strain 47832c in an A549-Derived Subclonal Cell Line. *Viruses* **8**, (2016).
188. Nguyen, H. T. *et al.* A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J. Gen. Virol.* **93**, 526–530 (2012).
189. Shukla, P. *et al.* Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2438–2443 (2011).
190. Rogée, S. *et al.* New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J. Gen. Virol.* **94**, 549–558 (2013).

191. Meng, X. J. *et al.* Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* **143**, 1405–1415 (1998).
192. Lee, Y. H., Ha, Y., Ahn, K. K. & Chae, C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet. J. Lond. Engl.* **197**, 417–421 (2009).
193. Williams, T. P. *et al.* Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3040–3046 (2001).
194. Tang, Z.-M. *et al.* The Bama miniature swine is susceptible to experimental HEV infection. *Sci. Rep.* **6**, 31813 (2016).
195. Billam, P. *et al.* Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of hepatitis E virus: identification of nonliver replication sites. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2630–2634 (2008).
196. Han, J. *et al.* SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS One* **9**, e99861 (2014).
197. Mao, J. *et al.* Detection and localization of rabbit hepatitis e virus and antigen in systemic tissues from experimentally intraperitoneally infected rabbits. *PLoS One* **9**, e88607 (2014).
198. Xia, J. *et al.* Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *J. Viral Hepat.* **22**, 850–857 (2015).
199. Li, T.-C. *et al.* Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet. Microbiol.* **163**, 54–61 (2013).
200. Li, T.-C. *et al.* Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. *Vet. Microbiol.* **183**, 30–36 (2016).
201. Shi, R. *et al.* Evidence of Hepatitis E virus breaking through the blood-brain barrier and replicating in the central nervous system. *J. Viral Hepat.* **23**, 930–939 (2016).
202. Huang, F. *et al.* Experimental infection of Balb/c nude mice with Hepatitis E virus. *BMC Infect. Dis.* **9**, 93 (2009).
203. Allweiss, L. *et al.* Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J. Hepatol.* **64**, 1033–1040 (2016).
204. Sayed, I. M. *et al.* Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut.* **66** (5), 906–929 (2016).
205. van de Garde, M. D. B. *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. *J. Virol.* **90**, 4394–4401 (2016).
206. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **147**, 258–267 (1957).
207. Isaacs, A., Lindenmann, J. & Valentine, R. C. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **147**, 268–273 (1957).
208. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
209. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189 (2004).
210. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545 (2014).
211. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).

212. Kurt-Jones, E. A. *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**, 398–401 (2000).
213. Burzyn, D. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J. Virol.* **78**, 576–584 (2004).
214. Georgel, P. *et al.* Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* **362**, 304–313 (2007).
215. Okumura, A., Pitha, P. M., Yoshimura, A. & Harty, R. N. Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1. *J. Virol.* **84**, 27–33 (2010).
216. Modhiran, N. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 491–495 (2017).
217. Bieback, K. *et al.* Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* **76**, 8729–8736 (2002).
218. Compton, T. *et al.* Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**, 4588–4596 (2003).
219. Kurt-Jones, E. A. *et al.* Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1315–1320 (2004).
220. Ariza, M.-E., Glaser, R., Kaumaya, P. T. P., Jones, C. & Williams, M. V. The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 851–859 (2009).
221. Ge, Y. *et al.* Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **87**, 11160–11167 (2013).
222. Dolganiuc, A. *et al.* Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* **127**, 1513–1524 (2004).
223. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5598–5603 (2004).
224. Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N. & Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398–1401 (2007).
225. Dreux, M. *et al.* Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* **12**, 558–570 (2012).
226. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
227. Hardarson, H. S. *et al.* Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H251–258 (2007).
228. Zhang, S.-Y. *et al.* TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**, 1522–1527 (2007).
229. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
230. Dansako, H. & Kato, N. [Recognition mechanism of hepatitis C viral infection]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* **73**, 229–233 (2015).
231. Tsai, Y.-T., Chang, S.-Y., Lee, C.-N. & Kao, C.-L. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell. Microbiol.* **11**, 604–615 (2009).

- 232.von Buttlar, H., Siegemund, S., Büttner, M. & Alber, G. Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* **9**, e106188 (2014).
- 233.Tabeta, K. *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3516–3521 (2004).
- 234.Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513–520 (2003).
- 235.Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K. & Gosselin, J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 3620–3631 (2010).
- 236.Raykov, Z. *et al.* TLR-9 contributes to the antiviral innate immune sensing of rodent parvoviruses MVMp and H-1PV by normal human immune cells. *PLoS One* **8**, e55086 (2013).
- 237.Sieben, M., Schäfer, P., Dinsart, C., Galle, P. R. & Moehler, M. Activation of the human immune system via toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1. *Int. J. Cancer* **132**, 2548–2556 (2013).
- 238.Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
- 239.Fitzgerald, K. A. *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78–83 (2001).
- 240.Hornig, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**, 835–841 (2001).
- 241.Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. & Medzhitov, R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**, 329–333 (2002).
- 242.Yamamoto, M. *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 6668–6672 (2002).
- 243.Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J. & Wesche, H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5567–5572 (2002).
- 244.Deng, L. *et al.* Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361 (2000).
- 245.Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346–351 (2001).
- 246.Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651 (2009).
- 247.Hoebe, K. *et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743–748 (2003).
- 248.Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
- 249.Fitzgerald, K. A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* **198**, 1043–1055 (2003).
- 250.Yamamoto, M. *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**, 1144–1150 (2003).

251. Meylan, E. *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nat. Immunol.* **5**, 503–507 (2004).
252. Häcker, H. *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204–207 (2006).
253. Oganessian, G. *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208–211 (2006).
254. Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**, 491–496 (2003).
255. Sharma, S. *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148–1151 (2003).
256. Wang, J. *et al.* NF- κ B RelA subunit is crucial for early IFN- β expression and resistance to RNA virus replication. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1720–1729 (2010).
257. Panne, D., Maniatis, T. & Harrison, S. C. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* **129**, 1111–1123 (2007).
258. Honda, K. *et al.* Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15416–15421 (2004).
259. Kawai, T. *et al.* Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**, 1061–1068 (2004).
260. Satoh, T. *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1512–1517 (2010).
261. Fredericksen, B. L., Keller, B. C., Fornek, J., Katze, M. G. & Gale, M. Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J. Virol.* **82**, 609–616 (2008).
262. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).
263. Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**, 1601–1610 (2008).
264. Goubau, D. *et al.* Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* **514**, 372–375 (2014).
265. Schuberth-Wagner, C. *et al.* A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'-O-Methylated Self RNA. *Immunity* **43**, 41–51 (2015).
266. Devarkar, S. C. *et al.* Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 596–601 (2016).
267. Gebhardt, A., Laudénbach, B. T. & Pichlmair, A. Discrimination of Self and Non-Self Ribonucleic Acids. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **37**, 184–197 (2017).
268. Malathi, K., Dong, B., Gale, M. & Silverman, R. H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816–819 (2007).
269. Malathi, K. *et al.* RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA N. Y. N* **16**, 2108–2119 (2010).
270. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
271. Pichlmair, A. *et al.* Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* **83**, 10761–10769 (2009).

272. Kowalinski, E. *et al.* Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* **147**, 423–435 (2011).
273. Gack, M. U. *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916–920 (2007).
274. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. & Seya, T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* **284**, 807–817 (2009).
275. Oshiumi, H. *et al.* The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* **8**, 496–509 (2010).
276. Zeng, W. *et al.* Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* **141**, 315–330 (2010).
277. Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981–988 (2005).
278. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
279. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
280. Xu, L.-G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* **19**, 727–740 (2005).
281. Liu, S. *et al.* MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *eLife* **2**, e00785 (2013).
282. Ryzhakov, G. & Randow, F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J.* **26**, 3180–3190 (2007).
283. de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A. & Hertzog, P. J. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J. Biol. Chem.* **282**, 20053–20057 (2007).
284. Müller, M. *et al.* The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* **366**, 129–135 (1993).
285. Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G. R. & Pellegrini, S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* **70**, 313–322 (1992).
286. Lamken, P., Lata, S., Gavutis, M. & Piehler, J. Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J. Mol. Biol.* **341**, 303–318 (2004).
287. Remy, I., Wilson, I. A. & Michnick, S. W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990–993 (1999).
288. Gauzzi, M. C. *et al.* Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 20494–20500 (1996).
289. Krishnan, K., Yan, H., Lim, J. T. & Krolewski, J. J. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene* **13**, 125–133 (1996).
290. Silvennoinen, O., Ihle, J. N., Schlessinger, J. & Levy, D. E. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* **366**, 583–585 (1993).
291. Abramovich, C. *et al.* Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. *EMBO J.* **13**, 5871–5877 (1994).

292. Plataniias, L. C. & Colamonici, O. R. Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of its receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 24053–24057 (1992).
293. Plataniias, L. C., Uddin, S. & Colamonici, O. R. Tyrosine phosphorylation of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. Interferon-beta selectively induces tyrosine phosphorylation of an alpha subunit-associated protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17761–17764 (1994).
294. Zhao, W. *et al.* A conserved IFN-alpha receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5483–5489 (2008).
295. Li, X., Leung, S., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2048–2056 (1997).
296. Yan, H. *et al.* Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNAR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.* **15**, 1064–1074 (1996).
297. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15623–15628 (1998).
298. Blaszczyk, K. *et al.* The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **29**, 71–81 (2016).
299. Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375–386 (2005).
300. Schoggins, J. W. *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **472**, 481–485 (2011).
301. Horisberger, M. A., Staeheli, P. & Haller, O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1910–1914 (1983).
302. Staeheli, P., Horisberger, M. A. & Haller, O. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology* **132**, 456–461 (1984).
303. Haller, O., Staeheli, P., Schwemmler, M. & Kochs, G. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* **23**, 154–163 (2015).
304. Yu, Z. *et al.* GTPase activity is not essential for the interferon-inducible MxA protein to inhibit the replication of hepatitis B virus. *Arch. Virol.* **153**, 1677–1684 (2008).
305. Kochs, G. & Haller, O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2082–2086 (1999).
306. Xiao, H., Killip, M. J., Staeheli, P., Randall, R. E. & Jackson, D. The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm. *J. Virol.* **87**, 13053–13058 (2013).
307. Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H. & Haller, O. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3153–3158 (2002).
308. Li, N. *et al.* MxA inhibits hepatitis B virus replication by interaction with hepatitis B core antigen. *Hepatology. Baltim. Md* **56**, 803–811 (2012).
309. Schwemmler, M., Weining, K. C., Richter, M. F., Schumacher, B. & Staeheli, P. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology* **206**, 545–554 (1995).

310. Staeheli, P. & Pavlovic, J. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J. Virol.* **65**, 4498–4501 (1991).
311. Haller, O. Dynamins are forever: MxB inhibits HIV-1. *Cell Host Microbe* **14**, 371–373 (2013).
312. Zhou, X. *et al.* Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 200–208 (2013).
313. Daffis, S. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452–456 (2010).
314. Pichlmair, A. *et al.* IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.* **12**, 624–630 (2011).
315. Szretter, K. J. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. *PLoS Pathog.* **8**, e1002698 (2012).
316. Liu, X.-Y., Chen, W., Wei, B., Shan, Y.-F. & Wang, C. IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 2559–2568 (2011).
317. Zheng, C. *et al.* IFIT5 positively regulates NF- κ B signaling through synergizing the recruitment of I κ B kinase (IKK) to TGF- β -activated kinase 1 (TAK1). *Cell. Signal.* **27**, 2343–2354 (2015).
318. Zhang, B., Liu, X., Chen, W. & Chen, L. IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **45**, 867–874 (2013).
319. Li, Y. *et al.* ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7945–7950 (2009).
320. Silverman, R. H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* **81**, 12720–12729 (2007).
321. Dong, B. & Silverman, R. H. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J. Biol. Chem.* **270**, 4133–4137 (1995).
322. Samuel, C. E. Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 600–604 (1979).
323. Meurs, E. *et al.* Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**, 379–390 (1990).
324. Munir, M. & Berg, M. The multiple faces of protein kinase R in antiviral defense. *Virulence* **4**, 85–89 (2013).
325. Williams, B. R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**, 6112–6120 (1999).
326. McAllister, C. S. *et al.* Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. *J. Virol.* **84**, 380–386 (2010).
327. Gilfoy, F. D. & Mason, P. W. West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* **81**, 11148–11158 (2007).
328. Schulz, O. *et al.* Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* **7**, 354–361 (2010).
329. Sen, A., Pruijssers, A. J., Dermody, T. S., García-Sastre, A. & Greenberg, H. B. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J. Virol.* **85**, 3717–3732 (2011).

330. Gil, J. *et al.* TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4502–4512 (2004).
331. Bonnet, M. C., Daurat, C., Ottone, C. & Meurs, E. F. The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. *Cell. Signal.* **18**, 1865–1875 (2006).
332. Zhang, P., Langland, J. O., Jacobs, B. L. & Samuel, C. E. Protein kinase PKR-dependent activation of mitogen-activated protein kinases occurs through mitochondrial adapter IPS-1 and is antagonized by vaccinia virus E3L. *J. Virol.* **83**, 5718–5725 (2009).
333. Yuan, W. & Krug, R. M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J.* **20**, 362–371 (2001).
334. Zhao, C. *et al.* The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7578–7582 (2004).
335. Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M. & Huibregtse, J. M. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 4334–4338 (2006).
336. Wong, J. J. Y., Pung, Y. F., Sze, N. S.-K. & Chin, K.-C. HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10735–10740 (2006).
337. Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. I., Ritchie, K. J. & Zhang, D.-E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 9976–9981 (2002).
338. Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S. & Krug, R. M. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10200–10205 (2005).
339. Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I. & Pitha, P. M. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1440–1445 (2006).
340. Malakhova, O. A. & Zhang, D.-E. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J. Biol. Chem.* **283**, 8783–8787 (2008).
341. Okumura, A., Pitha, P. M. & Harty, R. N. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3974–3979 (2008).
342. Pincetic, A., Kuang, Z., Seo, E. J. & Leis, J. The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process. *J. Virol.* **84**, 4725–4736 (2010).
343. Tang, Y. *et al.* Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 5777–5790 (2010).
344. Zhao, C., Hsiang, T.-Y., Kuo, R.-L. & Krug, R. M. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2253–2258 (2010).
345. Durfee, L. A., Lyon, N., Seo, K. & Huibregtse, J. M. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol. Cell* **38**, 722–732 (2010).
346. D’Cunha, J., Knight, E., Haas, A. L., Truitt, R. L. & Borden, E. C. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 211–215 (1996).

347. Bogunovic, D. *et al.* Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* **337**, 1684–1688 (2012).
348. Flynn, J. L. *et al.* An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* **178**, 2249–2254 (1993).
349. Recht, M., Borden, E. C. & Knight, E. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **147**, 2617–2623 (1991).
350. Zhang, X. *et al.* Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation. *Nature* **517**, 89–93 (2015).
351. Speer, S. D. *et al.* ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice. *Nat. Commun.* **7**, 11496 (2016).
352. Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405–439 (1996).
353. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
354. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503–533 (2001).
355. Wilkinson, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **11**, 1245–1256 (1997).
356. Zheng, N. & Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 129–157 (2017).
357. Davis, M. E. & Gack, M. U. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology* **479–480**, 52–65 (2015).
358. Heaton, S. M., Borg, N. A. & Dixit, V. M. Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity. *J. Exp. Med.* **213**, 1–13 (2016).
359. Chuang, T.-H. & Ulevitch, R. J. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **5**, 495–502 (2004).
360. Huang, B. & Baek, S.-H. Trim13 Potentiates Toll-Like Receptor 2-Mediated Nuclear Factor κ B Activation via K29-Linked Polyubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. *Mol. Pharmacol.* **91**, 307–316 (2017).
361. Zhong, B. *et al.* Ubiquitin-specific protease 25 regulates TLR4-dependent innate immune responses through deubiquitination of the adaptor protein TRAF3. *Sci. Signal.* **6**, ra35 (2013).
362. Arimoto, K. *et al.* Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15856–15861 (2010).
363. Zotti, T. *et al.* TRAF7 protein promotes Lys-29-linked polyubiquitination of I κ B kinase (IKK γ)/NF- κ B essential modulator (NEMO) and p65/RelA protein and represses NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 22924–22933 (2011).
364. Tu, D. *et al.* Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep.* **3**, 747–758 (2013).
365. Ning, S., Campos, A. D., Darnay, B. G., Bentz, G. L. & Pagano, J. S. TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6536–6546 (2008).
366. Kumar, K. G. S. *et al.* SCF(HOS) ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon-alpha receptor. *EMBO J.* **22**, 5480–5490 (2003).

367. Tanaka, T., Soriano, M. A. & Grusby, M. J. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity* **22**, 729–736 (2005).
368. Yuan, C., Qi, J., Zhao, X. & Gao, C. Smurf1 protein negatively regulates interferon- γ signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* **287**, 17006–17015 (2012).
369. Ren, Y. *et al.* Deubiquitinase USP2a Sustains Interferons Antiviral Activity by Restricting Ubiquitination of Activated STAT1 in the Nucleus. *PLoS Pathog.* **12**, e1005764 (2016).
370. Lawrence, D. W. & Kornbluth, J. E3 ubiquitin ligase NKLAM ubiquitinates STAT1 and positively regulates STAT1-mediated transcriptional activity. *Cell. Signal.* **28**, 1833–1841 (2016).
371. Lu, G. *et al.* ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **52**, 29–41 (2006).
372. Shi, H.-X. *et al.* Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2424–2436 (2010).
373. Kim, M.-J., Hwang, S.-Y., Imaizumi, T. & Yoo, J.-Y. Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J. Virol.* **82**, 1474–1483 (2008).
374. Takeuchi, T. & Yokosawa, H. ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 9–13 (2005).
375. Minakawa, M., Sone, T., Takeuchi, T. & Yokosawa, H. Regulation of the nuclear factor (NF)- κ B pathway by ISGylation. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2223–2227 (2008).
376. Malakhov, M. P. *et al.* High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J. Biol. Chem.* **278**, 16608–16613 (2003).
377. Giannakopoulos, N. V. *et al.* Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 496–506 (2005).
378. Vitour, D. *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J. Biol. Chem.* **284**, 21797–21809 (2009).
379. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 900–911 (2003).
380. Croker, B. A., Kiu, H. & Nicholson, S. E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 414–422 (2008).
381. Dong, L.-W. *et al.* Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *Mol. Immunol.* **45**, 3025–3035 (2008).
382. Chen, K., Liu, J. & Cao, X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* **83**, 1-11(2017).
383. Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835–1837 (1999).
384. Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W. & Liu, Y.-J. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **107**, 2423–2431 (2006).
385. Bruel, T. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cell Dynamics Tune Interferon- α Production in SIV-Infected Cynomolgus Macaques. *PLoS Pathog.* **10**, e1003915 (2014).
386. Machmach, K. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J. Virol.* **86**, 4245–4252 (2012).

387. Pichyangkul, S. *et al.* A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 5571–5578 (2003).
388. Dalod, M. *et al.* Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 517–528 (2002).
389. Cervantes-Barragan, L. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3012–3017 (2012).
390. Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* **33**, 955–966 (2010).
391. Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog.* **9**, e1003728 (2013).
392. Smit, J. J., Rudd, B. D. & Lukacs, N. W. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* **203**, 1153–1159 (2006).
393. Hoeffel, G. *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **27**, 481–492 (2007).
394. Lui, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PloS One* **4**, e7111 (2009).
395. Tel, J. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells phagocytose, process, and present exogenous particulate antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 4276–4283 (2010).
396. Tel, J. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459–467 (2013).
397. O'Brien, M. *et al.* Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J. Clin. Invest.* **121**, 1088–1101 (2011).
398. Chaperot, L. *et al.* Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 248–255 (2006).
399. Gandini, M. *et al.* Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2257 (2013).
400. Stary, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* **114**, 3854–3863 (2009).
401. Honda, K. *et al.* Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035–1040 (2005).
402. Guiducci, C. *et al.* Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* **203**, 1999–2008 (2006).
403. Krug, A. *et al.* Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433–1437 (2004).
404. Krug, A. *et al.* TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107–119 (2004).
405. Bruni, D. *et al.* Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci. Signal.* **8**, ra25 (2015).

406. Décembre, E. *et al.* Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.* **10**, e1004434 (2014).
407. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
408. Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19–28 (2005).
409. Sun, Q. *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**, 633–642 (2006).
410. Szabo, A. *et al.* TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 671–678 (2014).
411. Stone, A. E. L. *et al.* Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.* **9**, e1003316 (2013).
412. Mesa, M. C., Rodríguez, L.-S., Franco, M. A. & Angel, J. Interaction of rotavirus with human peripheral blood mononuclear cells: plasmacytoid dendritic cells play a role in stimulating memory rotavirus specific T cells in vitro. *Virology* **366**, 174–184 (2007).
413. Feng, Z. *et al.* Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J. Clin. Invest.* **125**, 169–176 (2015).
414. Negrotto, S. *et al.* Human Plasmacytoid Dendritic Cells Elicited Different Responses after Infection with Pathogenic and Nonpathogenic Junin Virus Strains. *J. Virol.* **89**, 7409–7413 (2015).
415. Beignon, A.-S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115**, 3265–3275 (2005).
416. Pritschet, K. *et al.* CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* **423**, 152–164 (2012).
417. Macal, M. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells are productively infected and activated through TLR-7 early after arenavirus infection. *Cell Host Microbe* **11**, 617–630 (2012).
418. Scheuplein, V. A. *et al.* High secretion of interferons by human plasmacytoid dendritic cells upon recognition of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **89**, 3859–3869 (2015).
419. Rua, R., Lepelley, A., Gessain, A. & Schwartz, O. Innate sensing of foamy viruses by human hematopoietic cells. *J. Virol.* **86**, 909–918 (2012).
420. Lepelley, A. *et al.* Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* **7**, e1001284 (2011).
421. Frenz, T. *et al.* Independent of plasmacytoid dendritic cell (pDC) infection, pDC triggered by virus-infected cells mount enhanced type I IFN responses of different composition as opposed to pDC stimulated with free virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 2496–2503 (2014).
422. Wieland, S. F. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J. Virol.* **88**, 752–757 (2014).
423. Baglio, S. R. *et al.* Sensing of latent EBV infection through exosomal transfer of 5'pppRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E587-596 (2016).
424. García-Nicolás, O. *et al.* Sensing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Macrophages by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front. Microbiol.* **7**, 771 (2016).

425. Poiret, E. *Analyse bibliographique du rôle des interactions moléculaires dans l'échappement des virus à la voie interféron*. (2017).
426. Fan, L., Briese, T. & Lipkin, W. I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J. Virol.* **84**, 1785–1791 (2010).
427. Xing, J., Ly, H. & Liang, Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *J. Virol.* **89**, 2944–2955 (2015).
428. Barral, P. M. *et al.* MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **81**, 3677–3684 (2007).
429. Barral, P. M., Sarkar, D., Fisher, P. B. & Racaniello, V. R. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* **391**, 171–176 (2009).
430. Feng, Q. *et al.* Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J. Virol.* **88**, 3369–3378 (2014).
431. Kuo, R.-L., Kao, L.-T., Lin, S.-J., Wang, R. Y.-L. & Shih, S.-R. MDA5 plays a crucial role in enterovirus 71 RNA-mediated IRF3 activation. *PLoS One* **8**, e63431 (2013).
432. Lei, X. *et al.* The 3C protein of enterovirus 71 inhibits retinoid acid-inducible gene I-mediated interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon responses. *J. Virol.* **84**, 8051–8061 (2010).
433. Davis, M. E. *et al.* Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5. *Cell Host Microbe* **16**, 19–30 (2014).
434. Mesman, A. W. *et al.* Measles virus suppresses RIG-I-like receptor activation in dendritic cells via DC-SIGN-mediated inhibition of PP1 phosphatases. *Cell Host Microbe* **16**, 31–42 (2014).
435. van Kasteren, P. B. *et al.* Arterivirus and nairovirus ovarian tumor domain-containing Deubiquitinases target activated RIG-I to control innate immune signaling. *J. Virol.* **86**, 773–785 (2012).
436. Jiang, J. & Tang, H. Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein. *Protein Cell* **1**, 1106–1117 (2010).
437. Frias-Staheli, N. *et al.* Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* **2**, 404–416 (2007).
438. Go, Y. Y. *et al.* Equine arteritis virus does not induce interferon production in equine endothelial cells: identification of nonstructural protein 1 as a main interferon antagonist. *BioMed Res. Int.* **2014**, 420658 (2014).
439. van Kasteren, P. B. *et al.* Deubiquitinase function of arterivirus papain-like protease 2 suppresses the innate immune response in infected host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E838–847 (2013).
440. Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S. R. & Fang, Y. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J. Virol.* **84**, 7832–7846 (2010).
441. Sun, Z., Li, Y., Ransburgh, R., Snijder, E. J. & Fang, Y. Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15. *J. Virol.* **86**, 3839–3850 (2012).
442. García-Sastre, A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe* **22**, 176–184 (2017).
443. Versteeg, G. A. & García-Sastre, A. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 508–516 (2010).

444. Dong, J. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 3C protease cleaves the mitochondrial antiviral signalling complex to antagonize IFN- β expression. *J. Gen. Virol.* **96**, 3049–3058 (2015).
445. Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J. G. & Yoo, D. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* **4**, 424–446 (2012).
446. Wei, C. *et al.* The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1158–1168 (2010).
447. Ren, J. *et al.* Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate cellular signaling by targeting MAVS. *J. Virol.* **86**, 13049–13061 (2012).
448. Karim, R. *et al.* Human papillomavirus (HPV) upregulates the cellular deubiquitinase UCHL1 to suppress the keratinocyte's innate immune response. *PLoS Pathog.* **9**, e1003384 (2013).
449. Wang, S., Wang, K., Li, J. & Zheng, C. Herpes simplex virus 1 ubiquitin-specific protease UL36 inhibits beta interferon production by deubiquitinating TRAF3. *J. Virol.* **87**, 11851–11860 (2013).
450. Shi, C.-S. *et al.* SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 3080–3089 (2014).
451. Ferreon, J. C., Ferreon, A. C. M., Li, K. & Lemon, S. M. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J. Biol. Chem.* **280**, 20483–20492 (2005).
452. Lei, X. *et al.* Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *J. Virol.* **85**, 8811–8818 (2011).
453. Li, K. *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2992–2997 (2005).
454. Mukherjee, A. *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* **7**, e1001311 (2011).
455. Wang, D. *et al.* Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling. *J. Virol.* **86**, 9311–9322 (2012).
456. Wang, D. *et al.* Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon. *J. Virol.* **88**, 10252–10258 (2014).
457. Pythoud, C. *et al.* Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKK ϵ . *J. Virol.* **86**, 7728–7738 (2012).
458. Lu, L. L., Puri, M., Horvath, C. M. & Sen, G. C. Select paramyxoviral V proteins inhibit IRF3 activation by acting as alternative substrates for inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKK ϵ)/TBK1. *J. Biol. Chem.* **283**, 14269–14276 (2008).
459. Prins, K. C., Cárdenas, W. B. & Basler, C. F. Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1. *J. Virol.* **83**, 3069–3077 (2009).
460. Ramanan, P. *et al.* Structural basis for Marburg virus VP35-mediated immune evasion mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20661–20666 (2012).

461. Cimica, V., Dalrymple, N. A., Roth, E., Nasonov, A. & Mackow, E. R. An innate immunity-regulating virulence determinant is uniquely encoded by the Andes virus nucleocapsid protein. *mBio* **5**, e0108813(2014).
462. Wang, G., Chen, G., Zheng, D., Cheng, G. & Tang, H. PLP2 of mouse hepatitis virus A59 (MHV-A59) targets TBK1 to negatively regulate cellular type I interferon signaling pathway. *PLoS One* **6**, e17192 (2011).
463. Pourcelot, M. *et al.* The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* **14**, 69 (2016).
464. Arnold, M. M. & Patton, J. T. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J. Virol.* **85**, 1970–1979 (2011).
465. Arnold, M. M., Barro, M. & Patton, J. T. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *J. Virol.* **87**, 9813–9821 (2013).
466. Barro, M. & Patton, J. T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4114–4119 (2005).
467. Barro, M. & Patton, J. T. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol.* **81**, 4473–4481 (2007).
468. Douagi, I. *et al.* Role of interferon regulatory factor 3 in type I interferon responses in rotavirus-infected dendritic cells and fibroblasts. *J. Virol.* **81**, 2758–2768 (2007).
469. Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L. & Hardy, M. E. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J. Virol.* **76**, 9545–9550 (2002).
470. Graff, J. W., Ewen, J., Ettayebi, K. & Hardy, M. E. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J. Gen. Virol.* **88**, 613–620 (2007).
471. Sen, A., Feng, N., Ettayebi, K., Hardy, M. E. & Greenberg, H. B. IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation. *J. Virol.* **83**, 10322–10335 (2009).
472. Zhao, B. *et al.* Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E3403–3412 (2016).
473. Wang, J.-T. *et al.* Epstein-Barr virus BGLF4 kinase suppresses the interferon regulatory factor 3 signaling pathway. *J. Virol.* **83**, 1856–1869 (2009).
474. Wang, S., Wang, K., Lin, R. & Zheng, C. Herpes simplex virus 1 serine/threonine kinase US3 hyperphosphorylates IRF3 and inhibits beta interferon production. *J. Virol.* **87**, 12814–12827 (2013).
475. Matthews, K., Schäfer, A., Pham, A. & Frieman, M. The SARS coronavirus papain like protease can inhibit IRF3 at a post activation step that requires deubiquitination activity. *Virol. J.* **11**, 209 (2014).
476. Liang, Q. *et al.* ORF45 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits phosphorylation of interferon regulatory factor 7 by IKK ϵ and TBK1 as an alternative substrate. *J. Virol.* **86**, 10162–10172 (2012).
477. Sathish, N., Zhu, F. X., Golub, E. E., Liang, Q. & Yuan, Y. Mechanisms of autoinhibition of IRF-7 and a probable model for inactivation of IRF-7 by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein ORF45. *J. Biol. Chem.* **286**, 746–756 (2011).
478. Zhu, F. X., Sathish, N. & Yuan, Y. Antagonism of host antiviral responses by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus tegument protein ORF45. *PLoS One* **5**, e10573 (2010).

479. Chang, T.-H. *et al.* Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. *PLoS Pathog.* **5**, e1000493 (2009).
480. Lefort, S., Soucy-Faulkner, A., Grandvaux, N. & Flamand, L. Binding of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP to interferon-responsive factor 3 elements modulates antiviral gene expression. *J. Virol.* **81**, 10950–10960 (2007).
481. Cloutier, N. & Flamand, L. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen inhibits interferon (IFN) beta expression by competing with IFN regulatory factor-3 for binding to IFNB promoter. *J. Biol. Chem.* **285**, 7208–7221 (2010).
482. Joo, C. H. *et al.* Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J. Virol.* **81**, 8282–8292 (2007).
483. Fernández de Marco, M. del M., Alejo, A., Hudson, P., Damon, I. K. & Alcami, A. The highly virulent variola and monkeypox viruses express secreted inhibitors of type I interferon. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1479–1488 (2010).
484. Montanuy, I., Alejo, A. & Alcami, A. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 1960–1971 (2011).
485. Bisson, S. A., Page, A.-L. & Ganem, D. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein that forms inhibitory complexes with type I interferon receptor subunits, Jak and STAT proteins, and blocks interferon-mediated signal transduction. *J. Virol.* **83**, 5056–5066 (2009).
486. Xu, J., Liu, S., Xu, Y., Tien, P. & Gao, G. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. *Virus Res.* **141**, 55–62 (2009).
487. Lu, J. *et al.* Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the level of interferon receptor 1. *J. Virol.* **86**, 3767–3776 (2012).
488. Shi, L., Ramaswamy, M., Manzel, L. J. & Look, D. C. Inhibition of Jak1-dependent signal transduction in airway epithelial cells infected with adenovirus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 720–728 (2007).
489. Ren, J. *et al.* Human metapneumovirus inhibits IFN- β signaling by downregulating Jak1 and Tyk2 cellular levels. *PloS One* **6**, e24496 (2011).
490. Miller, D. M. *et al.* Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* **187**, 675–683 (1998).
491. Miller, D. M., Zhang, Y., Rahill, B. M., Waldman, W. J. & Sedmak, D. D. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 6107–6113 (1999).
492. Geiger, T. R. & Martin, J. M. The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells. *J. Virol.* **80**, 11638–11650 (2006).
493. Li, S. *et al.* The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* **18**, 5727–5737 (1999).
494. Shanker, V., Trincucci, G., Heim, H. M. & Duong, H. T. F. Protein phosphatase 2A impairs IFN α -induced antiviral activity against the hepatitis C virus through the inhibition of STAT1 tyrosine phosphorylation. *J. Viral Hepat.* **20**, 612–621 (2013).

495. Bode, J. G. *et al.* IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**, 488–490 (2003).
496. Chee, A. V. & Roizman, B. Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. *J. Virol.* **78**, 4185–4196 (2004).
497. Moore, E. C., Barber, J. & Tripp, R. A. Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15). *Virology* **5**, 116 (2008).
498. Oshansky, C. M., Krunkosky, T. M., Barber, J., Jones, L. P. & Tripp, R. A. Respiratory syncytial virus proteins modulate suppressors of cytokine signaling 1 and 3 and the type I interferon response to infection by a toll-like receptor pathway. *Viral Immunol.* **22**, 147–161 (2009).
499. Yokota, S. *et al.* Herpes simplex virus type 1 suppresses the interferon signaling pathway by inhibiting phosphorylation of STATs and janus kinases during an early infection stage. *Virology* **286**, 119–124 (2001).
500. Yokota, S. *et al.* Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J. Virol.* **78**, 6282–6286 (2004).
501. Koksai, A. C. & Cingolani, G. Dimerization of Vaccinia virus VH1 is essential for dephosphorylation of STAT1 at tyrosine 701. *J. Biol. Chem.* **286**, 14373–14382 (2011).
502. Koksai, A. C., Nardozi, J. D. & Cingolani, G. Dimeric quaternary structure of the prototypical dual specificity phosphatase VH1. *J. Biol. Chem.* **284**, 10129–10137 (2009).
503. Kumthip, K. *et al.* Hepatitis C virus NS5A disrupts STAT1 phosphorylation and suppresses type I interferon signaling. *J. Virol.* **86**, 8581–8591 (2012).
504. Mann, B. A. *et al.* Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **28**, 367–380 (2008).
505. Najarro, P., Traktman, P. & Lewis, J. A. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J. Virol.* **75**, 3185–3196 (2001).
506. Duerst, R. J. & Morrison, L. A. Herpes simplex virus 2 virion host shutoff protein interferes with type I interferon production and responsiveness. *Virology* **322**, 158–167 (2004).
507. Kadeppagari, R.-K., Sanchez, R. L. & Foster, T. P. HSV-2 inhibits type-I interferon signaling via multiple complementary and compensatory STAT2-associated mechanisms. *Virus Res.* **167**, 273–284 (2012).
508. Korom, M., Wylie, K. M. & Morrison, L. A. Selective ablation of virion host shutoff protein RNase activity attenuates herpes simplex virus 2 in mice. *J. Virol.* **82**, 3642–3653 (2008).
509. Murphy, J. A., Duerst, R. J., Smith, T. J. & Morrison, L. A. Herpes simplex virus type 2 virion host shutoff protein regulates alpha/beta interferon but not adaptive immune responses during primary infection in vivo. *J. Virol.* **77**, 9337–9345 (2003).
510. Schomacker, H. *et al.* The C proteins of human parainfluenza virus type 1 block IFN signaling by binding and retaining Stat1 in perinuclear aggregates at the late endosome. *PLoS One* **7**, e28382 (2012).

511. Hung, H.-C. *et al.* Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. *J. Infect. Dis.* **203**, 1784–1790 (2011).
512. Du, Y. *et al.* 3Cpro of foot-and-mouth disease virus antagonizes the interferon signaling pathway by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J. Virol.* **88**, 4908–4920 (2014).
513. Patel, D. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J. Virol.* **84**, 11045–11055 (2010).
514. Wang, C. *et al.* Enterovirus 71 Suppresses Interferon Responses by Blocking JAK/STAT Signaling through Inducing Karyopherin- α 1 Degradation. *J. Biol. Chem.* (2017).
515. Wang, R., Nan, Y., Yu, Y. & Zhang, Y.-J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp1 β inhibits interferon-activated JAK/STAT signal transduction by inducing karyopherin- α 1 degradation. *J. Virol.* **87**, 5219–5228 (2013).
516. Feagins, A. R. & Basler, C. F. Lloviu virus VP24 and VP35 proteins function as innate immune antagonists in human and bat cells. *Virology* **485**, 145–152 (2015).
517. Frieman, M. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J. Virol.* **81**, 9812–9824 (2007).
518. Mateo, M., Reid, S. P., Leung, L. W., Basler, C. F. & Volchkov, V. E. Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling. *J. Virol.* **84**, 1169–1175 (2010).
519. Reid, S. P. *et al.* Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J. Virol.* **80**, 5156–5167 (2006).
520. Reid, S. P., Valmas, C., Martinez, O., Sanchez, F. M. & Basler, C. F. Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1. *J. Virol.* **81**, 13469–13477 (2007).
521. Xu, W. *et al.* Ebola virus VP24 targets a unique NLS binding site on karyopherin alpha 5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1. *Cell Host Microbe* **16**, 187–200 (2014).
522. Stuart, J. H., Sumner, R. P., Lu, Y., Snowden, J. S. & Smith, G. L. Vaccinia Virus Protein C6 Inhibits Type I IFN Signalling in the Nucleus and Binds to the Transactivation Domain of STAT2. *PLoS Pathog.* **12**, e1005955 (2016).
523. Caignard, G. *et al.* Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* **368**, 351–362 (2007).
524. Takeuchi, K., Kadota, S., Takeda, M., Miyajima, N. & Nagata, K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* **545**, 177–182 (2003).
525. Caignard, G. *et al.* Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* **383**, 112–120 (2009).
526. Fontana, J. M., Bankamp, B., Bellini, W. J. & Rota, P. A. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* **374**, 71–81 (2008).
527. Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K. & Yanagi, Y. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* **85**, 2991–2999 (2004).

528. Palosaari, H., Parisien, J.-P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M. & Horvath, C. M. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* **77**, 7635–7644 (2003).
529. Chinnakannan, S. K., Nanda, S. K. & Baron, M. D. Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PLoS One* **8**, e57063 (2013).
530. Devaux, P., von Messling, V., Songsungthong, W., Springfield, C. & Cattaneo, R. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* **360**, 72–83 (2007).
531. Devaux, P. *et al.* A recombinant measles virus unable to antagonize STAT1 function cannot control inflammation and is attenuated in rhesus monkeys. *J. Virol.* **85**, 348–356 (2011).
532. Devaux, P., Priniski, L. & Cattaneo, R. The measles virus phosphoprotein interacts with the linker domain of STAT1. *Virology* **444**, 250–256 (2013).
533. Takayama, I. *et al.* The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology* **424**, 45–55 (2012).
534. Shaffer, J. A., Bellini, W. J. & Rota, P. A. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**, 389–397 (2003).
535. Yokota, S. *et al.* Measles virus suppresses interferon- α signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon- α receptor complex. *Virology* **306**, 135–146 (2003).
536. Lee, Y. H., Ha, Y. & Chae, C. Expression of interferon- α and Mx protein in the livers of pigs experimentally infected with swine hepatitis E virus. *J. Comp. Pathol.* **142**, 187–192 (2010).
537. Devhare, P. B., Chatterjee, S. N., Arankalle, V. A. & Lole, K. S. Analysis of antiviral response in human epithelial cells infected with hepatitis E virus. *PLoS One* **8**, e63793 (2013).
538. Yin, X. *et al.* Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog.* **13**, e1006417 (2017).
539. Moal, V. *et al.* Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J. Infect. Dis.* **207**, 125–132 (2013).
540. Jagya, N. *et al.* RNA-seq based transcriptome analysis of hepatitis E virus (HEV) and hepatitis B virus (HBV) replicon transfected Huh-7 cells. *PLoS One* **9**, e87835 (2014).
541. Zhang, F. *et al.* Hepatitis E genotype 4 virus from feces of monkeys infected experimentally can be cultured in PLC/PRF/5 cells and upregulate host interferon-inducible genes. *J. Med. Virol.* **86**, 1736–1744 (2014).
542. Yu, C. *et al.* Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J. Virol.* **84**, 11264–11278 (2010).
543. Sooryanarain, H. *et al.* ISG15 modulates type-I interferon signaling and antiviral response during hepatitis E virus replication. *J. Virol.* (2017). doi:10.1128/JVI.00621-17
544. Devhare, P. B., Desai, S. & Lole, K. S. Innate immune responses in human hepatocyte-derived cell lines alter genotype 1 hepatitis E virus replication efficiencies. *Sci. Rep.* **6**, 26827 (2016).
545. Xu, L. *et al.* IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 3352–3367 (2016).

546. Xu, L. *et al.* RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatol. Baltim. Md.* **65**, 1823-1829 (2017).
547. Dong, C. *et al.* Suppression of interferon- α signaling by hepatitis E virus. *Hepatol. Baltim. Md* **55**, 1324–1332 (2012).
548. Zhou, X. *et al.* Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **23**, 294–304 (2016).
549. Todt, D. *et al.* Antiviral Activities of Different Interferon Types and Subtypes against Hepatitis E Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2132–2139 (2016).
550. Huang, F. *et al.* Hepatitis E virus infection activates signal regulator protein α to down-regulate type I interferon. *Immunol. Res.* **64**, 115–122 (2016).
551. Nan, Y. *et al.* Enhancement of interferon induction by ORF3 product of hepatitis E virus. *J. Virol.* **88**, 8696–8705 (2014).
552. He, M. *et al.* The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF- κ B Signaling via TRADD and RIP1. *Sci. Rep.* **6**, 27597 (2016).
553. Xu, J. *et al.* Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor- κ B signaling induced by tumor necrosis factor- α in human A549 lung epithelial cells. *PLoS One* **9**, e100787 (2014).
554. Lei, Q. *et al.* ORF3 of Hepatitis E Virus Inhibits the Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemotactic Factors in LPS-Stimulated Human PMA-THP1 Cells by Inhibiting NF- κ B Pathway. *Viral Immunol.* **29**, 105–111 (2016).
555. Varshney, B. & Lal, S. K. The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF- κ B activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of I κ B α in human hepatoma cells. *BMC Biochem.* **13**, 7 (2012).
556. Tian, Y. *et al.* Systematic identification of hepatitis E virus ORF2 interactome reveals that TMEM134 engages in ORF2-mediated NF- κ B pathway. *Virus Res.* **228**, 102–108 (2017).
557. Nan, Y. *et al.* Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J. Virol.* **88**, 11924–11932 (2014).
558. Ojha, N. K. & Lole, K. S. Hepatitis E virus ORF1 encoded non structural protein-host protein interaction network. *Virus Res.* **213**, 195–204 (2016).
559. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
560. Chauveau, E. *et al.* NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J. Virol.* **87**, 8241–8246 (2013).
561. Vlotides, G. *et al.* SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN- α -induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1007–1014 (2004).
562. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
563. Starr, R. & Hilton, D. J. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 1081–1085 (1998).
564. Tung, C.-W. & Ho, S.-Y. Computational identification of ubiquitylation sites from protein sequences. *BMC Bioinformatics* **9**, 310 (2008).
565. Shi, X. *et al.* The zinc-finger domain was essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein-1 α to inhibit the production of interferon- β . *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **33**, 328–334 (2013).

566. Han, M., Du, Y., Song, C. & Yoo, D. Degradation of CREB-binding protein and modulation of type I interferon induction by the zinc finger motif of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1 α subunit. *Virus Res.* **172**, 54–65 (2013).
567. Lin, R.-J., Chang, B.-L., Yu, H.-P., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.* **80**, 5908–5918 (2006).
568. Usacheva, A. *et al.* The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 22948–22953 (2001).
569. Severino, A. *et al.* RACK1 is a functional target of the E1A oncoprotein. *J. Cell. Physiol.* **199**, 134–139 (2004).
570. Baumann, M. *et al.* The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3891–3901 (2000).
571. Demirov, D., Gabriel, G., Schneider, C., Hohenberg, H. & Ludwig, S. Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. *Cell. Microbiol.* **14**, 774–789 (2012).
572. Gallina, A., Rossi, F. & Milanese, G. Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology* **283**, 7–18 (2001).
573. Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S. & Fujii, N. Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. *J. Virol.* **76**, 12676–12682 (2002).
574. Cassonnet, P. *et al.* Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat. Methods* **8**, 990–992 (2011).
575. Neveu, G. *et al.* Comparative analysis of virus-host interactomes with a mammalian high-throughput protein complementation assay based on *Gaussia princeps* luciferase. *Methods San Diego Calif* **58**, 349–359 (2012).
576. de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R. & Grubman, M. J. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol.* **80**, 1906–1914 (2006).
577. Bouquet, J., Cheval, J., Rogée, S., Pavio, N. & Eloit, M. Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission. *J. Virol.* **86**, 6238–6245 (2012).
578. Wang, W. *et al.* Convergent Transcription of Interferon-stimulated Genes by TNF- α and IFN- α Augments Antiviral Activity against HCV and HEV. *Sci. Rep.* **6**, 25482 (2016).
579. Gondois-Rey, F. *et al.* Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS One* **4**, e4319 (2009).
580. Florentin, J. *et al.* HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **120**, 4544–4551 (2012).
581. Stone, A. E. L. *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits interferon production by a human plasmacytoid dendritic cell line and dysregulates interferon regulatory factor-7 and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 protein expression. *PLoS One* **9**, e95627 (2014).
582. van der Molen, R. G. *et al.* Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatol. Baltim. Md* **40**, 738–746 (2004).

583. Xu, N., Yao, H.-P., Lv, G.-C. & Chen, Z. Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN- α from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **61**, 997–1004 (2012).
584. Vincent, I. E. *et al.* Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* **6**, e26315 (2011).
585. Xie, Q. *et al.* Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect.* **11**, 515–523 (2009).
586. Yamaguchi, M., Kitagawa, Y., Zhou, M., Itoh, M. & Gotoh, B. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. *FEBS Lett.* **588**, 28–34 (2014).
587. Smith, N., Vidalain, P.-O., Nisole, S. & Herbeuval, J.-P. An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. *Sci. Rep.* **6**, 29891 (2016).
588. Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R. & Zuckermann, F. A. Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **135**, 20–33 (2010).

ANNEXES

Liste des Annexes

Annexe 1 : Tableaux des oligonucléotides utilisés pour réaliser les clonages et pour les qPCR.

Annexe 2 : Liste des plasmides codant pour les protéines des voies de signalisation de l'IFN-I associés aux étiquettes Gluc1 et/ou Gluc2 à leur extrémité N-terminale utilisés pour les cribles en GPCA.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à l'écriture de revues. Les manuscrits de ces revues sont intégrés dans la suite des annexes.

Annexe 3 : Revue publiée dans la revue *Viruses*

Virginie Doceul, **Eugénie Bagdassarian**, Antonin Demange, Nicole Pavio (2016). **Zoonotic Hepatitis E : Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes**. *Viruses* 2016, 8, 270.

Annexe 4: Manuscrit soumis à *Veterinary Research*

Nicole Pavio, Virginie Doceul, **Eugénie Bagdassarian**, Reimar Johne. **Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human**.

Annexe 1 : oligonucléotides utilisés pour réaliser les clonages et pour les qPCR. Le premier tableau décrit les oligonucléotides utilisés pour les clonages. Le second tableau décrit les oligonucléotides utilisés pour la qPCR.

Gène	Oligonucléotide sens (5'→3')	Oligonucléotide antisens (5'→3')	Utilisation
ORF1 (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc ATGGAGGCCACCAGTTCATT	GgggacaactttgtacaagaaagttggTCAT TCCAACCTCTGTATGAT	Clonage Gateway des ORFs
MetPCP (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc ATGGAGGCCACCAGTTCATT	GgggacaactttgtacaagaaagttggTTAC AAACATACTGTTCTGGGACCGTTG	Clonage Gateway des ORFs
PCP (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc CAGTGCCGCCGCTGGCTCTCA	GgggacaactttgtacaagaaagttggTTAC AAACATACTGTTCTGGGACCGTTG	Clonage Gateway des ORFs
Y (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc CGCGCCGTCGTGACTTATGAG	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAG CACTGTGCATAAACTGTAG	Clonage Gateway des ORFs
X (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc GCCCGCACTCGCCGGCTCCTT	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAG CCGGCGCAAGCACGACCCAC	Clonage Gateway des ORFs
Met (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc ATGGAGGCCACCAGTTCATT	GgggacaactttgtacaagaaagttggTTA GATCCATGCACGAAGTATAG	Clonage Gateway des ORFs
MetY (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc ATGGAGGCCACCAGTTCATT	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAG CACTGTGCATAAACTGTAG	Clonage Gateway des ORFs
Y-PCP (HEV-3)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc CGCGCCGTCGTGACTTATGAG	GgggacaactttgtacaagaaagttggTTAC AAACATACTGTTCTGGGACCGTTG	Clonage Gateway des ORFs
ORF1-A (HEV-1)	ATGGAGGCCCATCAGTTTATCA AG	TAGCCGACTCCARACATGC	Clonage du HEV-1
ORF1-B (HEV-1)	CWGCCCTCCARCCGCTYTACC	GGCRCTAATCTGGCAAGACG	Clonage du HEV-1
ORF1-C (HEV-1)	CCAGCCATYGACTTTGAGC	AGGGGTTGGTTGGATGAA	Clonage du HEV-1
MetPCP (HEV-1)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc ATGgaggccatcagtttatcaag	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAA AGATTGTGGCGCTCCGGGC	Clonage Gateway des ORFs
PCP (HEV-1)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc CAGTGTAGGCGCTGGCTTTTCG	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAA AGATTGTGGCGCTCCGGGC	Clonage Gateway des ORFs
Y (HEV-1)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc CGCGTTGTGGTGACATATGAA	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAA CACTGGGCATAAACTCCA	Clonage Gateway des ORFs

X (HEV-1)	Ggggacaactttgtacaaaaaagttggc GCCCCGGCACCGCCGCCTGCTC	ggggacaactttgtacaagaaagttggTTAG CCGGTACAAGCCCCGGCCGACA	Clonage Gateway des ORFs
-----------	--	---	--------------------------------

Gène	Oligonucléotide sens (5'→3')	Oligonucléotide antisens (5'→3')	Utilisation
GAPDH	GGTCGGAGGTCAACGGATTTG	ACTCCACGACGTA CT CAGCG	PCRq
IFN-α	GTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC	TTCATGATTTCTGCTCTGACAA	PCRq
IFN-β	TGCATTACCTGAAGGCCAAG	AAGCAATTGTCCAGTCCCA	PCRq
ISG56	GGACAGGAAGCTGAAGGAG	AGTGGGTGTTTCCTGCAA	PCRq
ISG15	CACCGTGTCATGAATCTGC	CTTTATTTCCGGCCCTTGAT	PCRq
OAS1	CATCCGCCTAGTCAAGCACTG	CACCACCAAGTTTCCTGTAG	PCRq
MDA5	ACACGTTCTTTGCGATTTCC	ACCAAATACAGGAGCCATGC	PCRq
MxA	CTACACACCGTGACGGATATG	CGAGCTGGATTGGAAAGCCC	PCRq
ORF2-3 HEV	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	AGGGGTTGGTTGGATGAA	PCRq

Annexe 2. Liste des plasmides codant pour les protéines des voies de signalisation de l'IFN- α associées aux étiquettes Gluc1 et/ou Gluc2 à leur extrémité N-terminale utilisés pour les cribles en GPCA.

Voie de signalisation	Protéine	Gluc1	Gluc2
Voie JAK-STAT	IFNAR1	x	x
	IFNAR2	x	
	JAK1	x	x
	TYK2	x	
	STAT1	x	x
	STAT2	x	x
	STAT3		x
	IRF9	x	
Voie RLR	RIG-I	x	x
	MDA5	x	x
	TRAF3	x	x
	TRAF6		x
	NEMO	x	x
	TBK1	x	x
	IKK-ϵ	x	x
	NAP-1	x	
	TANK		x
	IRF3		x

Review

Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes

Virginie Doceul^{1,2,3}, Eugénie Bagdassarian^{1,2,3}, Antonin Demange^{1,2,3} and Nicole Pavio^{1,2,3,*}

- ¹ French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Animal Health Laboratory, UMR (joint research unit) 1161 Virology, 94701 Maisons-Alfort, France; virginie.doceul@vet-alfort.fr (V.D.); eugenie.bagdassarian@vet-alfort.fr (E.B.); antonin.demange@vet-alfort.fr (A.D.)
 - ² French National Institute for Agricultural Research (INRA), UMR (joint research unit) 1161 Virology, 94700 Maisons-Alfort, France
 - ³ Association of Universities and High Education Institutions (ComUE), Paris-Est Créteil Val-de-Marne University, National Veterinary School, UMR (joint research unit) 1161 Virology, 94700 Maisons-Alfort, France
- * Correspondence: nicole.pavio@anses.fr; Tel.: +33-1-439-67209

Academic Editor: Jacques Izopet

Received: 22 July 2016; Accepted: 22 September 2016; Published: 3 October 2016

Abstract: During the past ten years, several new hepatitis E viruses (HEVs) have been identified in various animal species. In parallel, the number of reports of autochthonous hepatitis E in Western countries has increased as well, raising the question of what role these possible animal reservoirs play in human infections. The aim of this review is to present the recent discoveries of animal HEVs and their classification within the Hepeviridae family, their zoonotic and species barrier crossing potential, and possible use as models to study hepatitis E pathogenesis. Lastly, this review describes the transmission pathways identified from animal sources.

Keywords: hepatitis E virus (HEV); animals; zoonotic reservoir; foodborne transmission

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a single stranded, positive RNA virus belonging to the Hepeviridae family. Its genome codes for three open reading frames (ORFs) and is 7.2 kb in length. HEV is the leading cause of enterically transmitted hepatitis worldwide. HEV infection can cause an acute hepatitis that is self-limited. However, fulminant hepatic failure can occur in patients with underlying chronic liver disease, in the elderly, and in pregnant women. Complications and extra-hepatic manifestations of hepatitis E, such as acute pancreatitis, renal failure and neurological syndromes including Guillain-Barré syndrome, neuralgic amyotrophy or encephalitis, can also occur [1]. In addition, patients with underlying liver disease and/or immune-deficiencies can develop chronic hepatitis E, exacerbation of liver diseases and cirrhosis, leading to liver transplantation [2,3].

The existence of HEV was postulated for the first time during an outbreak of hepatitis in Kashmir Valley in 1978 [4]. HEV, named at that time “enterically transmitted non-A and non-B hepatitis”, was subsequently identified after a human volunteer was infected experimentally with a pooled faecal extract from affected military personnel [5]. This volunteer later developed acute hepatitis and spherical 27- to 30-nm virus-like particles (VLPs) were visualised in his stool by immune electron microscopy (IEM). In the early 1990s, the HEV genome was cloned and sequenced using samples obtained from experimentally infected macaques [6,7].

Since the end of the 1990s, additional HEV-related agents have been identified in a large variety of animals ranging from domestic swine, wild boar, deer, rabbit, mongoose, ferret, rat and chicken to bat and cutthroat trout. Following the identification of these novel strains, a new classification has been

proposed that divides the Hepeviridae family into two genera: *Orthohepevirus* and *Piscihepevirus* [8]. Most of the HEV strains identified so far belong to the *Orthohepevirus* genus that is divided into four species: *Orthohepevirus A*, *B*, *C* and *D* (Figure 1). Four main genotypes of HEV that belong to the *Orthohepevirus A* species are able to infect humans (HEV-1 to -4). Genotypes 1 and 2 (HEV-1 and HEV-2) infect only humans and are associated with large waterborne epidemics in tropical and subtropical areas. Genotypes 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4) are present in humans and other animals, and are the main cause of autochthonous cases of hepatitis E in industrialized countries.

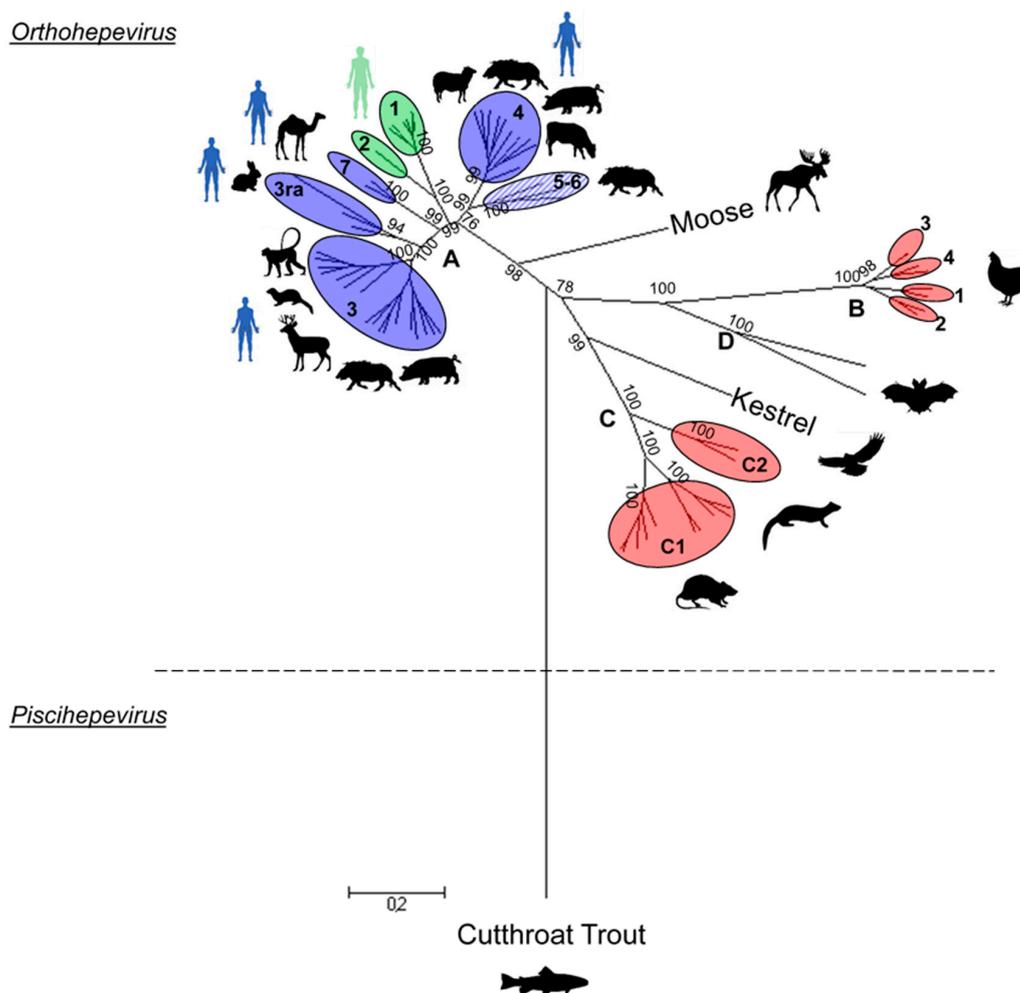


Figure 1. Phylogenetic tree of representative members of the Hepeviridae family. The tree was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Tamura–Nei model. The analysis was performed with 67 hepatitis E virus (HEV) complete genomes or complete coding sequences available in the GenBank database and representative of each genotype. The sequence size varies between 6543 and 7318 nt in length, and they were aligned using Clustal W. The bootstraps were obtained from 1000 replicates and values over 70% are indicated at the genotype level. The initial tree was obtained by applying the Neighbour-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach. The tree is drawn to scale, with branch lengths proportional to the number of substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Version 6.0). The *Orthohepevirus* species taxon name is added at the junction of the last common ancestor for each species. Genotypes of non-zoonotic HEV species (red), genotypes including HEV strains isolated from animals and human (blue), genotypes infecting human only (green) and genotypes infecting wild boar that are not linked to human infections (striped blue) are shown.

The first HEV-related agent identified in an animal was swine HEV. HEV RNA and HEV-specific antibodies were first detected in domestic swine in Nepal in 1995 [9]. Two years later, a swine strain of HEV was identified in pig herds from the United States (US) and characterised genetically [10]. Pigs inoculated intravenously with swine HEV developed viremia prior to seroconversion, had histological evidence of hepatitis, but did not display clinical symptoms [11]. Swine is the major reservoir of zoonotic HEV-3 and HEV-4 worldwide and is highly prevalent in pig herds. Indeed, anti-HEV antibodies were detected in 46%–100% of swine farms from many countries [12–14]. HEV-3 and HEV-4 are also able to infect wild boars, which represent, along with domestic pigs, a major reservoir of zoonotic HEV [12,13]. HEV-3 strains have also been detected in different species of deer and in the Japanese mongoose [15–17]. In addition, rabbit HEV-3 strains have been identified in farmed rabbits in China [18] and the US [19], in farmed and wild rabbits in France [20] and also in a pet house rabbit [21]. In the *Orthohepevirus A* species, two other strains of HEV, classified as genotype 5 and 6 (HEV-5 and HEV-6), have also been identified in wild boar in Japan [8,22] and more recently, HEV-7 has been detected in faecal samples from camels [23]. An HEV strain has been characterised in Swedish moose [24] but it is still not assigned to any HEV species.

Additional animal species infected with HEV have also been described. However, the HEV strains detected in these animals are genetically more distant from human HEV strains and are classified as different *Orthohepevirus* species. Avian HEV (*Orthohepevirus B*) was first described in the United States, and is associated with hepatitis-splenomegaly (HS) syndrome in chickens [25], also called big liver and spleen disease [26]. Avian HEV is enzootic in chicken flocks in the US with a seroprevalence of 71% [27]. A rat strain of HEV has been identified in rats [28], with a seroprevalence rate varying from 13% to 90% in many countries [13]. Other HEV variants have been identified in ferrets in the Netherlands [29] and in mink in Denmark [30] (*Orthohepevirus C*). Partial sequences with the highest homology to rat HEV have also been detected in foxes [31]. Another species of HEV was identified in different bats from Central America, Africa and Europe (*Orthohepevirus D*) [32]. Very recently, a HEV strain that might represent a novel *Orthohepevirus* species has been found and characterized in kestrels and falcons in Europe [33]. Finally, a more distant strain of HEV has been discovered in the cutthroat trout in the US and assigned to the *Piscihepevirus* genus [34].

Anti-HEV antibodies have also been detected in different animal species including goats, sheep, buffalo, work horses, cats and dogs. This suggests that these animal species have been exposed to HEV or a closely related agent. However, no HEV RNA has been identified formally in these animals yet. The design of molecular tools used to detect HEV RNA is based on known HEV sequences and might not be able to detect distantly related variants. It is then likely that other animal strains of HEV exist.

In the past 20 years, new molecular tools and the use of metagenomics have highlighted the diversity of HEV strains and susceptible hosts existing. These discoveries have greatly contributed to a better phylogenetic analysis and classification of the Hepeviridae family. In parallel, animal models of HEV infection have been developed and used to study cross-species transmission of the virus and routes of transmission of zoonotic HEV have been identified. This article reviews these recent advances that have contributed to a better understanding of the origins and transmission of zoonotic hepatitis E.

2. HEV Phylogeny

To date, 240 complete genomes are available in Genbank (NCBI database), compared to 49 complete genomes available in 2006, with more than 120 sequences of HEV-3. The use of full-length sequences has improved the phylogeny and classification of HEV, but trees generated previously, using shorter sequences from selected genomic regions (partial-ORF1 or partial-ORF2), show similar structures than those generated with full genomes [35].

Within genotypes, a high diversity can be observed requiring further classification into subtypes or clade/group and subclade/subgroup (genotype 3, Figure 2) [35–37]. Thus, a methodology was recently proposed to standardise HEV subtyping. Using this method, subtypes can be redefined when novel full-sequences are added (Figure 2) [38].

2.1. *Piscihepevirus* Genus

The *Piscihepevirus* genus (Figure 1) is composed of one species, *Piscihepevirus A*, and one member, the cutthroat trout virus (CTV) [34] that infects the salmonid fish. CTV is the genetically most distant virus within the Hepeviridae family. It shares 41% to 46% nucleotides (nt) identity and 13% to 26% amino acid (aa) identity with the *Orthohepevirus* genus [8,34].

2.2. *Orthohepevirus* Genus

2.2.1. *Orthohepevirus A*

The *Orthohepevirus A* is the best-characterized species sharing 52.44% to 59.11% nt identity with the other *Orthohepevirus* species, excluding the moose strain (64.5%).

Genotypes 1 and 2

These two human genotypes are genetically close with almost 76% nt identity. HEV-1 is well described and divided into six subtypes (1a to 1f) while HEV-2 is less documented and divided into 2 subtypes (2a and 2b) (Figure 1) [38]. Strains belonging to genotype 1 share 88.53% to 94.05% nt identity and are found mainly in Asia, Africa and Mexico [40]. Genotype 2 strains were isolated in Central America (Mexico) and Africa (Tchad, Nigeria) [39,41–43].

Genotype 3

HEV-3 is the best described and documented genotype in Genbank. Most sequences originate from humans, pigs and wild boars (Figure 2). HEV-3 is divided into 10 subtypes (a to j) and two clades (3abchij and 3efg) [35,36,38,44,45] (Figure 2), sharing 78.74% to 82.46% nt identity. HEV-3 includes some unassigned strains [38] and rabbit HEV for which genotyping it is still under consideration.

Evolutionary studies suggest that the most recent common ancestor for genotype 3 appeared in early 19th century [46] or even in the late 18th century, considering HEV-like outbreak descriptions [47]. Phylogenetic trees are constructed with recent HEV strains using Bayesian approaches to estimate HEV evolution [46]; there are potentially recent bottlenecks through which the various genotypes have passed. A wider sampling of HEV genotypes may show that the present estimates are underestimates of the true evolutionary history of HEV.

1. **Clade 3abchij:** Within this first clade, HEV strains can be separated into two subclades, 3abj and 3chi, sharing 81.16% to 85.33% nt identity (Figure 2) [35]. HEV strains that cluster in the 3chi subclade share 84.7% to 96.46% nt identity and originate from Europe (France and Germany) and Mongolia. HEV strains within the 3abj subclade share more than 83.75% nt identity. They were isolated in Asia, Europe and North America and are predominantly circulating in Asia and North America. Complete genomes of subtype 3a are from North America and evolutionary studies suggest that it came from Asia and diverged from subtype 3b to subtype 3a in the early 1920s [37,40]. In the subtype 3b, nearly 90% of the full genomes are from Japan, sharing more than 95% nt identity [35,37] (Figure 2). Studies on the origin of HEV in Japan suggest that HEV-3 was imported from Europe in the early 20th century and then diverged into the 3b subtype [37,40]. The subtype 3j was isolated from a pool of pig faecal samples in North America [48], thus, full genome sequences from single animals must be added to validate this subtype [35].
2. **Clade 3efg:** This clade includes the three subtypes e, f and g, sharing 82.75%–90.57% nt identity, and 3 non-assigned subtypes. Subtypes 3e and 3f are mainly found in Asia and Europe [49,50]. Evolutionary studies have hypothesised that these HEV strains have emerged in Europe around 1871 [37]. There is only one complete sequence for the subtype 3g from Kirgizstan, which is the most divergent virus of this clade (Figure 2). The classification of the subtype 3d is based on one partial ORF2 sequence from Taiwan, it shares 86.18% and 84.87% nt identity with the subtypes 3g and 3h, respectively. Subtype 3d does not belong to any clade so far.

3. **Subtype 3ra (rabbit):** These strains share 73% to 80% nt identity with other HEV-3 subtypes and form a distinct clade within genotype 3 (Figure 2). This divergence is mainly due to numerous substitutions and insertions in the rabbit HEV genome compared to the other *Orthohepevirus A* HEV strains [8,51]. As rabbit strains better cluster with other genotype 3 strains, they are provisionally assigned as subtype 3ra [8,38] and divided into 2 subclades [38]. This subtype includes a strain isolated from a human case of hepatitis E in France that shares 80.12% to 86.14% nt identity with the other rabbit strains [51].

Genotype 4

HEV-4 is mainly found in Asian countries and share between 71.79% and 77.38% nt identity with other genotypes (Figure 1). It is divided into nine subtypes (a–i) mainly isolated from pig, wild boar and human. HEV-4 was also detected in other animals such as sheep, cow and goat in China [52,53]. Nevertheless, more investigations are necessary to determine if these species are reservoirs of HEV-4 or accidental hosts.

Genotypes 5 and 6

Genotypes 5 and 6 were amplified from wild boars only. They are assigned as subtypes 5a and 6a (Figure 1), sharing more than 78% nt identity amongst themselves and 71.58%–77.38% nt identity with other genotypes. Up to now, there is no human infection associated with these genotypes.

Genotype 7

Three complete or partial sequences assigned to genotype 7 have been described. Two of them were isolated from camel (Figure 1) [23]. The third one originates from a human transplant patient and is lacking most of the ORF3 region [54]. These strains are close to each other (>86% nt identity) and share 72.55%–76.13% nt identity with other genotypes.

2.2.2. *Orthohepevirus B*

Orthohepevirus B strains were amplified from chicken and represent the shortest HEV genome (6.65 kb). This HEV species shares 51.47%–55.05% nt identity with other *Orthohepevirus* species. To date, there are four different genotypes described from different countries worldwide [55–57] (Figure 1) and sharing a low divergence (<6%) [8].

2.2.3. *Orthohepevirus C*

The *Orthohepevirus C* species shares 51.68%–60.57% nt identity with other *Orthohepevirus* species. Two different genotypes can be distinguished: C1 and C2. Genotype C1 includes strains isolated from rat (Figure 1). However, some variants with incomplete sequences, isolated from bandicoot and Asian musk shrew, cluster also in this genotype [58,59]. The phylogeny analysis of the full genomes available shows three different clusters within this genotype that may constitute three possible subtypes (Figure 1).

Genotype C2 is composed of HEV variants isolated from ferret and mink [8,30] (Figure 1). Only two full sequences of ferret are available sharing 81.9% nt identity.

2.2.4. *Orthohepevirus D*

The *Orthohepevirus D* species includes only bat HEV. To date, three full genomes are available and constitute the shortest mammalian HEV genome (6.8 kb) [32]. This HEV species shares between 52.8% and 56.06% nt identity with other *Orthohepevirus* species (Figure 1). A phylogeny analysis with partial sequences isolated from many different countries has shown a high diversity within the *Orthohepevirus D* species, suggesting that several genotypes can be distinguished [32].

2.2.5. Unassigned Orthohepeviruses

Swedish Moose

HEV strains were recently isolated from Swedish moose [60] (Figure 1). Only one partial genome with complete ORFs is available. A phylogenetic analysis with partial sequences has shown high similarities between different moose strains from the same geographic region (>91% nt identity) [24]. They form a distinct group within the *Orthohepevirus* genus and are close to the *Orthohepevirus A* species (63% nt identity).

Kestrel (*Falconidae*)

Very recently, a full HEV genome was retrieved from Kestrel [33]. This HEV strain is similar to the other HEV strains in terms of genome length and organization with 51.47%–60.57% nt identity with others *Orthohepevirus* species (Figure 1). This cluster could constitute a new *Orthohepevirus* species, close to the *Orthohepevirus C* species (58.65%–60.57% nt identity). Partial sequences show a low diversity (>87% nt and 99% aa identities) but broader investigations are necessary to better characterize it.

Zoonotic strains of the *Orthohepevirus A* species are more frequently studied and better classified than non-zoonotic HEV. Additional HEV complete sequences from ferret, bat, moose or Cutthroat trout, from various origins (geographic, related host), would improve the classification [24,36,61].

3. Animal models of HEV

3.1. Non-Human Primates (Historical Model)

A number of non-human primate species has shown susceptibility to HEV infection, including chimpanzee, rhesus monkeys, African green monkeys, owl monkey, Tamarin and squirrel monkeys [62]. Natural infection and transmission of HEV-3 has been described in a monkey facility in Japan [63]. In addition, cynomolgus and rhesus macaques can be infected experimentally with HEV-1 to HEV-4 [64–67] and have served as the primary model of HEV infection [62,68]. Experimental infection of a cynomolgus macaque with a suspension of stool from human patients led to the excretion of VLPs [5,69,70] and the development of hepatitis, characterised by liver enzyme elevations, viremia and seroconversion [69–73]. Moreover, the course of infection in experimentally-infected primates is similar to the one in humans with variable incubation periods. An important application of non-human primate studies was to evaluate the efficacy of potential HEV vaccines [74,75]. Non-human primates were also used to evaluate the zoonotic potential of different HEV strains. It was shown that rhesus monkeys and a chimpanzee, experimentally inoculated with swine HEV-3, developed hepatitis [76]. Inoculation of rhesus monkeys with swine HEV-4 also led to seroconversion and viremia but no significant increase in the serum level of alanine aminotransferase (ALT) was observed [77]. The infection of two cynomolgus macaques with rabbit HEV led to the development of a typical hepatitis, suggesting that rabbits may be a source of human HEV infection [78]. However, attempts of cross-species transmission of avian, rat or ferret HEV to non-human primates under experimental condition were unsuccessful [55,79]. Due to limited resources, ethical concerns, and difficult and expensive experimental procedures, little has been learned about the pathogenesis of HEV using primate models.

The discovery of HEV strains in different animal species has then led to the development of other naturally occurring animal models.

3.2. Swine

Swine HEV was identified in 1997 and was shown to be antigenically and genetically related to human HEV [10]. Swine is a natural host of HEV-3 and -4 and specific pathogen free (SPF) pigs have been successfully infected intravenously with samples recovered from patients suffering from hepatitis

E infection (HEV-3 and -4) [11,76,80,81]. Infected pigs presented mild gross and microscopic liver lesions, viremia, seroconverted and excreted viable HEV in the faeces. Evidences of extrahepatic sites of HEV replication have also been demonstrated in pigs inoculated intravenously [82,83]. Cross-species transmission experiments were performed using the swine model. SPF pigs were successfully infected with two different rabbit strains of HEV, but not with rat HEV [84]. More recently, transmission of HEV from infected wild boar to wild boar and domestic pigs by contact between the animals was demonstrated [85,86]. However, pigs are resistant to experimental infection with HEV-1 and -2 [81] and swine HEV causes only subclinical infection. There is no evidence of clinical disease or elevation of the liver enzyme ALT in this model, thus limiting its usefulness in pathogenicity studies. Nevertheless, this naturally occurring swine model remains very useful for the study of HEV replication and cross-species infection.

3.3. Chickens

A chicken model of HEV infection has been developed that presents some advantages: first, like swine HEV, avian HEV is genetically and antigenically related to human HEV [26]. The genomic organisation is very similar to mammalian HEVs. Moreover, avian HEV can be associated with a hepatic disease (HS syndrome). However, in the field, cases of avian HEV infection are mainly subclinical and the pathogenicity linked to avian HEV does not seem to be strain-dependent [87]. SPF chickens can be readily infected by the natural faecal oral route [88] and mild gross pathological lesions and microscopic liver lesions characteristics of HS syndrome have been observed, making it a homologous animal model system to study HEV pathogenesis and replication. Extrahepatic sites of HEV replication were also identified [89]. Cross-species transmission of chicken HEV to turkeys was demonstrated [90]. Infectious cDNA clones of avian HEV were also constructed and capped RNA transcript were used to infect SPF chickens [91–94], allowing to study *in vivo* the role of particular regions of the HEV genome in viral replication and pathogenesis.

3.4. Rabbits

Infection of SPF rabbits with rabbit HEV induces virus shedding in faeces, viremia and the development of hepatitis, characterised by histopathological changes and an increase in the level of ALT in the serum [95–97]. In addition, chronic hepatitis, characterised by liver inflammation and some degree of fibrosis, was observed in rabbits experimentally infected with rabbit HEV [95]. HEV antigen and RNA were found in extrahepatic tissues in infected rabbits [98] and high mortality and vertical transmission of HEV in pregnant rabbits was demonstrated [99]. However, similarly to the swine model, rabbit HEV induces only a subclinical infection with little or no sign of disease. The rabbit model may be useful to study HEV infection and pathogenesis caused by the rabbit strain of HEV and for vaccine evaluation [95]. Experimental infection of rabbits with human HEV genotype 1 or 4 led to the development of hepatitis in none of the rabbits inoculated with HEV-1 and in seven out of nine rabbits inoculated with HEV-4 although most of the inoculated rabbits seroconverted [97]. Rabbits were successfully infected with swine HEV-4 [61] and SPF rabbits farmed in the same enclosed space as HEV-infected pigs seroconverted [100].

3.5. Rats

Rodents have been widely used as animal models in scientific and medical research into parasitic, bacterial and viral diseases. Indeed, rodents are easy to handle, manipulate, house and can be used in great numbers. Infection of Wistar rats (via the intravenous or faecal–oral route) with HEV derived from wild rats, can lead to seroconversion and excretion of rat HEV in stool [101]. However, no change in weight and liver enzyme level was observed. The inoculation of Wistar rats with a human stool suspension known to contain HEV-1, led to a successful infection characterised by virus shedding in the faeces, viremia and histopathological changes in the liver, spleen and lymph nodes [102]. However, in two other reports, the injection of HEV-1, -2, -3 (swine) and -4 (wild boar) failed to induce an efficient

infection in Sprague-Dawley or Wistar rats [101,103]. Rats were also inoculated with different RNA transcripts from infectious cDNA clones of rat HEV [104], HEV-4 [105] and swine HEV-3 [106] leading to successful infections. Moreover, attempts to infect Wistar and nude rats with ferret HEV failed [78]. The utility of rats as a model of HEV infection still remains to be demonstrated.

3.6. Ferrets

Very recently, two ferrets were inoculated orally with ferret HEV [107], leading to a successful infection characterised by the detection of viral RNA in the stool and the sera, seroconversion and a significant elevation of the liver enzyme ALT. These findings indicate that ferret HEV infection can induce liver damage and ultimately acute hepatitis in ferrets. This suggests that ferrets can be used as a potential animal model to study HEV infection. However, strains naturally infecting this species are close to rat HEV and distant from viruses infecting humans and their use might not be adapted to test antivirals or vaccines.

The limited availability, difficulties in handling, manipulating, housing and the cost of both primates and swine severely restrict their use in large number in research. Moreover, naturally occurring small animal models have shown limits in their use to understand HEV pathogenesis and transmission using human strains. Efforts have then been made to develop alternative small animal models that are not natural hosts of HEV.

3.7. Mongolian Gerbils

Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is a common experimental gerbil species that was also suggested as an alternative animal model to study HEV replication and pathogenesis. Indeed, Mongolian gerbils have been successfully infected via the intraperitoneal route with a HEV-4 strain recovered from a swine liver sample [108,109]. In addition to viremia and faecal virus shedding, the virus was detected in the liver, kidney and spleen as well as the small intestine. Moreover, characteristic histopathological changes observed in the liver of infected gerbils were similar to those reported in humans, and the liver enzymes ALT, aspartate transaminase (AST) and bilirubin levels in the sera were significantly increased. Finally, HEV RNA was detected in the liver from seven to 42 days post infection, which is consistent with the last days of HEV RNA detection in the swine model [110], suggesting that HEV RNA replication in the Mongolian gerbil is similar to its replication in the swine model. Using this model, a study has also shown that swine HEV-4 is able to cross the blood–brain barrier and replicate in the brain and the spinal cord after experimental infection [111]. Mongolian gerbils could then be useful to study the neurological disorders associated with HEV infection. In addition, a successful infection of Mongolian gerbils with a human HEV-1 strain isolated from an acute hepatitis E patient has been obtained [112]. HEV RNA was detected in the faeces of the infected gerbils and histopathological changes in the liver, spleen and kidney were reported as well as fatigue and hair loss. Mongolian gerbils seem to be a promising model to study HEV-1 and -4 infection and pathogenesis.

3.8. Human Liver Chimeric Mice

Mouse is a small animal model that is used as a model for many viral infections. The first attempt to infect C57BL/6 mice with HEV-1, HEV-3 and HEV-4 strains failed [113]. In another study, balb/c nude mice were inoculated with swine HEV-4 and HEV antigens were detected in the liver as well as in different extrahepatic organs. Moreover, histopathological changes in the liver and the spleen and increased levels of liver enzymes were observed [114]. However, as reported for pigs, the inoculated mice showed no clinical signs of HEV infection. Very recently, human liver chimeric mice were developed [115]. The liver of UPA/SCID mice was repopulated with primary human hepatocytes and the animals were inoculated with stool-derived virions from humans infected with HEV-1 or -3. Viremia and faecal excretion were reported. Moreover, the co-housing of an HEV-infected mouse with three naïve humanized mice led to successful HEV infection, demonstrating that HEV infection can be transmitted through the faecal oral route in humanized mice, direct physical contact or

micro-injuries [115]. HEV-inoculated human liver chimeric mice were also shown to develop chronic HEV infection [116,117] and the treatment of HEV-infected humanised mice with ribavirin led to a statistically significant decrease in the level of HEV RNA in the serum and the faeces and in no more liver damage [115,116]. The human liver chimeric mouse model seems then to be a valuable tool to study the biology of chronic HEV infection and evaluate preclinical drugs. However, this model does not allow immunopathogenesis studies involving adaptive immune responses. Further refinements, such as the transfer of immune cells, may in part overcome these limitations in the future.

Much effort has then been made recently to develop small animal models to study HEV pathogenesis and inter-species transmission. Mongolian gerbils seem to be a promising model that is easy to handle, cost-effective and can mimic hepatic diseases. However, more studies need to be performed to determine whether this species is susceptible to other genotypes of HEV such as HEV-3 and HEV-7. It is also not clear whether gerbils can be infected via the faecal–oral route and whether transmission studies can be performed in this model. Naturally occurring models such as ferrets could also represent a good alternative. Nevertheless, their susceptibility to human and other HEV strains from the *Orthohepevirus A* species remains to be determined. The identification of new strains and hosts of HEV might help in the near future to the development of a suitable naturally occurring animal model.

4. Inter-Species Transmission of HEV

As described above, animal models and HEV natural reservoirs have been used to study experimentally the interspecies transmission of different HEV species and genotypes. The results obtained from these different studies are summarised in Figure 3. They clearly show that HEV-1 and HEV-2 are restricted to humans whereas HEV-3 and HEV-4 are naturally present in several animal species and can cross the species barrier. This difference raises the question of species barrier determinants. Several studies have suggested that genetic elements present in HEV ORF1 are involved in species barrier crossing [118–121].

In addition, the zoonotic transmission of HEV-3 and HEV-4 from swine, wild boar and deer to human via the consumption of contaminated meat has been proven. Molecular and phylogenetic analyses of HEV-3 and HEV-4 sequences from human and pig origin have shown high identity between the two populations and the absence of species clustering [49]. This suggests that swine HEV-3 and HEV-4 may not require any adaptation to jump between these two species. A study showing that the consensus sequence of HEV-3 is identical during transmission from human to swine is in agreement with this hypothesis [122]. However, it is still unclear whether strains of HEV-3 and HEV-4 present in other animals can cross the species barrier and infect humans. For example, the ability of rabbit HEV to infect humans and its contribution to zoonotic hepatitis E infection remain to be determined. The successful infection of cynomolgus macaques with rabbit HEV suggests that inter-species transmission of rabbit HEV-3 to human is possible [78]. The identification of a human strain that is closely related to rabbit strains is also in agreement with this hypothesis [51]. Further studies are also needed to determine the risk of zoonotic transmission of other strains from the *Orthohepevirus A* species such as wild boar HEV-5 and HEV-6. In addition, the recent identification of a human case associated with HEV-7 strongly suggests that this genotype is transmissible from camels to humans [54]. However, the contribution of HEV-7 to zoonotic hepatitis E remains to be clarified. Since zoonotic genotypes such as HEV-3 and HEV-4 can infect multiple animal species, it is also important to determine experimentally whether HEV-7 can infect other species such as rabbit and swine. This will help to clarify whether second or new reservoirs of this potential zoonotic genotype might exist or appear through direct transmission from camels or through human intervention.

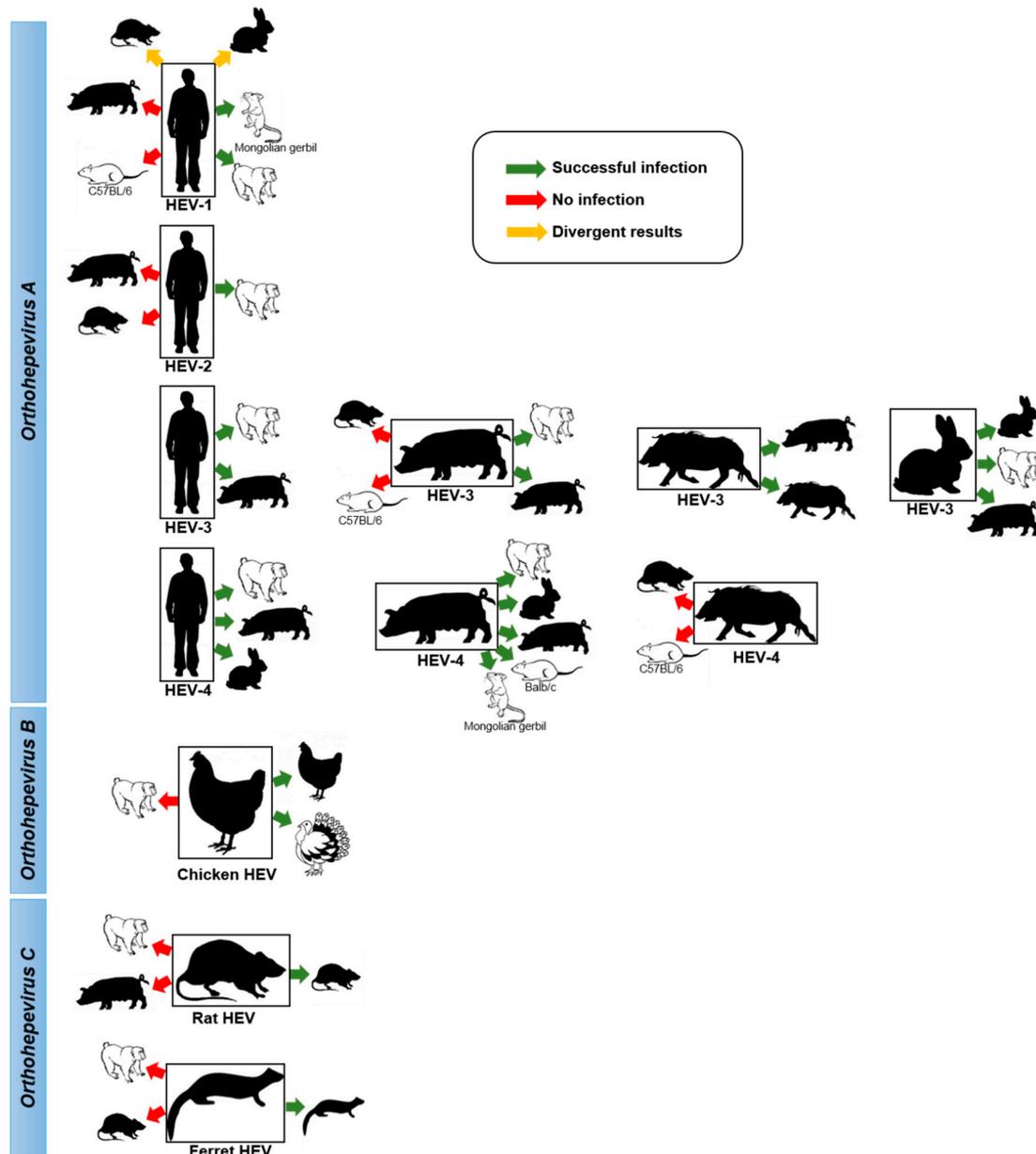


Figure 3. Experimental inter-species transmissions of HEV. Inter-species transmission of different HEV strains determined by the experimental infection of animal reservoirs (black silhouette) or animal models (white silhouette). Details and references of the different experiments presented are given in the text.

5. Transmission Pathways of Zoonotic HEV

Since the discovery of swine HEV in 1997 [10], the risk of zoonotic transmission of HEV has been questioned and concern for public health has been raised. The first direct evidence of zoonotic transmission of HEV to humans was provided six years later following cases of HEV infection among patients who had consumed sashimi of Sika deer [123]. HEV-3 RNA was retrieved from the left-over deer meat and its sequence was found to be identical to those from the patients (326 nt within HEV ORF1). Three case reports have then provided additional direct evidence that HEV is a zoonosis that can be transmitted via the consumption of contaminated food. In these studies, identical or near identical HEV sequences were detected in patients suffering from hepatitis E and animal products they had consumed: grilled wild boar meat in Japan [124], pig meat in Spain [125] and ficatellu sausage

from Corsica [126]. Several reports in Japan, France, Spain and Australia have also linked sporadic cases or outbreaks of hepatitis E with the consumption of raw or undercooked pork or wild boar products (meat, liver, liver paté, ficatellu or liver-based stuffing) without direct proof that these food items were the source of the infection [126–133]. These data are supported by studies showing that the consumption of pork and wild-boar meat and processed products is a risk factor for autochthonous HEV infection and HEV seropositivity [129,134–138]. In one of these studies, consumption of offal and wild-boar meat was found to be associated with autochthonous HEV infection in Germany [134]. Eating pork meat, pork liver sausages, game meat and offal was also found as a major contributor to the presence of anti-HEV antibodies in a recent nationwide survey performed in France [135].

HEV-3 and HEV-4 RNA is present throughout the pork food chain worldwide [130,133,139–143]. Studies have reported that 3%–11% of pig liver samples at the slaughterhouse are HEV positive in France (4%) [144], the Netherlands (6.5%) [145], Czech Republic (5%) [141], Italy (6%) [140], Spain (3%) [140], the United Kingdom (3%) [146], Japan (5%) [147] and the US (11%) [148]. HEV RNA was also found in the liver of wild boars (5.8%), deer (3.2%) and wild rabbits (5%) hunted in southwestern France [149] and in the liver of wild boars (1.9%) hunted in north-western Italy [150]. HEV RNA has also been detected in pork sausages sold in the UK (10%) [146] and in Spain (6%) [140]; in ficatelli (30%), dried salted liver (3%), quenelle and quenelle paste (25%) and dried or fresh liver sausages (29%) sold in France [139]; in raw and dry liver sausages purchased in Italy [141], in raw sausages (20%) and liver sausages (22%) sold in Germany [142]; and in pork paté and blood sausage (36%) sold in Brazil [151].

Several studies have shown that such commercially-available pork livers and pork-derived products containing raw liver can contain infectious virus and are potential sources of foodborne HEV. Pigs inoculated intravenously with homogenates from contaminated pig livers sold in grocery stores in the United States became infected with HEV [148]. Moreover, HEV was successfully cultured in human cell lines inoculated with extracts from ficatelli sausages produced in France [152] or raw porcine liver purchased from grocery stores in Japan [153].

Recently, a liver-transplant patient from the Middle East who regularly consumed camel meat and milk was found to be infected with camelid HEV-7 [54]. Other animal reservoirs and genotypes of HEV might then be involved in the foodborne transmission of HEV. Milk from HEV-infected animals could also represent another source of zoonotic HEV that need to be further investigated.

Other foods that are not derived from animal products can be contaminated with HEV and are possible sources of foodborne HEV transmission. For instance, HEV-3 or HEV-4 RNA has been found in mussels from Galicia (14.81%) [154] and Scotland (85%) [155]; in oysters from coastal regions in Korea (8.7%) [156]; in bivalves from Japanese rivers [157]; and in shellfish from the coastal waters of China [158]. Moreover, experimental bioaccumulation has shown that oysters, flat oysters, mussels and clams can concentrate HEV, mostly in their digestive tissues [159]. Transmission of zoonotic HEV to human via the consumption of seafood has not been proven directly yet as no identical or near identical HEV sequences have been retrieved in patients suffering from hepatitis E and the seafood they had consumed. However, the consumption of shellfish has been strongly linked to an imported case of HEV-4 infection in a Japanese patient who travelled to Vietnam [160] and to an outbreak of hepatitis E on a cruise ship (HEV-3) [161].

In addition, HEV RNA has been found in strawberries in Canada [162], in frozen raspberries sold in Europe [163] and in the salad vegetable supply chain in Europe [164], suggesting that soft fruits and vegetables can also be contaminated with HEV RNA. A study has also suggested that herbs and spices can be contaminated with HEV (0.9%) [165].

The presence of HEV in shellfish, vegetable and fruits is likely caused by the contamination of surface and irrigation water with animal sewage. HEV RNA has been detected in swine sewage and manure worldwide [133,166–169] and it was shown that such waste products can be infectious when inoculated experimentally to pigs [169]. Runoff or insufficient treatment of sewage water from pig farms and use of manure as soil fertiliser could then lead to the contamination of neighbouring surface

water. This hypothesis is supported by studies that found HEV RNA in surface water in proximity of pig farms [170,171]. HEV sequences similar to sequences found in patients with autochthonous hepatitis E infection and in swine have also been repeatedly found in river and seawater [172–174]. In addition, some of the shellfish found to be HEV RNA positive in Scotland were harvested near a slaughterhouse and pork processing plant [118].

The presence of HEV in food products derived from natural reservoirs of zoonotic HEV or food that are contaminated by surface and irrigation water raises concerns for public health and food safety worldwide. A subunit vaccine based on the expression of a truncated viral capsid is able to confer full protection after three doses and is licensed in China [175]. However, such vaccine has not yet been approved and commercialised in other countries. Prevention of zoonotic HEV relies mainly on avoiding raw and undercooked meat or seafood and cooking meat and meat products thoroughly. A few studies have been conducted using cell-culture [176,177] or in vivo swine experimental models [178,179] to determine the stability of HEV in the environment and in food products. Infectious viruses are still present in faecal suspension or cell-culture supernatant after heating at 56–60 °C [176,177]. Efficient inactivation of HEV in food products derived from infected pork liver was only achieved after a cooking time of at least 20 min at an internal temperature of 71 °C [178,179]. Temperatures equivalent to rare and medium-to-rare cooking are then insufficient to inactivate the virus and cooking food thoroughly and evenly is highly recommended to prevent foodborne transmission of HEV. Appropriate hygiene measures such as frequent hand and surface cleaning should also be followed when handling uncooked meat. In addition, swine waste should be properly eliminated and the use of swine manure as soil fertiliser should be regulated to reduce the risk of HEV contamination of crops and surface water.

As described above, HEV RNA has been detected in diverse food products ranging from meat and seafood, to fruits and vegetables. However, it is still unclear whether infectious virus can be present in most of these items. To solve this issue, a robust cell culture system needs to be developed rapidly. Such model will also help to clarify whether infectious viruses can be present in pork products that contain no liver such as cured ham. Indeed, the high HEV seroprevalence in human found in some countries such as France (22.4%) [135] cannot be explained only by the consumption of products containing raw pork liver such as ficatelli. Efforts are also needed to establish standardized methods to ensure a quality control of products at risk and the HEV oral-infectious dose remained to be determined to perform risk assessment studies.

In addition to foodborne routes of transmission, seroprevalence studies have suggested that direct contacts with infected animal reservoirs are risk factors for HEV exposure. Higher seroprevalence of anti-HEV antibodies was found in swine workers and veterinarians in the United States [180,181]; in swine veterinarians in France [137] and the Netherlands [145]; in swine farmers in Sweden [182], France [137] and Moldova [183]; and in pork butchers in Burkina Faso [184]. In addition, higher HEV seroprevalence was detected among French hunters [100] and among forestry workers in France [137,185] and Germany [186]. The presence of stools from infected wild animals in forest may represent a source of contamination for this population. Interestingly, simple prevention measures such as wearing gloves and wearing boots for pig farmers, forestry workers or hunters are associated with reduced risk of HEV exposure [137,187]. A cross-sectional survey conducted in China has also found a higher anti-HEV IgG seroprevalence in seafood processing workers who have direct contacts with raw seafood [188]. Direct contacts with contaminated food and water might then represent a risk of HEV infection.

Contact with pet pig might also represent a possible source of HEV infection. In one study, frequent contact with a pet pig was reported to be the most likely cause of contamination of a French patient with acute hepatitis E [189].

6. Conclusions

Many novel strains of HEV have been identified in the last decades in diverse animal species. These discoveries have led to the reviewing of the Hepeviridae family classification and the ratification by the ICTV of a new taxonomic structure [8]. Nevertheless, it is very likely that additional HEV variants exist and that this classification will further evolve in the future. Available diagnostic tools are based on identified HEV strains and are probably not able to detect all the existing HEV strains. It is essential then that new molecular techniques are designed rapidly to detect a larger diversity of HEV strains and hosts. The wider use of metagenomics and deep sequencing could also contribute to the identification of HEV variants. Swine have been studied as the main HEV reservoir since its discovery in the late 1990s and HEV screenings in food have focussed mainly on pork-derived meat and meat products. However, it is possible that other animal reservoirs representing a significant risk for the zoonotic transmission of HEV exist. More studies are then clearly needed to screen a larger variety of food products derived from diverse animal species, including rabbit, camel and many others for the presence of HEV RNA and infectious virus. An exhaustive understanding of the extent of the animal reservoirs and transmission routes representing a risk for zoonotic hepatitis E infection is essential to prevent and control efficiently the disease in the future.

Acknowledgments: Studies conducted on HEV by Nicole Pavio are supported by the European Union Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under Grant Agreement No. 278433-PREDEMICS.

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

References

1. Kamar, N.; Marion, O.; Abravanel, F.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver Int.* **2016**, *36*, 467–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sayed, I.M.; Vercouter, A.-S.; Abdelwahab, S.F.; Vercauteren, K.; Meuleman, P. Is hepatitis E virus an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology* **2015**, *62*, 1883–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Murali, A.R.; Kotwal, V.; Chawla, S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World J. Hepatol.* **2015**, *7*, 2194–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Khuroo, M.S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* **1980**, *68*, 818–824. [[CrossRef](#)]
5. Balayan, M.S.; Andjaparidze, A.G.; Savinskaya, S.S.; Ketiladze, E.S.; Braginsky, D.M.; Savinov, A.P.; Poleschuk, V.F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **1983**, *20*, 23–31. [[PubMed](#)]
6. Reyes, G.R.; Purdy, M.A.; Kim, J.P.; Luk, K.C.; Young, L.M.; Fry, K.E.; Bradley, D.W. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **1990**, *247*, 1335–1339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Tam, A.W.; Smith, M.M.; Guerra, M.E.; Huang, C.C.; Bradley, D.W.; Fry, K.E.; Reyes, G.R. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **1991**, *185*, 120–131. [[CrossRef](#)]
8. Smith, D.B.; Simmonds, P.; Jameel, S.; Emerson, S.U.; Harrison, T.J.; Meng, X.-J.; Okamoto, H.; Van der Poel, W.H.M.; Purdy, M.A.; et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2223–2232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Clayson, E.T.; Innis, B.L.; Myint, K.S.; Narupiti, S.; Vaughn, D.W.; Giri, S.; Ranabhat, P.; Shrestha, M.P. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *53*, 228–232. [[PubMed](#)]
10. Meng, X.J.; Purcell, R.H.; Halbur, P.G.; Lehman, J.R.; Webb, D.M.; Tsareva, T.S.; Haynes, J.S.; Thacker, B.J.; Emerson, S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9860–9865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Halbur, P.G.; Kasorndorkbua, C.; Gilbert, C.; Guenette, D.; Potters, M.B.; Purcell, R.H.; Emerson, S.U.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 918–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Pavio, N.; Meng, X.-J.; Renou, C. Zoonotic hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pavio, N.; Meng, X.-J.; Doceul, V. Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr. Opin. Virol.* **2015**, *10*, 34–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yugo, D.M.; Meng, X.-J. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 4507–4533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, T.-C.; Saito, M.; Ogura, G.; Ishibashi, O.; Miyamura, T.; Takeda, N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 932–936. [[PubMed](#)]
16. Nakamura, M.; Takahashi, K.; Taira, K.; Taira, M.; Ohno, A.; Sakugawa, H.; Arai, M.; Mishiro, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* **2006**, *34*, 137–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nidaira, M.; Takahashi, K.; Ogura, G.; Taira, K.; Okano, S.; Kudaka, J.; Itokazu, K.; Mishiro, S.; Nakamura, M. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 1665–1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhao, C.; Ma, Z.; Harrison, T.J.; Feng, R.; Zhang, C.; Qiao, Z.; Fan, J.; Ma, H.; Li, M.; Song, A.; Wang, Y. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 1371–1379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cossaboom, C.M.; Córdoba, L.; Dryman, B.A.; Meng, X.-J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2047–2049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lhomme, S.; Dubois, M.; Abravanel, F.; Top, S.; Bertagnoli, S.; Guerin, J.-L.; Izopet, J. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J. Clin. Virol.* **2013**, *58*, 357–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Caruso, C.; Modesto, P.; Prato, R.; Scaglione, F.E.; De Marco, L.; Bollo, E.; Acutis, P.L.; Masoero, L.; Peletto, S. Hepatitis E Virus: First description in a pet house rabbit. A new transmission route for human? *Transbound. Emerg. Dis.* **2015**, *62*, 229–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Sato, H.; Sato, Y.; Jirintai; Nagashima, S.; Okamoto, H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 902–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Teng, J.L.L.; Tsang, A.K.L.; Joseph, M.; Wong, E.Y.M.; Tang, Y.; Sivakumar, S.; Xie, J.; Bai, R.; Wernery, R.; et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1044–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lin, J.; Karlsson, M.; Olofson, A.-S.; Belák, S.; Malmsten, J.; Dalin, A.-M.; Widén, F.; Norder, H. High prevalence of hepatitis e virus in Swedish moose—A phylogenetic characterization and comparison of the virus from different regions. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Haqshenas, G.; Shivaprasad, H.L.; Woolcock, P.R.; Read, D.H.; Meng, X.J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 2449–2462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Payne, C.J.; Ellis, T.M.; Plant, S.L.; Gregory, A.R.; Wilcox, G.E. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.* **1999**, *68*, 119–125. [[CrossRef](#)]
27. Huang, F.F.; Haqshenas, G.; Shivaprasad, H.L.; Guenette, D.K.; Woolcock, P.R.; Larsen, C.T.; Pierson, F.W.; Elvinger, F.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4197–4202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Johne, R.; Heckel, G.; Plenge-Bönig, A.; Kindler, E.; Maresch, C.; Reetz, J.; Schielke, A.; Ulrich, R.G. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1452–1455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Raj, V.S.; Smits, S.L.; Pas, S.D.; Provacia, L.B. V.; Moorman-Roest, H.; Osterhaus, A.D. M.E.; Haagmans, B.L. Novel Hepatitis E Virus in Ferrets, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1369–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Krog, J.S.; Breum, S.Ø.; Jensen, T.H.; Larsen, L.E. Hepatitis E Virus variant in farmed mink, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 2028–2030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bodewes, R.; van der Giessen, J.; Haagmans, B.L.; Osterhaus, A.D.M.E.; Smits, S.L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7758–7764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Drexler, J.F.; Seelen, A.; Corman, V.M.; Tateno, A.F.; Cottontail, V.; Zerbinati, R.M.; Gloza-Rausch, F.; Klose, S.M.; Adu-Sarkodie, Y.; Oppong, S.K.; et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses

- that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.* **2012**, *86*, 9134–9147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Reuter, G.; Boros, Á.; Mátics, R.; Kapusinszky, B.; Delwart, E.; Pankovics, P. Divergent hepatitis E virus in birds of prey, common kestrel (*Falco tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*), Hungary. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 343–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Batts, W.; Yun, S.; Hedrick, R.; Winton, J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* **2011**, *158*, 116–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. Vina-Rodriguez, A.; Schlosser, J.; Becher, D.; Kaden, V.; Groschup, M.H.; Eiden, M. Hepatitis E virus genotype 3 diversity: Phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. *Viruses* **2015**, *7*, 2704–2726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 36. Oliveira-Filho, E.F.; König, M.; Thiel, H.-J. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Mirazo, S.; Mir, D.; Bello, G.; Ramos, N.; Musto, H.; Arbiza, J. New insights into the hepatitis E virus genotype 3 phylodynamics and evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 267–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Smith, D.B.; Simmonds, P.; Izopet, J.; Oliveira-Filho, E.F.; Ulrich, R.G.; Johne, R.; Koenig, M.; Jameel, S.; Harrison, T.J.; Meng, X.-J.; et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 537–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 39. Lu, L.; Li, C.; Hagedorn, C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 5–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 40. Zehender, G.; Ebranati, E.; Lai, A.; Luzzago, C.; Paladini, S.; Tagliacarne, C.; Galli, C.; Galli, M.; Ciccozzi, M.; Zanetti, A.R.; et al. Phylogeography and phylodynamics of European genotype 3 hepatitis E virus. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *25*, 138–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 41. Huang, C.C.; Nguyen, D.; Fernandez, J.; Yun, K.Y.; Fry, K.E.; Bradley, D.W.; Tam, A.W.; Reyes, G.R. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* **1992**, *191*, 550–558. [[CrossRef](#)]
 42. Buisson, Y.; Grandadam, M.; Nicand, E.; Cheval, P.; van Cuyck-Gandre, H.; Innis, B.; Rehel, P.; Coursaget, P.; Teyssou, R.; Tsarev, S. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 903–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 43. Nicand, E.; Armstrong, G.L.; Enouf, V.; Guthmann, J.P.; Guerin, J.-P.; Caron, M.; Nizou, J.Y.; Andraghetti, R. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. *J. Med. Virol.* **2005**, *77*, 519–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Ijaz, S.; Said, B.; Boxall, E.; Smit, E.; Morgan, D.; Tedder, R.S. Indigenous hepatitis E in England and Wales from 2003 to 2012: Evidence of an emerging novel phylogroup of viruses. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 1212–1218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Smith, D.B.; Ijaz, S.; Tedder, R.S.; Hogema, B.; Zaaijer, H.L.; Izopet, J.; Bradley-Stewart, A.; Gunson, R.; Harvala, H.; Kokki, I.; Simmonds, P. Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 3255–3264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Purdy, M.A.; Khudyakov, Y.E. Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 47. Teo, C.-G. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 767–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 48. Pei, Y.; Yoo, D. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a Canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4021–4029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 49. Bouquet, J.; Tesse, S.; Lunazzi, A.; Eloit, M.; Rose, N.; Nicand, E.; Pavio, N. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2018–2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 50. Lhomme, S.; Abravanel, F.; Dubois, M.; Chapuy-Regaud, S.; Sandres-Saune, K.; Mansuy, J.-M.; Rostaing, L.; Kamar, N.; Izopet, J. Temporal evolution of the distribution of hepatitis E virus genotypes in Southwestern France. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *35*, 50–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 51. Izopet, J.; Dubois, M.; Bertagnoli, S.; Lhomme, S.; Marchandeau, S.; Boucher, S.; Kamar, N.; Abravanel, F.; Guérin, J.-L. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1274–1281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Wu, J.; Si, F.; Jiang, C.; Li, T.; Jin, M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes* **2015**, *50*, 410–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Huang, F.; Li, Y.; Yu, W.; Jing, S.; Wang, J.; Long, F.; He, Z.; Yang, C.; Bi, Y.; Cao, W.; et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* **2016**, *64*, 350–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lee, G.-H.; Tan, B.-H.; Teo, E.C.-Y.; Lim, S.-G.; Dan, Y.-Y.; Wee, A.; Aw, P.P.K.; Zhu, Y.; Hibberd, M.L.; Tan, C.-K.; et al. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 355–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Huang, F.F.; Sun, Z.F.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H.; Shivaprasad, H.L.; Pierson, F.W.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 1609–1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Bilic, I.; Jaskulska, B.; Basic, A.; Morrow, C.J.; Hess, M. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 863–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hsu, I.W.-Y.; Tsai, H.-J. Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 149–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Guan, D.; Li, W.; Su, J.; Fang, L.; Takeda, N.; Wakita, T.; Li, T.-C.; Ke, C. Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis E virus, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1341–1343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Li, W.; Guan, D.; Su, J.; Takeda, N.; Wakita, T.; Li, T.-C.; Ke, C.W. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 275–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lin, J.; Norder, H.; Uhlhorn, H.; Belák, S.; Widén, F. Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 557–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Johne, R.; Dremsek, P.; Reetz, J.; Heckel, G.; Hess, M.; Ulrich, R.G. Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *27*, 212–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Vitral, C.L.; Yoshida, C.F.; Gaspar, A.M. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev.* **1998**, *31*, 1035–1048. [[CrossRef](#)]
63. Yamamoto, H.; Suzuki, J.; Matsuda, A.; Ishida, T.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Adachi, I.; Wakita, T.; Takeda, N.; Li, T.-C. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 2032–2034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tsarev, S.A.; Tsareva, T.S.; Emerson, S.U.; Rippey, M.K.; Zack, P.; Shapiro, M.; Purcell, R.H. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: Failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis.* **1995**, *172*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, X.; Kamili, S.; Krawczynski, K. Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J. Viral Hepat.* **2006**, *13*, 835–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Erker, J.C.; Desai, S.M.; Schlauder, G.G.; Dawson, G.J.; Mushahwar, I.K. A hepatitis E virus variant from the United States: Molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 681–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ma, H.; Song, X.; Harrison, T.J.; Li, R.; Huang, G.; Zhang, H.; Kong, W.; Wang, Y. Immunogenicity and efficacy of a bacterially expressed HEV ORF3 peptide, assessed by experimental infection of primates. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 1641–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yugo, D.M.; Cossaboom, C.M.; Meng, X.-J. Naturally occurring animal models of human hepatitis E virus infection. *ILAR J.* **2014**, *55*, 187–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Bradley, D.W.; Krawczynski, K.; Cook, E.H.; McCaustland, K.A.; Humphrey, C.D.; Spelbring, J.E.; Myint, H.; Maynard, J.E. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6277–6281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Krawczynski, K.; Bradley, D.W. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* **1989**, *159*, 1042–1049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Aggarwal, R.; Kamili, S.; Spelbring, J.; Krawczynski, K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 1380–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

72. Longer, C.F.; Denny, S.L.; Caudill, J.D.; Miele, T.A.; Asher, L.V.; Myint, K.S.; Huang, C.C.; Engler, W.F.; LeDuc, J.W.; Binn, L.N. Experimental hepatitis E: Pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Infect. Dis.* **1993**, *168*, 602–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tsarev, S.A.; Emerson, S.U.; Tsareva, T.S.; Yarbough, P.O.; Lewis, M.; Govindarajan, S.; Reyes, G.R.; Shapiro, M.; Purcell, R.H. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*, 1302–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Purdy, M.A.; McCaustland, K.A.; Krawczynski, K.; Spelbring, J.; Reyes, G.R.; Bradley, D.W. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J. Med. Virol.* **1993**, *41*, 90–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Tsarev, S.A.; Tsareva, T.S.; Emerson, S.U.; Govindarajan, S.; Shapiro, M.; Gerin, J.L.; Purcell, R.H. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10198–10202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Meng, X.J.; Halbur, P.G.; Shapiro, M.S.; Govindarajan, S.; Bruna, J.D.; Mushahwar, I.K.; Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 9714–9721. [[PubMed](#)]
77. Arankalle, V.A.; Chobe, L.P.; Chadha, M.S. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J. Viral Hepat.* **2006**, *13*, 742–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Liu, P.; Bu, Q.-N.; Wang, L.; Han, J.; Du, R.-J.; Lei, Y.-X.; Ouyang, Y.-Q.; Li, J.; Zhu, Y.-H.; Lu, F.-M.; et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 559–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Li, T.-C.; Yoshizaki, S.; Ami, Y.; Suzuki, Y.; Yang, T.; Takeda, N.; Takaji, W. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. *Intervirology* **2015**, *58*, 139–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Feagins, A.R.; Opriessnig, T.; Huang, Y.W.; Halbur, P.G.; Meng, X.J. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 1379–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Meng, X.J.; Halbur, P.G.; Haynes, J.S.; Tsareva, T.S.; Bruna, J.D.; Royer, R.L.; Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* **1998**, *143*, 1405–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Lee, Y.H.; Ha, Y.; Ahn, K.K.; Chae, C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet. J. Lond. Engl.* **1997** **2009**, *179*, 417–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Williams, T.P.; Kasorndorkbua, C.; Halbur, P.G.; Haqshenas, G.; Guenette, D.K.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 3040–3046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Cossaboom, C.M.; Córdoba, L.; Sanford, B.J.; Piñeyro, P.; Kenney, S.P.; Dryman, B.A.; Wang, Y.; Meng, X.-J. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 1687–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Schlosser, J.; Eiden, M.; Vina-Rodriguez, A.; Fast, C.; Dremsek, P.; Lange, E.; Ulrich, R.G.; Groschup, M.H. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Schlosser, J.; Vina-Rodriguez, A.; Fast, C.; Groschup, M.H.; Eiden, M. Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. *Vet. Microbiol.* **2015**, *180*, 15–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Marek, A.; Bilic, I.; Prokofieva, I.; Hess, M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 54–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Billam, P.; Huang, F.F.; Sun, Z.F.; Pierson, F.W.; Duncan, R.B.; Elvinger, F.; Guenette, D.K.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3429–3437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Billam, P.; Pierson, F.W.; Li, W.; LeRoith, T.; Duncan, R.B.; Meng, X.J. Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of hepatitis E virus: Identification of nonliver replication sites. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2630–2634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Sun, Z.F.; Larsen, C.T.; Huang, F.F.; Billam, P.; Pierson, F.W.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2658–2662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

91. Huang, F.F.; Pierson, F.W.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 2585–2593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kwon, H.M.; LeRoith, T.; Pudupakam, R.S.; Pierson, F.W.; Huang, Y.-W.; Dryman, B.A.; Meng, X.-J. Construction of an infectious cDNA clone of avian hepatitis E virus (avian HEV) recovered from a clinically healthy chicken in the United States and characterization of its pathogenicity in specific-pathogen-free chickens. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147*, 310–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Pudupakam, R.S.; Huang, Y.W.; Opriessnig, T.; Halbur, P.G.; Pierson, F.W.; Meng, X.J. Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: Evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J. Virol.* **2009**, *83*, 384–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Pudupakam, R.S.; Kenney, S.P.; Córdoba, L.; Huang, Y.-W.; Dryman, B.A.; Leroith, T.; Pierson, F.W.; Meng, X.-J. Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10031–10040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cheng, X.; Wang, S.; Dai, X.; Shi, C.; Wen, Y.; Zhu, M.; Zhan, S.; Meng, J. Rabbit as a novel animal model for hepatitis E virus infection and vaccine evaluation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Han, J.; Lei, Y.; Liu, L.; Liu, P.; Xia, J.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wang, L.; Wang, L.; Zhuang, H. SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Ma, H.; Zheng, L.; Liu, Y.; Zhao, C.; Harrison, T.J.; Ma, Y.; Sun, S.; Zhang, J.; Wang, Y. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Mao, J.; Zhao, Y.; She, R.; Cao, B.; Xiao, P.; Wu, Q.; Guo, Z.; Ma, L.; Soomro, M.H. Detection and localization of rabbit hepatitis e virus and antigen in systemic tissues from experimentally intraperitoneally infected rabbits. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Xia, J.; Liu, L.; Wang, L.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Liu, P.; Zou, Q.; Wang, L.; Zhuang, H. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *J. Viral Hepat.* **2015**, *22*, 850–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Liu, L.; Wang, L.; Xia, J.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Liu, P.; Zou, Q.; Wang, L.; Zhuang, H. Mix-breeding with HEV-infected swine induced inapparent HEV infection in SPF rabbits. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 681–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Li, T.-C.; Yoshizaki, S.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Yasuda, S.P.; Yoshimatsu, K.; Arikawa, J.; Takeda, N.; Wakita, T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet. Microbiol.* **2013**, *163*, 54–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Maneerat, Y.; Clayson, E.T.; Myint, K.S.; Young, G.D.; Innis, B.L. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* **1996**, *48*, 121–128. [[CrossRef](#)]
103. Purcell, R.H.; Engle, R.E.; Rood, M.P.; Kabrane-Lazizi, Y.; Nguyen, H.T.; Govindarajan, S.; St Claire, M.; Emerson, S.U. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2216–2222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Li, T.-C.; Yang, T.; Yoshizaki, S.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Ishii, K.; Haga, K.; Nakamura, T.; Ochiai, S.; Takaji, W.; et al. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 1320–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Zhu, Y.; Yu, X.; Zhang, Y.; Ni, Y.; Si, F.; Yu, R.; Dong, S.; Huang, Y.; Li, Z. Infectivity of a genotype 4 hepatitis E virus cDNA clone by intrahepatic inoculation of laboratory rats. *Vet. Microbiol.* **2013**, *166*, 405–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Si, F.; Shi, B.; Wang, X.; Zhu, Y.; Liu, X.; Yang, Q.; Li, Z. Construction of an infectious cDNA clone of a swine genotype 3 HEV strain isolated in Shanghai, China. *Intervirology* **2014**, *57*, 74–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Li, T.-C.; Yang, T.; Yoshizaki, S.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Ishii, K.; Kishida, N.; Shirakura, M.; Asanuma, H.; Takeda, N.; et al. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. *Vet. Microbiol.* **2016**, *183*, 30–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Li, W.; Sun, Q.; She, R.; Wang, D.; Duan, X.; Yin, J.; Ding, Y. Experimental infection of Mongolian gerbils by a genotype 4 strain of swine hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 1591–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Yang, Y.; Shi, R.; She, R.; Soomro, M.H.; Mao, J.; Du, F.; Zhao, Y.; Liu, C. Effect of swine hepatitis E virus on the livers of experimentally infected Mongolian gerbils by swine hepatitis E virus. *Virus Res.* **2015**, *208*, 171–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Bouwknegt, M.; Rutjes, S.A.; Reusken, C.B.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Frankena, K.; de Jong, M.C.M.; de Roda Husman, A.M.; van der Poel, W.H.M. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* **2009**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Shi, R.; Soomro, M.H.; She, R.; Yang, Y.; Wang, T.; Wu, Q.; Li, H.; Hao, W. Evidence of hepatitis E virus breaking through the blood-brain barrier and replicating in the central nervous system. *J. Viral Hepat.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Hong, Y.; He, Z.-J.; Tao, W.; Fu, T.; Wang, Y.-K.; Chen, Y. Experimental infection of Z:ZCLA Mongolian gerbils with human hepatitis E virus. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 862–867. [[PubMed](#)]
113. Li, T.-C.; Suzaki, Y.; Ami, Y.; Tsunemitsu, H.; Miyamura, T.; Takeda, N. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* **2008**, *70*, 1359–1362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Huang, F.; Zhang, W.; Gong, G.; Yuan, C.; Yan, Y.; Yang, S.; Cui, L.; Zhu, J.; Yang, Z.; Hua, X. Experimental infection of Balb/c nude mice with Hepatitis E virus. *BMC Infect. Dis.* **2009**, *9*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Allweiss, L.; Gass, S.; Giersch, K.; Groth, A.; Kah, J.; Volz, T.; Rapp, G.; Schöbel, A.; Lohse, A.W.; Polywka, S.; et al. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1033–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Sayed, I.M.; Verhoye, L.; Cocquerel, L.; Abravanel, F.; Foquet, L.; Montpellier, C.; Debing, Y.; Farhoudi, A.; Wychowski, C.; Dubuisson, J.; et al. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Van de Garde, M.D.B.; Pas, S.D.; van der Net, G.; de Man, R.A.; Osterhaus, A.D.M.E.; Haagmans, B.L.; Boonstra, A.; Vanwollegem, T. Hepatitis E virus (HEV) genotype 3 infection of human liver chimeric mice as a model for chronic HEV infection. *J. Virol.* **2016**, *90*, 4394–4401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Córdoba, L.; Feagins, A.R.; Opriessnig, T.; Cossaboom, C.M.; Dryman, B.A.; Huang, Y.-W.; Meng, X.-J. Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 2183–2194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Feagins, A.R.; Córdoba, L.; Sanford, B.J.; Dryman, B.A.; Huang, Y.-W.; LeRoith, T.; Emerson, S.U.; Meng, X.-J. Intergenotypic chimeric hepatitis E viruses (HEVs) with the genotype 4 human HEV capsid gene in the backbone of genotype 3 swine HEV are infectious in pigs. *Virus Res.* **2011**, *156*, 141–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Chatterjee, S.N.; Devhare, P.B.; Pingle, S.Y.; Paingankar, M.S.; Arankalle, V.A.; Lole, K.S. HEV-1 harbouring HEV-4 nonstructural protein (ORF1) replicates in transfected porcine kidney cells. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1829–1840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Lara, J.; Purdy, M.A.; Khudyakov, Y.E. Genetic host specificity of hepatitis E virus. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *24*, 127–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Bouquet, J.; Cheval, J.; Rogée, S.; Pavio, N.; Eloit, M. Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6238–6245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Tei, S.; Kitajima, N.; Takahashi, K.; Mishiro, S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* **2003**, *362*, 371–373. [[CrossRef](#)]
124. Li, T.-C.; Chijiwa, K.; Sera, N.; Ishibashi, T.; Etoh, Y.; Shinohara, Y.; Kurata, Y.; Ishida, M.; Sakamoto, S.; Takeda, N.; Miyamura, T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1958–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Riveiro-Barciela, M.; Mínguez, B.; Gironés, R.; Rodríguez-Frías, F.; Quer, J.; Buti, M. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.* **2015**, *49*, 165–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Renou, C.; Roque-Alfonso, A.; Pavio, N. Foodborne transmission of HEV from raw pork liver sausage in France. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, in press. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Yazaki, Y.; Mizuo, H.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Sasaki, N.; Gotanda, Y.; Okamoto, H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2351–2357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Matsuda, H.; Okada, K.; Takahashi, K.; Mishiro, S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* **2003**, *188*, 944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

129. Colson, P.; Borentain, P.; Queyriaux, B.; Kaba, M.; Moal, V.; Gallian, P.; Heyries, L.; Raoult, D.; Gerolami, R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 825–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Yapa, C.M.; Furlong, C.; Rosewell, A.; Ward, K.A.; Adamson, S.; Shadbolt, C.; Kok, J.; Tracy, S.L.; Bowden, S.; Smedley, E.J.; et al. First reported outbreak of locally acquired hepatitis E virus infection in Australia. *Med. J. Aust.* **2016**, *204*, 274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Masuda, J.-I.; Yano, K.; Tamada, Y.; Takii, Y.; Ito, M.; Omagari, K.; Kohno, S. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol. Res.* **2005**, *31*, 178–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Tamada, Y.; Yano, K.; Yatsuhashi, H.; Inoue, O.; Mawatari, F.; Ishibashi, H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J. Hepatol.* **2004**, *40*, 869–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Guillois, Y.; Abravanel, F.; Miura, T.; Pavio, N.; Vaillant, V.; Lhomme, S.; Le Guyader, F.S.; Rose, N.; Le Saux, J.-C.; King, L.A.; et al. High proportion of asymptomatic infections in an outbreak of hepatitis E associated with a spit-roasted piglet, France, 2013. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 351–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Wichmann, O.; Schimanski, S.; Koch, J.; Kohler, M.; Rothe, C.; Plentz, A.; Jilg, W.; Stark, K. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 1732–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Mansuy, J.M.; Gallian, P.; Dimeglio, C.; Saune, K.; Arnaud, C.; Pelletier, B.; Morel, P.; Legrand, D.; Tiberghien, P.; Izopet, J. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* **2016**, *63*, 1145–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Cossaboom, C.M.; Heffron, C.L.; Cao, D.; Yugo, D.M.; Houk-Miles, A.E.; Lindsay, D.S.; Zajac, A.M.; Bertke, A.S.; Elvinger, F.; Meng, X.-J. Risk factors and sources of foodborne hepatitis E virus infection in the United States. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 1641–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Chaussade, H.; Rigaud, E.; Allix, A.; Carpentier, A.; Touzé, A.; Delzescaux, D.; Choutet, P.; Garcia-Bonnet, N.; Coursaget, P. Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *J. Clin. Virol.* **2013**, *58*, 504–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Said, B.; Ijaz, S.; Chand, M.A.; Kafatos, G.; Tedder, R.; Morgan, D. Hepatitis E virus in England and Wales: Indigenous infection is associated with the consumption of processed pork products. *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 1467–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Pavio, N.; Merbah, T.; Thébault, A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1925–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Di Bartolo, I.; Diez-Valcarce, M.; Vasickova, P.; Kralik, P.; Hernandez, M.; Angeloni, G.; Ostanello, F.; Bouwknecht, M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Pavlik, I.; et al. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1282–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Di Bartolo, I.; Angeloni, G.; Ponterio, E.; Ostanello, F.; Ruggeri, F.M. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *193*, 29–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Szabo, K.; Trojnar, E.; Anheyer-Behmenburg, H.; Binder, A.; Schotte, U.; Ellerbroek, L.; Klein, G.; Johne, R. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 149–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Grierson, S.; Heaney, J.; Cheney, T.; Morgan, D.; Wyllie, S.; Powell, L.; Smith, D.; Ijaz, S.; Steinbach, F.; Choudhury, B.; et al. Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Pigs at the Time of Slaughter, United Kingdom, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1396–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Rose, N.; Lunazzi, A.; Dorenlor, V.; Merbah, T.; Eono, F.; Eloit, M.; Madec, F.; Pavio, N. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *34*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Bouwknecht, M.; Engel, B.; Herremans, M.M.P.T.; Widdowson, M.A.; Worm, H.C.; Koopmans, M.P.G.; Frankena, K.; de Roda Husman, A.M.; De Jong, M.C.M.; Van Der Poel, W.H.M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* **2008**, *136*, 567–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Berto, A.; Martelli, F.; Grierson, S.; Banks, M. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1358–1360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Okano, H.; Takahashi, M.; Isono, Y.; Tanaka, H.; Nakano, T.; Oya, Y.; Sugimoto, K.; Ito, K.; Ohmori, S.; Maegawa, T.; et al. Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus

- genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol. Res.* **2014**, *44*, E63–E76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Feagins, A.R.; Opriessnig, T.; Guenette, D.K.; Halbur, P.G.; Meng, X.-J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 912–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Lhomme, S.; Top, S.; Bertagnoli, S.; Dubois, M.; Guerin, J.-L.; Izopet, J. Wildlife reservoir for hepatitis E virus, southwestern France. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1224–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Serracca, L.; Battistini, R.; Rossini, I.; Mignone, W.; Peletto, S.; Boin, C.; Pistone, G.; Ercolini, R.; Ercolini, C. Molecular investigation on the presence of hepatitis E virus (HEV) in wild game in north-western Italy. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 206–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Heldt, F.H.; Staggmeier, R.; Gularte, J.S.; Demoliner, M.; Henzel, A.; Spilki, F.R. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in southern Brazil. *Food Environ. Virol.* **2016**, *8*, 200–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Berto, A.; Grierson, S.; Hakze-van der Honing, R.; Martelli, F.; John, R.; Reetz, J.; Ulrich, R.G.; Pavio, N.; Van der Poel, W.H.M.; Banks, M. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 264–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Takahashi, H.; Tanaka, T.; Jirintai, S.; Nagashima, S.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Mizuo, H.; Yazaki, Y.; Okamoto, H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: Demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Mesquita, J.R.; Oliveira, D.; Rivadulla, E.; Abreu-Silva, J.; Varela, M.F.; Romalde, J.L.; Nascimento, M.S.J. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol.* **2016**, *58*, 13–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Crossan, C.; Baker, P.J.; Craft, J.; Takeuchi, Y.; Dalton, H.R.; Scobie, L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 2085–2087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Song, Y.-J.; Jeong, H.-J.; Kim, Y.-J.; Lee, S.-W.; Lee, J.-B.; Park, S.-Y.; Song, C.-S.; Park, H.-M.; Choi, I.-S. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 583–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Li, T.-C.; Miyamura, T.; Takeda, N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 170–172. [[PubMed](#)]
158. Gao, S.; Li, D.; Zha, E.; Zhou, T.; Wang, S.; Yue, X. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 2026–2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Grodzki, M.; Schaeffer, J.; Piquet, J.-C.; Le Saux, J.-C.; Chev e, J.; Ollivier, J.; Le Pendu, J.; Le Guyader, F.S. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4269–4276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Koizumi, Y.; Isoda, N.; Sato, Y.; Iwaki, T.; Ono, K.; Ido, K.; Sugano, K.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Okamoto, H. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3883–3885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Said, B.; Ijaz, S.; Kafatos, G.; Booth, L.; Thomas, H.L.; Walsh, A.; Ramsay, M.; Morgan, D.; Hepatitis E Incident Investigation Team. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1738–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Brassard, J.; Gagn e, M.-J.; G en ereux, M.; C ot e, C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3763–3766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Maunula, L.; Kaupke, A.; Vasickova, P.; S oderberg, K.; Kozyra, I.; Lazic, S.; van der Poel, W.H.M.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.A.; et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazic, S.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; Kaupke, A.; Legaki, E.; et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ. Virol.* **2012**, *4*, 179–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Loisy-Hamon, F.; Leturnier, G. Autochthonous cases of hepatitis E: Where does the virus come from? Impact of pig slurry treatment on reduction of the viral load and prevalence of the virus in food substrates. *EuroReference* **2015**, *13*, 13–18.

166. McCreary, C.; Martelli, F.; Grierson, S.; Ostanello, F.; Nevel, A.; Banks, M. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **2008**, *163*, 261–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Pina, S.; Buti, M.; Cotrina, M.; Piella, J.; Girones, R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.* **2000**, *33*, 826–833. [[CrossRef](#)]
168. Fernández-Barredo, S.; Galiana, C.; García, A.; Vega, S.; Gómez, M.T.; Pérez-Gracia, M.T. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2006**, *18*, 462–465. [[CrossRef](#)]
169. Kasorndorkbua, C.; Opriessnig, T.; Huang, F.F.; Guenette, D.K.; Thomas, P.J.; Meng, X.-J.; Halbur, P.G. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7831–7837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Steyer, A.; Naglič, T.; Močilnik, T.; Poljšak-Prijatelj, M.; Poljak, M. Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 1732–1737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Gentry-Shields, J.; Myers, K.; Pisanic, N.; Heaney, C.; Stewart, J. Hepatitis E virus and coliphages in waters proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Sci. Total Environ.* **2015**, *505*, 487–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; Lodder-Verschoor, F.; van den Berg, H.H.J.L.; Vennema, H.; Duizer, E.; Koopmans, M.; de Roda Husman, A.M. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 381–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Ishida, S.; Yoshizumi, S.; Ikeda, T.; Miyoshi, M.; Goto, A.; Matsubayashi, K.; Ikeda, H. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 2363–2368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Iaconelli, M.; Purpari, G.; Della Libera, S.D.; Petricca, S.; Guercio, A.; Ciccaglione, A.R.; Bruni, R.; Taffon, S.; Equestre, M.; Fratini, M.; et al. Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 316–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Zhu, F.-C.; Zhang, J.; Zhang, X.-F.; Zhou, C.; Wang, Z.-Z.; Huang, S.-J.; Wang, H.; Yang, C.-L.; Jiang, H.-M.; Cai, J.-P.; et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **2010**, *376*, 895–902. [[CrossRef](#)]
176. John, R.; Trojnar, E.; Filter, M.; Hofmann, J. Thermal stability of hepatitis E virus estimated by a cell culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Emerson, S.U.; Arankalle, V.A.; Purcell, R.H. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 930–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Feagins, A.R.; Opriessnig, T.; Guenette, D.K.; Halbur, P.G.; Meng, X.J. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *123*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Barnaud, E.; Rogée, S.; Garry, P.; Rose, N.; Pavio, N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5153–5159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Withers, M.R.; Correa, M.T.; Morrow, M.; Stebbins, M.E.; Seriwatana, J.; Webster, W.D.; Boak, M.B.; Vaughn, D.W. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 384–388. [[PubMed](#)]
181. Meng, X.J.; Wiseman, B.; Elvinger, F.; Guenette, D.K.; Toth, T.E.; Engle, R.E.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 117–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Olsen, B.; Axelsson-Olsson, D.; Thelin, A.; Weiland, O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand. J. Infect. Dis.* **2006**, *38*, 55–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Drobeniuc, J.; Favorov, M.O.; Shapiro, C.N.; Bell, B.P.; Mast, E.E.; Dadu, A.; Culver, D.; Iarovoi, P.; Robertson, B.H.; Margolis, H.S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 1594–1597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Traoré, K.A.; Ouoba, J.B.; Huot, N.; Rogée, S.; Dumarest, M.; Traoré, A.S.; Pavio, N.; Barro, N.; Roques, P. Hepatitis E virus exposure is increased in pork butchers from Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *93*, 1356–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

185. Carpentier, A.; Chaussade, H.; Rigaud, E.; Rodriguez, J.; Berthault, C.; Boué, F.; Tognon, M.; Touzé, A.; Garcia-Bonnet, N.; Choutet, P.; et al. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2888–2893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Dremsek, P.; Wenzel, J.J.; Johne, R.; Ziller, M.; Hofmann, J.; Groschup, M.H.; Werdermann, S.; Mohn, U.; Dorn, S.; Motz, M.; et al. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 189–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Schielke, A.; Ibrahim, V.; Czogiel, I.; Faber, M.; Schrader, C.; Dremsek, P.; Ulrich, R.G.; Johne, R. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: A cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Cui, W.; Sun, Y.; Xu, A.; Gao, R.; Gong, L.; Zhang, L.; Jiang, M. Hepatitis E seroprevalence and related risk factors among seafood processing workers: A cross-sectional survey in Shandong Province, China. *Int. J. Infect. Dis.* **2016**, *49*, 62–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Renou, C.; Cadranel, J.-F.; Bourlière, M.; Halfon, P.; Ouzan, D.; Rifflet, H.; Carencio, P.; Harafa, A.; Bertrand, J.J.; Boutrouille, A.; et al. Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1094–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Veterinary Research

Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	VETR-D-17-00105
Full Title:	Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human
Article Type:	Review
Funding Information:	
Abstract:	Hepatitis E virus (HEV) causes self-limiting acute hepatitis in humans that can eventually result in acute liver failures or progress to chronic infections. While in tropical and sub-tropical areas, HEV infections are associated with important waterborne epidemics, in Northern countries, HEV infections are autochthonous with a zoonotic origin. In the past decade, it has become clear that certain HEV genotypes are zoonotic and that swine, and more generally Suidae, are the main reservoir. Zoonotic transmissions of the virus may occur via direct contact with infected pigs, wild boars or consumption of contaminated meat. This review describes the current knowledge on domestic and wild Suidae as reservoirs of HEV and the evidence of the different routes of HEV transmission between these animals and humans.
Corresponding Author:	Nicole Pavio Anses Maisons-Alfort, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Anses
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Nicole Pavio
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Nicole Pavio Virginie Doceul Eugénie Bagdassarian Reimar Johne
Order of Authors Secondary Information:	

[Click here to view linked References](#)

1 **Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to**
2 **human**

3

4 Nicole Pavio^{1, 2, 3*}, Virginie Doceul^{1, 2, 3}, Eugénie Bagdassarian^{1, 2, 3} and Reimar Johne⁴

5

6 ¹ANSES, Animal Health Laboratory, UMR 1161 Virology, Maisons-Alfort, France

7 ²INRA, UMR 1161 Virology, Maisons-Alfort, France

8 ³PRES University Paris 12, National Veterinary School, UMR 1161 Virology, Maisons-Alfort,

9 France

10 ⁴German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

11 * Corresponding author

12 Nicole Pavio, UMR 1161 Virology, Anses LSA, INRA, ENVA

13 14, rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort cedex, France

14 Tel: +33 1 43 96 72 09

15 Fax: +33 1 43 96 73 96

16 Nicole Pavio: nicole.pavio@anses.fr

17 Virginie Doceul: virginie.doceul@vet-alfort.fr

18 Eugénie Bagdassarian: eugenie.bagdassarian@vet-alfort.fr

19 Reimar Johne: reimar.johne@bfr.bund.de

20 Running title: Hepatitis E virus in suids and zoonotic transmissions

21 Key words: Hepatitis E virus, zoonosis, animal reservoirs, Suidae, foodborne transmissions

22 Table of content

23 **Abstract..... 3**

24 **I- Introduction 4**

25 **II- Suidae reservoirs 5**

26 **II.1 Domestic swine..... 5**

27 HEV infection in domestic pigs 5

28 Risk factors associated with HEV infection within pig farms 8

29 **II.2 Wild fauna 11**

30 **II.3 HEV transmission between domestic and wild suidae 14**

31 **III- HEV in food products from Suidae and deer 16**

32 **IV-Contact exposure with suidae 18**

33 **Conclusion 20**

34

35

36 **Abstract**

37 Hepatitis E virus (HEV) causes self-limiting acute hepatitis in humans that can eventually
38 result in acute liver failures or progress to chronic infections. While in tropical and sub-
39 tropical areas, HEV infections are associated with important waterborne epidemics, in
40 Northern countries, HEV infections are autochthonous with a zoonotic origin. In the past
41 decade, it has become clear that certain HEV genotypes are zoonotic and that swine, and
42 more generally Suidae, are the main reservoir. Zoonotic transmissions of the virus may occur
43 via direct contact with infected pigs, wild boars or consumption of contaminated meat. This
44 review describes the current knowledge on domestic and wild Suidae as reservoirs of HEV
45 and the evidence of the different routes of HEV transmission between these animals and
46 humans.

47 **I- Introduction**

48 Hepatitis E virus (HEV) infection is highly prevalent in human worldwide, with more than 20
49 million infections each year (WHO). Clinical hepatitis E is usually self-limiting but some cases
50 may evolve into fulminant hepatitis with poor prognosis. In some endemic regions, up to 30%
51 of pregnant women infected by HEV during the 3rd trimester die from acute liver failure [1]. In
52 Northern countries, chronic HEV infections are observed in immunosuppressive contexts,
53 notably in solid organ transplant recipients [2]. In those patients, rapid progression toward
54 cirrhosis is observed. Extrahepatic symptoms, such as neurological, kidney or
55 haematological dysfunctions, have also been described. HEV is transmitted by the oral route
56 and occasionally through the parenteral route after accidental transfusion of HEV positive
57 blood donation. In endemic regions (tropical and subtropical areas), HEV is a waterborne
58 disease associated with large epidemics related to accidental contamination of drinking water
59 by sewage. In Northern countries, HEV is suspected to be mostly a foodborne disease
60 transmitted through consumption of infected food products. HEV is unique among the
61 hepatitis viruses since it is the only one possessing non-primate animal reservoirs and being
62 a foodborne zoonosis. HEV is widespread in pig farms and consumption of pork products,
63 specially containing pig liver, is associated with HEV infections [3]. HEV is also present in
64 wild boars and consumption of game meat or hunting is associated with HEV exposure.
65 Contact exposure with infected animals is a possible transmission route as well, since
66 professional occupations with animal reservoirs (pig -farmer and -veterinarians,
67 slaughterhouse- and forestry- workers, hunters) have a higher seroprevalence than the
68 related general population. Interactions between wild and domestic suids occur and may
69 contribute to the spread and maintenance of HEV in both reservoirs. This review aims at
70 presenting the recent data on Suidae reservoirs, cross-contaminations between wild and
71 domestic pigs and on vehicles of HEV exposure through contacts or consumption of food
72 products from infected animals.

73

74 **II- Suidae reservoirs**

75 HEV belongs to the Hepeviridae family which is divided into the genera *Orthohepevirus* and
76 *Piscihepevirus* [3]. In the *Orthohepevirus* genus, 4 species (A to D) can be distinguished that
77 are divided into several genotypes. Human and zoonotic HEV are classified into the
78 *Orthohepevirus* species A, which includes 7 genotypes. HEV-1 and HEV-2 infect humans
79 only, whereas HEV-3 and HEV-4 can be found both in human and Suidae species (Figure 1).
80 Within the genotype HEV-3, a separate branch corresponds to the HEV present in rabbit
81 species (HEV-3ra), which also includes a closely related human strain (Figure1). Two other
82 genotypes, HEV-5 and HEV-6, have been described only in wild boars from Japan [4] (Figure
83 1). HEV-7 was first identified in dromedary camel [5] and then in one patient with chronic
84 hepatitis after liver-transplantation [6].

85 HEV-3 is widely distributed and present in pigs from many geographic areas including
86 Americas, Europe, Africa, Japan, south-east Asia and Oceania, whereas HEV-4 is described
87 mainly in pigs from China, Japan and Indonesia [7].

88 **II.1 Domestic swine**

89 **HEV infection in domestic pigs**

90 Since the discovery of swine HEV in 1997 [8], numerous publications have shown high
91 prevalence of HEV in pig herds (up to 100%) all over the world. Each continent is concerned:
92 Asia (China, India, Indonesia, Japan, Korea, Mongolia, Philippines, Taiwan, Thailand and
93 Vietnam), Americas (Argentina, Bolivia, Brazil, Canada, Cuba and Mexico), Africa
94 (Cameroon, Democratic Republic of Congo, Nigeria and Madagascar), Europe (Belgium,
95 Czech Republic, Finland, France, Germany, Hungary, Italy, the Netherlands, Romania,
96 Spain, Sweden, Switzerland and the United Kingdom) and Oceania (Australia, New
97 Caledonia and New Zealand) [7, 9–14]. Seroprevalences were estimated between 5% and
98 100% [7, 9–14]. Comparisons of HEV seroprevalences between countries are limited since
99 sample collections (serum, occasionally meat juice) [15] and method of analysis are very

100 diverse. Both commercial ELISA tests and in house assays were used to detect anti-HEV
101 IgG and/or IgM. Viral prevalences are even more heterogeneous as they depend on the
102 sampling strategies used: nature of the sample (blood, faecal, liver, other organs), age of the
103 animals and method of analysis by conventional or real time RT-PCR that are still not
104 standardized.

105 All studies converge toward an infection of pigs at an early age after the loss of maternal
106 antibodies [16]. The peak of viral excretion in pig fecal samples is detected between 3-8
107 weeks after weaning [17], and then viral excretion decreases between 15 and 18 weeks of
108 age [18] with the appearance of antibodies, IgM followed by IgG (seroconversion) [19]. The
109 duration of the immunity acquired after HEV infection has not been estimated. Possible re-
110 infection in case of transient decrease of immunity (sow after delivery or during co-infection)
111 cannot be excluded. A loss of protection by a decrease of antibody or cellular response over
112 time may also happen in older animals, especially in sows [20].

113 The presence of HEV RNA in serum samples (viremia) is less documented and seems to be
114 less frequent than in liver or fecal samples [21]. Thus, the search for HEV RNA in blood or
115 serum for diagnosis and prevalence studies may not be the best method to detect acute HEV
116 infection in natural settings. Also, experimental infection of pigs shows that viremia can be
117 influenced by the inoculation route [22]. Viral RNA was detected more frequently in the blood
118 of infected animals after intravenous inoculation than after oral inoculation [22].

119 In both natural and experimental infections of pigs, rare histological signs of hepatitis are
120 observed and infected animals do not show weight loss or hyperthermia. Thus, HEV in pig
121 herds is not considered as an animal health threat. The main site of HEV multiplication is the
122 liver but HEV can be found in other pork organs after experimental infections. HEV RNA or
123 replicative forms of HEV RNA can be detected in extra-hepatic sites such as spleen,
124 duodenum, jejunum, colon, lung, gastro-hepatic lymph nodes and muscles [22–24]. In one
125 study, HEV was additionally detected in the lung [22]. Bouwknecht et al. (2009) reported the

126 detection of HEV in tissues from three different muscles (Longissimus, Biceps femoris,
127 iliopsoas) in most of the inoculated and contact-infected pigs [23]. Generally, the highest
128 detection rates and amounts of HEV RNA are found in the liver, whereas other organs show
129 lower detection rates as well as lower HEV RNA concentrations. In these experimental
130 models, several inoculation routes were used: intravenous, oral route and contact with
131 inoculated animals. Again, depending on the inoculation route, HEV distribution was
132 modulated, suggesting that experimental settings influence the outcome of the viral infection
133 and may not completely reflect natural infection. Presence of HEV in muscle or other pig
134 organs entering the food chain is of concern for food safety. Up to now, only few studies
135 were conducted at slaughterhouse, on small sample size, to investigate the presence of HEV
136 RNA in the organs of naturally infected pigs. In one of these studies, HEV RNA was
137 searched in several organs such as loin, bladder or tonsils from selected animals (n=43) [25].
138 HEV was detected in the bladder (10/43) and tonsils (3/43). No HEV-positive loin samples
139 were observed [25]. In another study, detection of HEV RNA was investigated in the pork
140 production chain at several steps: production (carcass dissection and liver removal),
141 processing or point of sale. At the production phase (slaughterhouse), HEV RNA was found
142 in liver, bile or fecal samples but also in pork lingual muscle with an estimated prevalence of
143 HEV RNA of 2.7% (n=112) [26]. At all steps, production, processing plant or point of sale,
144 HEV RNA was amplified from workers' hands and gloves and working surfaces, suggesting
145 that cross contamination may occur [26]. Thus, further studies are needed to determine HEV
146 distribution in pork organs during slaughtering.

147 HEV can persist in the farm environment [27] but survival parameters are mainly unknown.
148 Experiments performed with HEV in cell culture supernatant indicate that infectious HEV can
149 be detected after one month storage at room temperature and after more than 2 months
150 storage at 4°C [28]. The virus is mainly excreted fecally in pigs, leading to an accumulation of
151 HEV in the environment of infected livestock. Thus, both contact between individuals and
152 environmental exposure can play a role in HEV transmission. This was confirmed during the

153 controlled inoculations of animals with HEV and transmission to contact pigs [29, 30].
154 Experimentally, a minimum load of 10^6 copies of HEV RNA/g appears necessary to infect
155 pigs per os and cause excretion of the virus and transmission to their congeners [29]. A
156 mathematical model, taking into account three possible transmission pathways: direct or
157 indirect contacts between the animals or the role played by the environment, was used to
158 quantify HEV transmission within herds. The results obtained show that transmission by
159 direct contact can be a factor of persistence of HEV in pig herds, however this way of
160 transmission alone does not explain the high prevalences observed in herds. The major
161 factor identified as playing a role in the spread and maintenance of infection in the population
162 is the accumulation of the virus in the animal environment, leading to a continuous oro-fecal
163 contamination process [29].

164 Environmental contaminations with HEV can also be observed in the vicinities of herds or
165 slaughterhouse. HEV RNA was detected by nested RT-PCR in 32/ 452 samples from both
166 inside and outside farm buildings, on trucks, and other objects sampled in the
167 slaughterhouse yard, such as on a utility vehicle. According to the results of this study, the
168 movements of trucks and utility vehicles might play an important role in HEV dissemination
169 on a slaughterhouse site and throughout an entire network [31].

170 **Risk factors associated with HEV infection within pig farms**

171 A possible way to reduce human exposure through consumption of infected meat is to
172 reduce the number of infected animals at slaughterhouse. To reach this goal, few studies
173 have investigated factors associated with a high HEV prevalence at herd level. A
174 retrospective survey was conducted in France in 90 farms previously selected for a
175 prevalence survey of HEV performed at slaughterhouse [32]. A high risk of HEV infection of
176 pork livers was associated with the early slaughtering of young animal, the genetic line of the
177 female breeding stock, lack of biosecurity measures and the use of drinking water from a
178 nearby source. High seroprevalences at the end of the rearing period were associated with

179 excessive mixtures of post-weaning animals and low conditions of hygiene [33]. Critical
180 points to consider include interactions between husbandry conditions, loss of passive
181 immunity and hygiene.

182 In a study performed in six European countries (Czech Republic, Italy, the Netherlands,
183 Spain, Portugal and the United Kingdom), HEV prevalence was determined in different types
184 of herds: weaners, growers and fatteners. HEV RNA prevalence in pig fecal samples was
185 high in all kinds of settings: weaners 8-30%, growers 20-44% and fatteners/finishers 8-73%.
186 These data suggest that HEV positive fattener herds are at risk of delivering HEV positive
187 pigs at slaughterhouse [34]. This risk can arise both from livers still infected with HEV or
188 faecal cross-contaminations of carcasses. Analysis of livestock management was not
189 performed to identify risk factors associated with positivity. Thus, further studies are needed
190 to define measures to prevent such high HEV presence at the fattening stage.

191 Another study has focused on HEV seroprevalence in pigs from different farming systems in
192 The Netherlands, including conventional, free-range, and organic farms. HEV-specific
193 antibodies were detected in samples from all conventional, free-range and organic pig farms,
194 indicating equal probability of introducing HEV for the different farming types. The estimated
195 average within-herd seroprevalence was significantly higher for pigs from organic farms
196 (89%) than for pigs from conventional farms (72%, $P = 0.04$) and close to significant for pigs
197 from free-range farms (76%, $P = 0.06$) [35]. It seems that a higher probability of HEV
198 infection is present in organic farm due to possible increase in animal contacts or longer
199 exposure through environmental contamination [35]. It would be interesting to get information
200 on the age of the pig sampled within each herd and the excretion profile of HEV in free-range
201 and organic farms to evaluate the probability that these rearing systems deliver HEV positive
202 pigs at slaughterhouse.

203 Another concern is the presence of other pig pathogens that may modulate the time-course
204 of natural HEV infections within herds. Frequent co-circulation of HEV with

205 immunomodulatory viruses such as Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus
206 (PRRSV) or Porcine circovirus-2 (PCV2), may influence HEV pathogenesis. A fatal disease
207 associated with co-infection of HEV and PCV2 was recently described in piglets. General
208 hyperthermia, haemorrhage, inflammatory cell infiltration and necrosis were observed in the
209 tissues of dead animals [36]. In addition, experimental co-infection of pig with HEV and
210 PRRSV demonstrated increased and prolonged excretion of HEV in co-infected pigs. This
211 co-infection led to an increased length of HEV excretion estimated at 49 days compared to 9
212 days during infection with HEV alone. An exacerbated transmission, on average 4 times
213 greater than in a single HEV infection, was also observed [37]. Multiple infections of pig by
214 pathogens must be taken into account to prevent HEV propagation or long time excretion
215 that may influence the presence of HEV at the time of slaughtering.

216 HEV infections have little impact on animal health, as the animals have no obvious
217 symptoms; as a result, there is no surveillance or reporting of infected herds. The level of
218 enzootic HEV infections is suspected to be extremely high. The persistence of the virus in
219 farms is not yet well explained, but its resistance in the environment, the possibility of partial
220 protection conferred by antibodies or the chronic infection of certain animals are factors that
221 could make its eradication difficult. Drastic internal biosecurity measures as well as the
222 control of undercurrent pathogens that may have an immunomodulatory action such as
223 PRRSV would seem to be effective in limiting the spread of HEV to the porcine population.
224 The effect of HEV vaccine prophylaxis in animals has been modelled and may reduce the
225 number of HEV-positive animals at slaughter [38] and thus reduce human exposure via food
226 consumption.

227 Even if control measures, such as good herd practice and vaccination against HEV, would
228 lead to a reduced level of enzootic HEV in herds, maintaining HEV “low or free” herds would
229 have to take into account the large presence of HEV in wildlife and in particular in wild boars.

230

231 **II.2 Wild fauna**

232 Substantial evidences have been gathered in the past 20 years indicating that wild boar is
233 an important reservoir of HEV. It is not surprising that wild boars (*Sus scrofa*) are also
234 susceptible to HEV as they are closely related to domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*). The
235 first report suggesting that HEV can also infect wild boars comes from the detection of HEV
236 antibodies in wild-caught pigs in Australia at the end of the 1990s [39]. A few years later, the
237 first partial sequences of an HEV isolate originating from a wild boar were obtained in Japan
238 [40]. Comparison of ORF2 partial sequences (298 nucleotides) showed that this strain was
239 closely related to HEV-3 isolates previously found in Japanese patients and farm pigs [40]. The
240 first full-genome HEV sequences recovered from a wild boar were published a few months
241 later. Comparison with complete or near-complete HEV isolates showed that this strain
242 belongs to HEV-3 and shares 99.7% nucleotide identity with other deer and human isolates
243 [41]. To date, most of the HEV strains detected in wild boars belong to HEV-3. Several variants
244 assigned to HEV-4 have also been found in wild boars in Japan [4, 42, 43]. In addition, HEV
245 isolates (JBOAR135-Shiz09, wbJOY_06 and wbJNN_13) that have been only detected in wild
246 boars have been characterised [42, 43]. These HEV strains have been assigned to 2 novel
247 genotypes: HEV-5 (JBOAR135-Shiz09) and HEV-6 (wbJOY_06 and wbJNN_13). These 2
248 genotypes share less than 80% nucleotide identity with HEV-1 to -4 [42, 43]. The wbJNN_13
249 and wbJOY_06 isolates are 80.4% similar over their entire genome [42] and it has been
250 suggested that they belong to 2 distinct subtypes within the HEV-6 genotype [44]. Up to now,
251 no human case has been associated with these two genotypes, thus their zoonotic potential is
252 not known.

253

254 Very few data are available on clinical signs caused by HEV in wild boar. In one study, no
255 difference was found between the biometric characteristics (body length and weight) of HEV-
256 infected and non-infected wild boars [45]. In another report, no clinical manifestations were
257 observed in a viremic male wild boar negative for anti-HEV IgG [40]. Experimental infection of

258 3-month old wild boars with a wild boar HEV-3 strain via the intravenous route or by contact
259 caused subtle clinical symptoms such as reduced feed intake and mild diarrhoea that were
260 concomitant with increased bile acids (BA), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-
261 glutamyl transferase (γ GT) [46]. Mild lymphoplasmacytic hepatitis was also recorded. Higher
262 viral loads of HEV were found in the faeces of the infected wild boars in comparison to the
263 faeces of miniature pigs infected under the same conditions [46]. HEV RNA was also detected
264 in the liver, gall bladder, small and large intestine and spleen of the infected wild boars. Chronic
265 infections in 2 wild boar naturally infected with HEV-3 have also been reported [47]. In these 2
266 animals, viraemia and/or viral shedding in the faeces were detected for 12 to 16 weeks
267 although high titres of anti-HEV antibodies were simultaneously present in their serum. No
268 clinical signs or histopathological lesions evocative of hepatitis were recorded and HEV RNA
269 was not detected in the liver or other tissues of the chronically-infected wild boars [47].

270

271 Several studies have been undertaken, mainly in Japan and Europe, to determine the
272 prevalence of HEV antibodies and/or RNA in wild boar (Supplemental Table 1).
273 Seroprevalences ranging from 1.6% to 41.6% and from 4.9% to 57.4% were found in Japan
274 and Europe, respectively. RNA prevalences of up to 10.3% in Japan and up to 68.2% in Europe
275 were also reported. These data clearly show that HEV infection is widely present in wild boars
276 in Japan and in Europe and that wild swine likely represent a reservoir of HEV in these areas.
277 Several factors such as the geographical location [4, 14, 42, 43, 45, 48–54], the year of
278 sampling [4, 42, 48, 55, 56], the wild boar density [53, 57, 58] and the managing conditions [48,
279 59] can impact HEV prevalence. A higher HEV seroprevalence is usually found in adults and
280 subadults than in juvenile [14, 48, 49, 52, 55, 60, 61]. No difference was observed between male
281 and female wild boar [43, 45, 48, 58, 59, 61–64]. The reported HEV RNA prevalences
282 (Supplemental Table 1) can also vary according to the wild boar sample specimen used as
283 HEV RNA seems to be more frequently detected in bile followed by liver and serum [50], as
284 found for domestic pigs [65].

285 Comparisons of data obtained using the same serological assay have highlighted lower
286 HEV seroprevalences in wild boars than in domestic pigs sampled in the same region [14, 54,
287 55, 60, 64]. In addition, HEV RNA can be found in wild boars in all age groups including animals
288 older than 2 years [40, 45, 48, 52, 58, 59, 61, 63, 66–69] whereas in domestic pigs, it is more
289 often detected in young animals (2 to 6 months) [70–73]. These data suggest that HEV
290 circulates at lower rates and more progressively in wild boars than in pigs. The fact that
291 domestic pigs are reared under extensive conditions and that wild boars are free-ranging and
292 gather at lower densities could explain these differences. It is also possible that in wild boars,
293 a weak or short-lasting protective immunity against HEV lead to chronic infections or re-
294 infections of older animals.

295 HEV has also been detected in deer. Anti-HEV antibodies and/or HEV RNA have been
296 found in several deer species such as red deer, roe deer, sika deer, fallow deer and white-
297 tailed deer in America (Mexico and Canada), Asia (China, Japan) and Europe (Czech
298 Republic, Belgium, France, Germany, Hungary, Italy, The Netherlands, Spain, Sweden) [40,
299 56, 60, 66, 68, 74–83]. Anti-HEV antibodies were found in up to 62% (89/142) of white-tailed
300 deer sampled in Mexico [74] but HEV seroprevalences ranging from 0 to 14% are more
301 commonly found in several deer species. To date, all the HEV sequences found in deer belong
302 to HEV-3 [41, 56, 60, 78, 79, 82–84] but very few sequences are available. All these studies
303 suggest that HEV circulates in deer. However, lower HEV seroprevalences and HEV RNA
304 detection rates are frequently found in deer compared to wild boars sampled within the same
305 geographical region [40, 56, 60, 77, 81]. A recent study has also shown that lower viral loads
306 are consistently found in livers from deer in comparison to wild boar [56]. This data suggest
307 that deer are not a true reservoir of HEV but are infected accidentally by sharing the same
308 habitat as wild boar. Wild swine therefore likely represent a source of spillover HEV infections
309 for other wild animals and subsequently for humans (Figure 2).

310

311 **II.3 HEV transmission between domestic and wild suidae**

312 Experimental infections have shown that HEV can cross the domestic pig-wild boar barrier.
313 Oral and intravenous inoculation of wild boar HEV strains to miniature or domestic pigs can
314 lead to viremia, excretion of HEV in the faeces and seroconversion [22, 46]. In addition, wild
315 boars naturally infected or inoculated intravenously with HEV are able to transmit the virus by
316 contact to domestic or miniature pigs [46, 47]. These data strongly suggest that transmission
317 via the faecal-oral route between domestic and wild swine is possible and can occur naturally
318 when pigs and wild boars are reared in close contact (Figure 2). Such interactions between
319 domestic pigs and wild boars are common as some breeds of domestic pigs are raised
320 outdoors in semi-open or open spaces in close contact with wildlife. These managing
321 conditions exist worldwide, including in areas such as Corsica and Tuscany where a high HEV
322 seroprevalence is found among wild boars [55, 61]. It is also important to consider the role of
323 hybrid pigs in the epidemiology of HEV infection in swine. Wild boar can interbreed with
324 domestic pigs, resulting in the birth of feral hybrid pigs that circulate freely but have a behaviour
325 that is more similar to domestic pigs (diurnal activity, more frequent and larger litter). These
326 hybrid pigs are more likely to interact with domestic pigs and to gather at higher densities than
327 wild boars. A study has shown that in Corsica, a high percentage of hybrid pigs (43.5%) has
328 anti-HEV antibodies. This seroprevalence is lower than in domestic pigs (88%) but higher than
329 in pure wild boars (26%) [55]. Hybrids pigs could then play an intermediate role in the
330 transmission of HEV between domestic and wild swine.

331 Several studies have identified pig and wild boar strains of HEV-3 and HEV-4 sharing 90%
332 to 98% homology based on entire/almost entire [58, 69] or partial [59, 45, 55, 63, 79, 66, 67, 85]
333 sequences. For example, the comparison of full-length sequences has highlighted an identity
334 of 96.9% between the sequences of a wild boar HEV-3 strain identified in Germany and a
335 Mongolian pig strain [58]. A homology of 97.5% (partial ORF2 sequence) has been found
336 between a wild boar and a domestic pig HEV-3 strain both isolated in Corsica [85]. Two wild
337 boar HEV-3 strains isolated in Hungary were shown to be closer to pig strains than to each

338 other (97-98% identity based on partial ORF2 sequences) [79]. In addition, a molecular
339 evolutionary analysis has suggested that a subtype of HEV-3 has become endemic in Japan
340 after the importation of infected pigs from Europe in the 1960s and was then transmitted from
341 pigs to wild boars [86]. All these data suggest that dynamic exchanges of HEV-3 and HEV-4
342 between domestic pigs and wild boars have occurred. However, direct transmission of HEV
343 between domestic pigs and wild boar in natural settings will only be proven by the identification
344 of identical or near-identical (higher than 99%) strains in both animals. Moreover, the
345 transmission potential of HEV-5 and HEV-6 between domestic and wild swine remains
346 unknown as to date, these genotypes have only been detected in wild boars and attempt of
347 experimental transmission of these 2 genotypes to pigs has not been reported yet.

348 As of now, it is still unclear whether cross-infection of HEV occurs between domestic and
349 wild swine and contributes to the prevalence and dynamics of HEV infection in the swine
350 population. Many studies need to be undertaken in order to better understand the implication
351 of the wild boar reservoir in the epidemiology of HEV and its importance as a source of
352 infection. It would be critical for example to determine the origin of HEV-5 and HEV-6 and
353 whether these 2 genotypes are able to infect and cause diseases in domestic pigs, humans
354 and other wild species such as deer. Other routes of HEV transmission between pigs and wild
355 boars such as the contamination of surface water and the environment by wild boar droppings
356 should also be considered and further explored (Figure 2). In addition, more studies are
357 needed to determine whether chronic or recurrent HEV infections are common in wild boars
358 as long-term shedding could facilitate the persistence of the virus in the wild boar population
359 and environment, thus increasing the risk of transmission to nearby outdoor pig breeding and
360 other wild species such as deer. It is still unclear whether HEV can be transmitted between
361 swine and deer. Evidence of transmission between these species are rare and rely mainly on
362 the identification of near-identical sequences in both species [41, 56].

363

364 **III- HEV in food products from Suidae and deer**

365 Many reports describe the detection of HEV RNA in animal liver intended for human
366 consumption and the data are summarized in Table 1. This includes reports from many
367 European countries, but also from North, Central and South America as well as from Africa
368 and Asia. As different methods with different sensitivities have been applied for analysis of the
369 samples in these studies, a direct comparison of detection rates and genome concentrations
370 is not possible. Nevertheless, the data may give some indications on the distribution of HEV in
371 different types of food in the distinct geographical areas. The reported detection rates in pig
372 liver ranged from 0 % to 21 %; however, the majority of studies report detection rates between
373 2 % and 8 %. Using quantitative analysis, HEV genome concentrations between 20 and 10^7
374 RNA copies/g are described. For wild boar liver, studies from Europe and Japan are available,
375 reporting detection rates between 2 % and 38 %. The HEV genome concentrations were
376 between 40 and 10^8 RNA copies/g. Investigations on liver samples from other animal species
377 intended for human consumption are mainly available for several deer species. This includes
378 successful HEV detection in red deer (detection rates 2 %- 10 %) and roe deer (detection rates
379 0 %- 22 %), whereas investigations of liver samples from fallow deer, Yezo deer and sika deer
380 remained mostly negative so far. The HEV RNA amounts in liver of deer ranged between 12
381 and 2000 copies/g. Therefore, livers of pigs and wild boars have to be considered at high risk
382 of containing the HEV genome and some of these livers can contain high viral genome
383 amounts. Deer liver can also contain HEV RNA; however, the prevalence as well as the
384 amount of viral genome in deer liver samples is markedly lower than for pigs and wild boars.

385 Some studies have investigated the presence of HEV RNA in muscle and meat samples. The
386 detection rates ranged from 0 % to 6 % for pig muscle, from 0 % to 12 % for wild boar muscle,
387 and from 0% to 5% for deer muscle. Only very few quantitative data are available, which report
388 HEV genome amounts between 500 and 4000 copies/g in wild boar and deer muscles. In
389 conclusion, a lower percentage of muscle samples of pigs, wild boars and deer, which
390 nevertheless can reach up to 12%, can contain HEV RNA, in comparable low concentrations.

391 Meat products have also been analyzed for the presence of the HEV genome. Almost all of
392 these studies have investigated products from pigs. Consistent high detection rates between
393 16 % and 47 % have been described for sausages or meat products containing pig liver [87,
394 88]. The observed detection rates, which are higher than those determined for pig livers, are
395 mainly explained by the use of livers from a high number of animals for the production of
396 sausages and the resulting mixing effect [89, 90]. The number of HEV genome in the liver-
397 containing products ranged from 4 to 2×10^6 copies/g [91]. HEV RNA was also found in
398 sausages containing no liver (and in sausages where the presence or absence of liver was not
399 known), but with more varying detection rates ranging from 0 % to 20% [26, 92].

400 Detection of HEV RNA does not necessarily indicate the presence of infectious virus.
401 Therefore, attempts have been made to demonstrate the infectivity of food items previously
402 tested positive for HEV RNA. However, the measurement of HEV infectivity is difficult due to
403 the lack of efficient cell culture models for HEV propagation [93]. Therefore, only a few studies
404 are available investigating the presence of infectious HEV in organ or meat products from
405 animals intended for human consumption. An A549 cell culture system was successfully used
406 to demonstrate infectivity of HEV present in pig liver sold at retail in Japan [94]. Using a 3D cell
407 culture model, HEV was isolated from porcine liver sausages from retail in France thus
408 demonstrating the presence of infectious virus [95]. The presence of infectious HEV in
409 commercially sold pig livers was also demonstrated by experimental inoculation of sample
410 homogenates into pigs [96–98].

411 Stronger evidence for transmission of HEV by ingestion of food of animal origin comes from
412 case reports and outbreak investigations. Colson et al. (2010) reported an outbreak of hepatitis
413 E involving 7 persons in France, who ate liver sausages named figatelli [99]. Closely related
414 HEV sequences were detected in the patients and local sausage samples. A similar case
415 where identical HEV sequences were identified in a French hepatitis E patient and the leftover
416 figatellu has been reported later [100]. In another outbreak that occurred on a French coastal

417 island, 3 persons diseased with hepatitis E [101]. The epidemiological investigations pointed
418 towards a spit-roasted piglet as the infection source. Identical HEV sequences were detected
419 in the patients and in a liquid manure sample from the farm where the piglet was born.
420 Investigation of an acute hepatitis E case in an immunodeficient patient identified pork meat
421 as the source of infection by sequence comparison between HEV strains detected in the
422 patient and in the meat [102]. Two case reports from Japan identified grilled meat from wild
423 boar as the source of infection by demonstrating identical HEV sequences in the patient and
424 the meat sample [103, 104]. Similarly, a wild boar liver was shown to contain HEV sequences
425 that were identical to the ones found in two patients from Japan who ate the liver [105]. Four
426 hepatitis E cases in Japan could also be linked to the consumption of meat from sika deer as
427 identical HEV sequences were identified in the patients and the leftover meat [84].

428

429 **IV-Contact exposure with suidae**

430 Transmission of HEV via contact with pigs or wild boars has been repeatedly suggested in
431 Europe, Asia, Africa and Southern America. Most evidence for this transmission pathway
432 comes from serological studies analyzing persons with occupational contact with animals
433 compared to a control group (Supplemental Table 2). For the investigation of HEV transmission
434 from pigs, the exposed groups usually included pig farmers, slaughterers, butchers and swine
435 veterinarians. In most of the studies, these groups show a higher HEV-specific antibody
436 prevalence as compared to non-exposed persons. However, a direct comparison of the data
437 from the different studies is not possible as different assays were used. In addition, factors
438 other than the contact with pigs could differ between the exposed and non-exposed groups
439 (e.g. their nutritional behaviour) and may have influenced the results. Some of the studies
440 found no significant differences in the seroprevalences between exposed and non-exposed
441 people [106, 107]. However, as the majority of the studies demonstrate higher prevalences in

442 persons who had been in contact with pigs, HEV transmission through this pathway seems to
443 be common.

444 To investigate the transmission pathway of HEV from wild animals to humans, a number of
445 serological studies with forest workers and hunters has been conducted (Table 3). Two studies
446 investigating forest workers in Germany and France found higher HEV-specific antibody
447 prevalences in these groups compared to the control groups [108, 109]. A study performed in
448 Japan has identified a markedly higher seroprevalence in wild boar hunters (25.3%) as
449 compared to a group of residents (5.5%) from the same geographical area [110]. In a similar
450 study carried out in Germany, the HEV seroprevalence found in hunters was only slightly
451 increased in comparison to the general German population [111]. However, a more detailed
452 analysis of the data revealed that hunters who frequently used gloves during disemboweling
453 of wild boars, had a significantly lower anti-HEV antibody prevalence as compared to hunters
454 using gloves never or infrequently. The data of these studies indicate that transmission of HEV
455 by contact with wild animals and especially with wild boars is likely.

456 In contrast to numerous studies describing the presence of antibody as indicator of virus
457 transmission from pigs or wild boars to humans, evidence for induction of disease after
458 transmission of HEV by contact is rare. Renou et al. (2007) have described a case of acute
459 hepatitis E in a patient in France who kept a pet pig and had frequent contact with it and with
460 its excretions [112]. By comparison of HEV strains detected in the patient and in the pig,
461 nucleotide sequence identities between 92% and 98% were determined for different genome
462 regions. Although the strains were not identical, both strains were more closely related to each
463 other than to other HEV strains found in the same geographical region. The authors suspected
464 that a distinct (minor) quasispecies of HEV from the pig was transmitted to the patient by direct
465 contact or contact with the excretions. HEV transmission has also occurred during the surgical
466 training of a surgeon on pigs, through contact with infected inner organs [113]. Direct
467 contamination of a slaughterhouse worker has been reported as well, confirming that hepatitis

468 E can be an occupationally acquired illness by means of the manipulation of infected organs
469 from pigs [114].

470

471 **Conclusion**

472 In the past decade, many studies have provided evidence that Suidae are the main reservoir
473 of zoonotic HEV and that the virus is endemic in pig farms worldwide. A few studies have
474 started to identify risk factors associated with HEV infection in pig herds. Nevertheless, many
475 factors remain undetermined. For example, the influence of swine genetic backgrounds on the
476 host susceptibility to HEV infection is still unknown. It is also unclear whether chronic infections
477 can occur in swine and whether chronicity is associated with co-infections with other common
478 pig pathogens or certain host factors linked to immunity. More efforts are then needed to
479 determine more thoroughly the parameters involved in the accumulation and persistence of
480 HEV in the breeding environment. Studies on the efficiency of disinfection regimes and
481 vaccination to restrict HEV spread in the pig population would also be useful. Such
482 investigations will help to understand the dynamics of HEV infection in pig herds and to identify
483 control measures able to limit the appearance and persistence of the virus in breeding farms.
484 A better characterization of the role of wildlife as a persistent source of contamination for the
485 environment, other wild animals like deer, and pig herds is also required. In addition, the
486 zoonotic potential of wild boar strains HEV-5 and HEV-6 need to be assessed experimentally
487 to determine whether domestic swine and potentially humans are susceptible to these strains
488 and might develop diseases. Prevention of zoonotic HEV infection will also benefit from a better
489 monitoring of the presence of infectious HEV in pork-derived foods. In the past few years, cell
490 culture models have been developed that allow an efficient replication of HEV. Such systems
491 should be exploited to determine which meat products (produced or not with liver) are at risk
492 of containing infectious viruses. Better recommendations could then be provided to consumers
493 regarding handling and cooking of such foods.

494 **Declarations**

495 **Competing interests**

496 None of the authors have any competing interests in the manuscript.

497 **Figure legends**

498 **Figure 1:** Phylogenetic tree of HEV sequences within the species *Orthohepevirus A*. Forty-
499 one complete genomes or complete coding reference sequences available in the GenBank
500 database and representative of each genotype sequences, as published by Smith et al
501 (Smith et al 2016), were aligned using Muscle (MEGA6, www.megasoftware.net). The tree
502 was obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances
503 estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach (MEGA6,
504 www.megasoftware.net). The tree is drawn to scale, with branch lengths proportional to the
505 number of substitutions per site. HEV genotypes are indicated for each group: HEV-1 to
506 HEV-7 (HEV-3ra: rabbit subtype of HEV-3). Silhouettes of human or animal species indicate
507 natural hosts. Human HEV are in green and zoonotic HEV in purple. HEV5 and HEV-6 are in
508 striped purple since their zoonotic potential remains to be proven.

509 **Figure 2:** Transmission and exposure routes of zoonotic HEV to humans. Green arrow:
510 proven transmission or exposure route; black arrow: suspected transmission or exposure
511 route. The thickness of the arrows is proportional to the contribution of the species to the
512 transmission or exposure route.

513 **References**

- 514 1. Pérez-Gracia MT, Suay-García B, Mateos-Lindemann ML (2017) Hepatitis E and pregnancy:
515 current state. *Rev Med Virol*. doi: 10.1002/rmv.1929
- 516 2. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, et al (2011) Factors associated with chronic hepatitis in
517 patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants.
518 *Gastroenterology* 140:1481–1489. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.050
- 519 3. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N (2016) Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification,
520 Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*. doi: 10.3390/v8100270
- 521 4. Sato Y, Sato H, Naka K, et al (2011) A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in
522 wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized
523 genotypes. *Arch Virol* 156:1345–1358. doi: 10.1007/s00705-011-0988-x
- 524 5. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al (2014) New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle
525 East. *Emerg Infect Dis* 20:1044–1048. doi: 10.3201/eid2006.140140
- 526 6. Lee G-H, Tan B-H, Chi-Yuan Teo E, et al (2016) Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus
527 in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk.
528 *Gastroenterology* 150:355–357.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048
- 529 7. Thiry D, Mauroy A, Pavio N, et al (2017) Hepatitis E Virus and Related Viruses in Animals.
530 *Transbound Emerg Dis* 64:37–52. doi: 10.1111/tbed.12351
- 531 8. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al (1997) A novel virus in swine is closely related to the
532 human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9860–9865.
- 533 9. Liu X, Saito M, Sayama Y, et al (2015) Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis
534 E virus in household-raised pig population in the Philippines. *BMC Vet Res* 11:11. doi:
535 10.1186/s12917-015-0322-z
- 536 10. De la Caridad Montalvo Villalba M, Owot JC, Benedito E-C, et al (2013) Hepatitis E virus
537 genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*
538 14:335–339. doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.022
- 539 11. Merino-Ramos T, Martín-Acebes MA, Casal J, et al (2016) Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV)
540 Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol* 8:156–159. doi: 10.1007/s12560-016-9231-y
- 541 12. Owolodun OA, Gerber PF, Giménez-Lirola LG, et al (2014) First report of hepatitis E virus
542 circulation in domestic pigs in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 91:699–704. doi: 10.4269/ajtmh.14-
543 0144
- 544 13. Aniță A, Gorgan L, Aniță D, et al (2014) Evidence of hepatitis E infection in swine and humans in
545 the East Region of Romania. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 29:232–237. doi:
546 10.1016/j.ijid.2014.10.018
- 547 14. Burri C, Vial F, Ryser-Degiorgis M-P, et al (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic
548 pigs and wild boars in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 61:537–544. doi: 10.1111/zph.12103

- 549 15. Wacheck S, Werres C, Mohn U, et al (2012) Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in
550 serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog*
551 *Dis* 9:655–660. doi: 10.1089/fpd.2012.1141
- 552 16. Feng R, Zhao C, Li M, et al (2011) Infection dynamics of hepatitis E virus in naturally infected
553 pigs in a Chinese farrow-to-finish farm. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*
554 11:1727–1731. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.009
- 555 17. Kantala T, Heinonen M, Oristo S, et al (2015) Hepatitis E virus in young pigs in Finland and
556 characterization of the isolated partial genomic sequences of genotype 3 HEV. *Foodborne*
557 *Pathog Dis* 12:253–260. doi: 10.1089/fpd.2014.1841
- 558 18. McCreary C, Martelli F, Grierson S, et al (2008) Excretion of hepatitis E virus by pigs of different
559 ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec* 163:261–265.
- 560 19. Pavio N, Meng X-J, Renou C (2010) Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks.
561 *Vet Res* 41:46. doi: 10.1051/vetres/2010018
- 562 20. Casas M, Cortés R, Pina S, et al (2011) Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish
563 farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol* 148:27–34. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.010
- 564 21. Grierson S, Heaney J, Cheney T, et al (2015) Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Pigs at
565 the Time of Slaughter, United Kingdom, 2013. *Emerg Infect Dis* 21:1396–1401. doi:
566 10.3201/eid2108.141995
- 567 22. Thiry D, Rose N, Mauroy A, et al (2016) Susceptibility of Pigs to Zoonotic Hepatitis E Virus
568 Genotype 3 Isolated from a Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12550
- 569 23. Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CBEM, et al (2009) The course of hepatitis E virus infection in
570 pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5:7. doi: 10.1186/1746-
571 6148-5-7
- 572 24. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, et al (2001) Evidence of extrahepatic sites of
573 replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39:3040–3046.
- 574 25. Leblanc D, Poitras E, Gagné M-J, et al (2010) Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at
575 slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol* 139:206–209. doi:
576 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.016
- 577 26. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, et al (2012) Hepatitis E virus in pork production chain
578 in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* 18:1282–1289. doi:
579 10.3201/eid1808.111783
- 580 27. Kasorndorkbua C, Opriessnig T, Huang FF, et al (2005) Infectious swine hepatitis E virus is
581 present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water
582 contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* 71:7831–7837. doi: 10.1128/AEM.71.12.7831-
583 7837.2005
- 584 28. Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J (2016) Thermal stability of hepatitis E virus estimated by
585 a cell culture method. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.00951-16

- 586 29. Andraud M, Dumarest M, Cariolet R, et al (2013) Direct contact and environmental
587 contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet Res* 44:102. doi:
588 10.1186/1297-9716-44-102
- 589 30. Bouwknecht M, Teunis PFM, Frankena K, et al (2011) Estimation of the likelihood of fecal-oral
590 HEV transmission among pigs. *Risk Anal Off Publ Soc Risk Anal* 31:940–950. doi: 10.1111/j.1539-
591 6924.2010.01546.x
- 592 31. Nantel-Fortier N, Letellier A, Lachapelle V, et al (2016) Detection and Phylogenetic Analysis of
593 the Hepatitis E Virus in a Canadian Swine Production Network. *Food Environ Virol* 8:296–304.
594 doi: 10.1007/s12560-016-9252-6
- 595 32. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, et al (2011) High prevalence of Hepatitis E virus in French
596 domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34:419–427. doi:
597 10.1016/j.cimid.2011.07.003
- 598 33. Walachowski S, Dorenlor V, Lefevre J, et al (2014) Risk factors associated with the presence of
599 hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90
600 swine farms in France. *Epidemiol Infect* 142:1934–1944. doi: 10.1017/S0950268813003063
- 601 34. Berto A, Backer JA, Mesquita JR, et al (2012) Prevalence and transmission of hepatitis E virus in
602 domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* 5:190. doi:
603 10.1186/1756-0500-5-190
- 604 35. Rutjes SA, Bouwknecht M, van der Giessen JW, et al (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus in
605 pigs from different farming systems in The Netherlands. *J Food Prot* 77:640–642. doi:
606 10.4315/0362-028X.JFP-13-302
- 607 36. Yang Y, Shi R, She R, et al (2015) Fatal disease associated with Swine Hepatitis E virus and
608 Porcine circovirus 2 co-infection in four weaned pigs in China. *BMC Vet Res* 11:77. doi:
609 10.1186/s12917-015-0375-z
- 610 37. Salines M, Barnaud E, Andraud M, et al (2015) Hepatitis E virus chronic infection of swine co-
611 infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res* 46:55. doi:
612 10.1186/s13567-015-0207-y
- 613 38. Backer JA, Berto A, McCreary C, et al (2012) Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs:
614 estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics* 4:86–92. doi:
615 10.1016/j.epidem.2012.02.002
- 616 39. Chandler JD, Riddell MA, Li F, et al (1999) Serological evidence for swine hepatitis E virus
617 infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 68:95–105.
- 618 40. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, et al (2004) Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in
619 Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a Genotype 3 HEV from a Boar in Japan. *J Clin*
620 *Microbiol* 42:5371–5374. doi: 10.1128/JCM.42.11.5371-5374.2004
- 621 41. Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S (2004) Complete or near-complete nucleotide
622 sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients
623 who ate the deer. *Virology* 330:501–505. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.006

- 624 42. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, et al (2014) Molecular characterization of a novel
625 hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from
626 the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 180:59–69. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.014
- 627 43. Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, et al (2014) High prevalence of hepatitis E virus in wild boar (*Sus*
628 *scrofa*) in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J Wildl Dis* 50:378–383. doi: 10.7589/2013-06-144
- 629 44. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, et al (2016) Proposed reference sequences for hepatitis E virus
630 subtypes. *J Gen Virol* 97:537–542. doi: 10.1099/jgv.0.000393
- 631 45. Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, et al (2008) Detection of hepatitis E virus (HEV) in a
632 demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 126:74–
633 81. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.004
- 634 46. Schlosser J, Eiden M, Vina-Rodriguez A, et al (2014) Natural and experimental hepatitis E virus
635 genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet Res* 45:121.
636 doi: 10.1186/s13567-014-0121-8
- 637 47. Schlosser J, Vina-Rodriguez A, Fast C, et al (2015) Chronically infected wild boar can transmit
638 genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. *Vet Microbiol* 180:15–21. doi:
639 10.1016/j.vetmic.2015.08.022
- 640 48. Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, et al (2007) Prevalence of hepatitis E virus among wild
641 boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 37:214–220. doi:
642 10.1111/j.1872-034X.2007.00030.x
- 643 49. Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, et al (2012) High hepatitis E virus seroprevalence in
644 forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol* 50:2888–2893. doi:
645 10.1128/JCM.00989-12
- 646 50. Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, et al (2009) High HEV presence in four different wild boar
647 populations in East and West Germany. *Vet Microbiol* 139:270–278. doi:
648 10.1016/j.vetmic.2009.06.032
- 649 51. Martinelli N, Pavoni E, Filogari D, et al (2015) Hepatitis E virus in wild boar in the central
650 northern part of Italy. *Transbound Emerg Dis* 62:217–222. doi: 10.1111/tbed.12118
- 651 52. Caruso C, Modesto P, Bertolini S, et al (2015) Serological and virological survey of hepatitis E
652 virus in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f. *Arch*
653 *Virol* 160:153–160. doi: 10.1007/s00705-014-2246-5
- 654 53. Larska M, Krzysiak MK, Jabłoński A, et al (2015) Hepatitis E virus antibody prevalence in wildlife
655 in Poland. *Zoonoses Public Health* 62:105–110. doi: 10.1111/zph.12113
- 656 54. Ivanova A, Tefanova V, Reshetnjak I, et al (2015) Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars,
657 Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food Environ Virol* 7:403–412. doi: 10.1007/s12560-
658 015-9210-8
- 659 55. Jori F, Laval M, Maestrini O, et al (2016) Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral
660 Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. *Viruses*. doi: 10.3390/v8080236

- 661 56. Anheyer-Behmenburg HE, Szabo K, Schotte U, et al (2017) Hepatitis E Virus in Wild Boars and
662 Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013–2015. *Emerg Infect Dis* 23:130–133.
663 doi: 10.3201/eid2301.161169
- 664 57. Boadella M, Ruiz-Fons JF, Vicente J, et al (2012) Seroprevalence evolution of selected
665 pathogens in Iberian wild boar. *Transbound Emerg Dis* 59:395–404. doi: 10.1111/j.1865-
666 1682.2011.01285.x
- 667 58. Schielke A, Sachs K, Lierz M, et al (2009) Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and
668 urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J*
669 6:58. doi: 10.1186/1743-422X-6-58
- 670 59. De Deus N, Peralta B, Pina S, et al (2008) Epidemiological study of hepatitis E virus infection in
671 European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* 129:163–170. doi:
672 10.1016/j.vetmic.2007.11.002
- 673 60. Thiry D, Mauroy A, Saegerman C, et al (2015) Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of
674 Hepatitis E Virus. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12435
- 675 61. Mazzei M, Nardini R, Verin R, et al (2015) Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in
676 wild boar (*Sus scrofa*) in Central Italy. *New Microbes New Infect* 7:41–47. doi:
677 10.1016/j.nmni.2015.05.008
- 678 62. Serracca L, Battistini R, Rossini I, et al (2015) Molecular Investigation on the Presence of
679 Hepatitis E Virus (HEV) in Wild Game in North-Western Italy. *Food Environ Virol* 7:206–212. doi:
680 10.1007/s12560-015-9201-9
- 681 63. Montagnaro S, De Martinis C, Sasso S, et al (2015) Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E
682 in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. *J Comp*
683 *Pathol* 153:1–8. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.04.006
- 684 64. Sakano C, Morita Y, Shiono M, et al (2009) Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild
685 boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 71:21–25.
- 686 65. De Deus N, Seminati C, Pina S, et al (2007) Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric
687 lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological
688 conditions. *Vet Microbiol* 119:105–114. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.027
- 689 66. Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, et al (2010) Seroprevalence and molecular detection
690 of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J Virol Methods* 168:197–206.
691 doi: 10.1016/j.jviromet.2010.05.014
- 692 67. Mesquita JR, Oliveira RMS, Coelho C, et al (2014) Hepatitis E Virus in Sylvatic and Captive Wild
693 Boar from Portugal. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12297
- 694 68. Roth A, Lin J, Magnus L, et al (2016) Markers for Ongoing or Previous Hepatitis E Virus Infection
695 Are as Common in Wild Ungulates as in Humans in Sweden. *Viruses*. doi: 10.3390/v8090259
- 696 69. Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, et al (2005) Analysis of the full-length genome of hepatitis E
697 virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86:3321–3326. doi:
698 10.1099/vir.0.81394-0

- 699 70. Wu J-C, Chen C-M, Chiang T-Y, et al (2002) Spread of hepatitis E virus among different-aged
700 pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol* 66:488–492.
- 701 71. Seminati C, Mateu E, Peralta B, et al (2008) Distribution of hepatitis E virus infection and its
702 prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J Lond Engl* 1997 175:130–132. doi:
703 10.1016/j.tvjl.2006.11.018
- 704 72. Leblanc D, Ward P, Gagné M-J, et al (2007) Presence of hepatitis E virus in a naturally infected
705 swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol* 117:160–166. doi:
706 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.008
- 707 73. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al (2003) Swine hepatitis E virus strains in Japan form
708 four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E
709 virus. *J Gen Virol* 84:851–862.
- 710 74. Medrano C, Boadella M, Barrios H, et al (2012) Zoonotic pathogens among white-tailed deer,
711 northern Mexico, 2004-2009. *Emerg Infect Dis* 18:1372–1374. doi: 10.3201/eid1808.111902
- 712 75. Weger S, Elkin B, Lindsay R, et al (2016) Hepatitis E Virus Seroprevalence in Free-Ranging Deer
713 in Canada. *Transbound Emerg Dis* n/a–n/a. doi: 10.1111/tbed.12462
- 714 76. Zhang X-X, Qin S-Y, Zhang Y, et al (2015) First Report of Hepatitis E Virus Infection in Sika Deer
715 in China. *BioMed Res Int* 2015:1–5. doi: 10.1155/2015/502846
- 716 77. Kukielka D, Rodriguez-Prieto V, Vicente J, Sánchez-Vizcaíno JM (2015) Constant Hepatitis E Virus
717 (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV
718 Zoonotic Transmission. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12311
- 719 78. Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, et al (2010) Detection of hepatitis E virus in samples of animal
720 origin collected in Hungary. *Vet Microbiol* 143:106–116. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.004
- 721 79. Reuter G, Fodor D, Forgách P, et al (2009) Characterization and zoonotic potential of endemic
722 hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol Off Publ Pan Am*
723 *Soc Clin Virol* 44:277–281. doi: 10.1016/j.jcv.2009.01.008
- 724 80. Lhomme S, Top S, Bertagnoli S, et al (2015) Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus,
725 Southwestern France. *Emerg Infect Dis* 21:1224–1226. doi: 10.3201/eid2107.141909
- 726 81. Kubankova M, Kralik P, Lamka J, et al (2015) Prevalence of Hepatitis E Virus in Populations of
727 Wild Animals in Comparison with Animals Bred in Game Enclosures. *Food Environ Virol*. doi:
728 10.1007/s12560-015-9189-1
- 729 82. Boadella M, Casas M, Martín M, et al (2010) Increasing contact with hepatitis E virus in red
730 deer, Spain. *Emerg Infect Dis* 16:1994–1996. doi: 10.3201/eid1612.100557
- 731 83. Di Bartolo I, Ponterio E, Angeloni G, et al (2017) Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer
732 (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. *Transbound Emerg Dis* 64:137–143. doi:
733 10.1111/tbed.12353
- 734 84. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from
735 deer to human beings. *Lancet* 362:371–373. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14025-1

- 736 85. Pavio N, Laval M, Maestrini O, et al (2016) Possible Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus
737 from Domestic Pigs and Wild Boars from Corsica. *Emerg Infect Dis* 22:2197–2199. doi:
738 10.3201/eid2212.160612
- 739 86. Nakano T, Takahashi K, Arai M, et al (2013) Identification of European-type hepatitis E virus
740 subtype 3e isolates in Japanese wild boars: molecular tracing of HEV from swine to wild boars.
741 *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 18:287–298. doi:
742 10.1016/j.meegid.2013.06.004
- 743 87. Pavio N, Merbah T, Thébault A (2014) Frequent hepatitis E virus contamination in food
744 containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis* 20:1925–1927. doi:
745 10.3201/eid2011.140891
- 746 88. Di Bartolo I, Angeloni G, Ponterio E, et al (2015) Detection of hepatitis E virus in pork liver
747 sausages. *Int J Food Microbiol* 193:29–33. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005
- 748 89. Szabo K, Trojnar E, Anheyer-Behmenburg H, et al (2015) Detection of hepatitis E virus RNA in
749 raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int J Food*
750 *Microbiol* 215:149–156. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013
- 751 90. Mykytczuk O, Harlow J, Bidawid S, et al (2017) Prevalence and Molecular Characterization of
752 the Hepatitis E Virus in Retail Pork Products Marketed in Canada. *Food Environ Virol*. doi:
753 10.1007/s12560-017-9281-9
- 754 91. Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Delannoy S, et al (2016) Quantification of Hepatitis E
755 Virus in Naturally-Contaminated Pig Liver Products. *Front Microbiol* 7:1183. doi:
756 10.3389/fmicb.2016.01183
- 757 92. Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M (2012) Hepatitis E virus in pork food chain, United
758 Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 18:1358–1360. doi: 10.3201/eid1808.111647
- 759 93. Cook N, D’Agostino M, Clarke E, Johne R (2016) FSA Project FS301014: A critical review of
760 approaches to assess the infectivity of hepatitis E virus.
- 761 94. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, et al (2012) A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient
762 propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV
763 infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* 157:235–246. doi: 10.1007/s00705-011-1153-
764 2
- 765 95. Berto A, Van der Poel WHM, Hakze-van der Honing R, et al (2013) Replication of hepatitis E
766 virus in three-dimensional cell culture. *J Virol Methods* 187:327–332. doi:
767 10.1016/j.jviromet.2012.10.017
- 768 96. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, et al (2008) Inactivation of infectious hepatitis E virus
769 present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food*
770 *Microbiol* 123:32–37. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.068
- 771 97. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, et al (2007) Detection and characterization of infectious
772 Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*
773 88:912–917. doi: 10.1099/vir.0.82613-0
- 774 98. Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WHM, et al (2007) Hepatitis E virus RNA in
775 commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* 70:2889–2895.

- 776 99. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, et al (2010) Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus
777 transmission to humans. *J Infect Dis* 202:825–834. doi: 10.1086/655898
- 778 100. Renou C, Roque-Afonso A-M, Afonso A-MR, Pavio N (2014) Foodborne transmission of hepatitis
779 E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 20:1945–1947. doi:
780 10.3201/eid2011.140791
- 781 101. Guillois Y, Abravanel F, Miura T, et al (2016) High Proportion of Asymptomatic Infections in an
782 Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin Infect Dis Off*
783 *Publ Infect Dis Soc Am* 62:351–357. doi: 10.1093/cid/civ862
- 784 102. Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, et al (2015) Phylogenetic demonstration of hepatitis
785 E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol* 49:165–168. doi:
786 10.1097/MCG.000000000000113
- 787 103. Masuda J-I, Yano K, Tamada Y, et al (2005) Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar
788 meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 31:178–
789 183. doi: 10.1016/j.hepres.2005.01.008
- 790 104. Li T-C, Chijiwa K, Sera N, et al (2005) Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg*
791 *Infect Dis* 11:1958–1960. doi: 10.3201/eid1112.051041
- 792 105. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S (2003) Severe hepatitis E virus infection after
793 ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188:944. doi: 10.1086/378074
- 794 106. De Sabato L, Di Bartolo I, Montomoli E, et al (2016) Retrospective Study Evaluating
795 Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Blood Donors and in Swine Veterinarians in Italy (2004).
796 *Zoonoses Public Health*. doi: 10.1111/zph.12332
- 797 107. Hinjoy S, Nelson KE, Gibbons RV, et al (2013) A cross-sectional study of hepatitis E virus
798 infection in healthy people directly exposed and unexposed to pigs in a rural community in
799 northern Thailand. *Zoonoses Public Health* 60:555–562. doi: 10.1111/zph.12030
- 800 108. Dremsek P, Wenzel JJ, John R, et al (2012) Seroprevalence study in forestry workers from
801 eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G
802 ELISAs. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 201:189–200. doi: 10.1007/s00430-011-0221-2
- 803 109. Chaussade H, Rigaud E, Allix A, et al (2013) Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for
804 individuals in working contact with animals. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 58:504–
805 508. doi: 10.1016/j.jcv.2013.08.030
- 806 110. Toyoda K, Furusyo N, Takeoka H, et al (2008) Epidemiological study of hepatitis E virus infection
807 in the general population of Okinawa, Kyushu, Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1885–1890.
808 doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05568.x
- 809 111. Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, et al (2015) Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters
810 from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the
811 benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis* 15:440. doi:
812 10.1186/s12879-015-1199-y
- 813 112. Renou C, Cadran J-F, Bourlière M, et al (2007) Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E
814 from Pet Pig to Its Owner. *Emerg Infect Dis* 13:1094–1096. doi: 10.3201/eid1307.070063

- 815 113. Colson P, Kaba M, Bernit E, et al (2007) Hepatitis E associated with surgical training on pigs.
816 Lancet Lond Engl 370:935. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61441-X
- 817 114. Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, et al (2007) Autochthonous hepatitis E infection in a
818 slaughterhouse worker. Am J Trop Med Hyg 77:893–896.
- 819 115. Motoya T, Nagata N, Komori H, et al (2016) The high prevalence of hepatitis E virus infection in
820 wild boars in Ibaraki Prefecture, Japan. J Vet Med Sci 77:1705–1709. doi: 10.1292/jvms.15-0173
- 821 116. Wiratsudakul A, Sariya L, Prompiram P, et al (2012) Detection and phylogenetic characterization
822 of hepatitis E virus genotype 3 in a captive wild boar in Thailand. J Zoo Wildl Med Off Publ Am
823 Assoc Zoo Vet 43:640–644. doi: 10.1638/2011-0217R1.1
- 824 117. Kaba M, Davoust B, Marié J-L, Colson P (2010) Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus*
825 *scrofa*) livers. Vet J Lond Engl 1997 186:259–261. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.08.008
- 826 118. Kaci S, Nöckler K, Johne R (2008) Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar
827 serum samples. Vet Microbiol 128:380–385. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.030
- 828 119. Oliveira-Filho EF, Bank-Wolf BR, Thiel H-J, König M (2014) Phylogenetic analysis of hepatitis E
829 virus in domestic swine and wild boar in Germany. Vet Microbiol 174:233–238. doi:
830 10.1016/j.vetmic.2014.09.011
- 831 120. Vina-Rodriguez A, Schlosser J, Becher D, et al (2015) Hepatitis E virus genotype 3 diversity:
832 phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. Viruses 7:2704–2726.
833 doi: 10.3390/v7052704
- 834 121. Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, et al (2016) Detection and genetic characterization of
835 hepatitis E virus (HEV) genotype 3 subtype c in wild boars in Italy. Arch Virol 161:2829–2834.
836 doi: 10.1007/s00705-016-2964-y
- 837 122. Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, et al (2009) Sources of hepatitis E virus genotype 3
838 in The Netherlands. Emerg Infect Dis 15:381–387. doi: 10.3201/eid1503.071472
- 839 123. Dorn-In S, Schwaiger K, Twarużek M, et al (2016) Hepatitis E Virus in Wild Boar in Northwest
840 Poland: Sensitivity of Methods of Detection. Foodborne Pathog Dis. doi:
841 10.1089/fpd.2016.2194
- 842 124. Žele D, Barry AF, Hakze-van der Honing RW, et al (2016) Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus
843 Antibodies and First Detection of Hepatitis E Virus in Wild Boar in Slovenia. Vector Borne
844 Zoonotic Dis Larchmt N 16:71–74. doi: 10.1089/vbz.2015.1819
- 845 125. Widén F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, et al (2011) Molecular epidemiology of hepatitis E virus in
846 humans, pigs and wild boars in Sweden. Epidemiol Infect 139:361–371. doi:
847 10.1017/S0950268810001342
- 848 126. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RAA, et al (2012) Hepatitis E virus in liver and bile samples from
849 slaughtered pigs of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 107:935–939.
- 850 127. Traoré KA, Ouoba JB, Huot N, et al (2015) Hepatitis E Virus Exposure is Increased in Pork
851 Butchers from Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg 93:1356–1359. doi: 10.4269/ajtmh.15-0321

- 852 128. S de Paula V, Wiele M, Mbunkah AH, et al (2013) Hepatitis E virus genotype 3 strains in
853 domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 19:666–668. doi: 10.3201/eid1904.121634
- 854 129. Wilhelm B, Leblanc D, Houde A, et al (2014) Survey of Canadian retail pork chops and pork
855 livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. *Int J*
856 *Food Microbiol* 185:33–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.006
- 857 130. Li W, She R, Wei H, et al (2009) Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding
858 environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* 133:75–83. doi:
859 10.1016/j.vetmic.2008.06.026
- 860 131. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, et al (2011) Detection of hepatitis E virus (HEV) from
861 porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J*
862 *Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 52:50–54. doi: 10.1016/j.jcv.2011.06.006
- 863 132. Chan MCW, Kwok K, Hung T-N, Chan PKS (2017) Molecular Epidemiology and Strain
864 Comparison between Hepatitis E Virus in Human Sera and Pig Livers during 2014-2016 in Hong
865 Kong. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/JCM.02020-16
- 866 133. Kulkarni MA, Arankalle VA (2008) The detection and characterization of hepatitis E virus in pig
867 livers from retail markets of India. *J Med Virol* 80:1387–1390. doi: 10.1002/jmv.21220
- 868 134. Okano H, Takahashi M, Isono Y, et al (2014) Characterization of sporadic acute hepatitis E and
869 comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in
870 Mie, Japan. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 44:E63–E76. doi: 10.1111/hepr.12216
- 871 135. Sasaki Y, Haruna M, Murakami M, et al (2013) Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella*
872 spp., *Listeria monocytogenes*, and hepatitis E virus in swine livers collected at an abattoir. *Jpn J*
873 *Infect Dis* 66:161–164.
- 874 136. Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, et al (2012) Detection and molecular characterization of hepatitis
875 E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch Virol* 157:2363–2368. doi:
876 10.1007/s00705-012-1422-8
- 877 137. Cantú-Martínez MA, Roig-Sagués AX, Cedillo-Rosales S, et al (2013) [Molecular detection of
878 hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon,
879 Mexico]. *Salud Publica Mex* 55:193–195.
- 880 138. Intharasongkroh D, Sa-Nguanmoo P, Tuanthap S, et al (2017) Hepatitis E Virus in Pork and
881 Variety Meats Sold in Fresh Markets. *Food Environ Virol* 9:45–53. doi: 10.1007/s12560-016-
882 9258-0
- 883 139. Teixeira J, Mesquita JR, Pereira SS, et al (2017) Prevalence of hepatitis E virus antibodies in
884 workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 206:77–
885 81. doi: 10.1007/s00430-016-0484-8
- 886 140. Lange H, Øverbø J, Borgen K, et al (2017) Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and
887 swine. *Epidemiol Infect* 145:181–186. doi: 10.1017/S0950268816002144
- 888 141. Kang Y-H, Cong W, Zhang X-Y, et al (2017) Hepatitis E virus seroprevalence among farmers,
889 veterinarians and control subjects in Jilin province, Shandong province and Inner Mongolia
890 Autonomous Region, China. *J Med Virol* 89:872–877. doi: 10.1002/jmv.24693

- 891 142. Caruso C, Peletto S, Rosamilia A, et al (2016) Hepatitis E Virus: A Cross-Sectional Serological and
892 Virological Study in Pigs and Humans at Zoonotic Risk within a High-Density Pig Farming Area.
893 *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12533
- 894 143. Krumbholz A, Joel S, Dremsek P, et al (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in
895 humans living in high pig density areas of Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 203:273–
896 282. doi: 10.1007/s00430-014-0336-3
- 897 144. Mesquita JR, Valente-Gomes G, Conceição-Neto N, Nascimento MSJ (2014) Pet veterinarians
898 have no increased risk of hepatitis E compared to the general population. *J Med Virol* 86:954–
899 956. doi: 10.1002/jmv.23927
- 900 145. Silva SMT da, Oliveira JM de, Vitral CL, et al (2012) Prevalence of hepatitis E virus antibodies in
901 individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:338–341.
- 902 146. Krumbholz A, Mohn U, Lange J, et al (2012) Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in
903 humans with occupational exposure to pigs. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 201:239–244. doi:
904 10.1007/s00430-011-0210-5
- 905 147. Galiana C, Fernández-Barredo S, Pérez-Gracia MT (2010) [Prevalence of hepatitis E virus (HEV)
906 and risk factors in pig workers and blood donors]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:602–607. doi:
907 10.1016/j.eimc.2010.01.010
- 908 148. Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, et al (2008) Occupational exposure to hepatitis E
909 virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 78:1012–1015.
- 910
- 911

Table 1. Summary of reports on detection of HEV RNA in liver, meat and meat products from animals intended for human consumption.

Animal species	Organ	Geographical area/Country	Detection rate	RNA log copies/g	Reference
Pig	Liver	Brazil	2/118 (2%)		[126]
		Burkina Faso	1/157 (1%)		[127]
		Cameroon	3/345 (1%)		[128]
		Canada	2/19 (10%)	1.3-1.6	[90]
		Canada	25/283 (9%)	3-6.7	[129]
		Canada	9/43 (21%)	3-7	[25]
		China	4/114 (4%)		[130]
		Czech Republic	2/40 (5%)		[26]
		France (Corsica)	2/24 (8%)		[55]
		France	128/3715 (4%)		[32]
		Germany	8/200 (4%)		[131]
		Hong Kong	7/479 (2%)		[132]
		India	2/240 (1%)		[133]
		Italy	2/33 (6%)		[26]
		Japan	12/243 (4.9%)		[134]
		Japan	0/110 (0%)		[135]
		Japan	4/390 (1%)		[136]
		Mexico	26/127 (20%)		[137]
		Spain	1/39 (3%)		[26]
		Thailand	3/1090 (1%)		[138]
		The Netherlands	4/62 (6%)		[98]
		United Kingdom	1/40 (3%)		[92]
		USA	14/127 (11%)		[97]
	Meat (muscle)	Canada	0/599 (0%)		[129]
		Canada	0/43 (0%)		[25]
		Czech Republic	1/40 (3%)		[26]
		Italy	2/33 (6%)		[26]
		Spain	0/39 (0%)		[26]
		Thailand	2/559 (1%)		[138]
		United Kingdom	0/40 (0%)		[92]
	Sausages (and other products) containing liver	Canada	36/76 (47%)	0.6-2.7	[90]
		France	68/394 (17.3%)	2.2-6.3	[87]
		France	22/70 (31%)	1.6-6.2	[91]
		Germany	11/50 (22%)		[89]
		Italy	11/68 (16%)	3.4-5.3	[88]
	Sausages without liver	Germany	14/70 (20%)		[89]
	Sausages (not specified)	Canada	0/35 (0%)		[90]
Czech Republic		0/92 (0%)		[26]	
Italy		0/128 (0%)		[26]	
Spain		6/93 (6%)		[26]	
United Kingdom		6/63 (10%)		[92]	
Wild boar	Liver	Belgium	4/61 (7%)		[60]
		Czech Republic	50/437 (11%)	7.3	[81]
		France	7/285 (3%)		[117]
		France	5/86 (6%)	1.6-8.1	[80]

		Germany	39/232 (17%)	7.4	[56]
		Germany	4/22 (18%)		[111]
		Germany	22/148 (15%)		[58]
		Germany	48/126 (38%)		[50]
		Hungary	8/75 (11%)		[78]
		Italy	7/372 (2%)		[62]
		Italy	55/164 (33%)		[63]
		Japan	19/552 (3%)		[4]
		Japan	7/39 (18%)		[115]
		Japan	1/33 (3%)		[40]
		The Netherlands	2/102 (2%)		[66]
	Meat (muscle)	Germany	29/232 (12%)	3.6	[56]
		Germany	1/22 (5%)		[111]
		The Netherlands	0/64 (0%)		[66]
	Sausages without liver	Germany	1/10 (10%)		[89]
Red deer	Liver	Belgium	1/29 (3%)		[60]
		France	2/62 (3%)	1.1-3.1	[80]
		Germany	2/83 (2%)	3.3	[56]
		Hungary	3/30 (10%)		[78]
		The Netherlands	1/39 (3%)		[66]
	Meat (muscle)	Germany	2/83 (2%)	2.7	[56]
		The Netherlands	2/39 (5%)		[66]
Roe deer	Liver	Belgium	0/27 (0%)		[60]
		Germany	5/78 (6%)	3.3	[56]
		Hungary	9/41 (22%)		[78]
		Italy	0/30 (0%)		[62]
		The Netherlands	0/8 (0%)		[66]
	Meat (muscle)	Germany	4/78 (5%)	2.7	[56]
		The Netherlands	0/6 (0%)		[66]
Fallow deer	Liver	Germany	0/22 (0%)		[56]
	Meat (muscle)	Germany	0/22 (0%)		[56]
Yezo deer	Liver	Japan	0/79 (0%)		[136]
Sika deer	Liver	Japan	0/132 (0%)		[40]

Orthohepevirus A

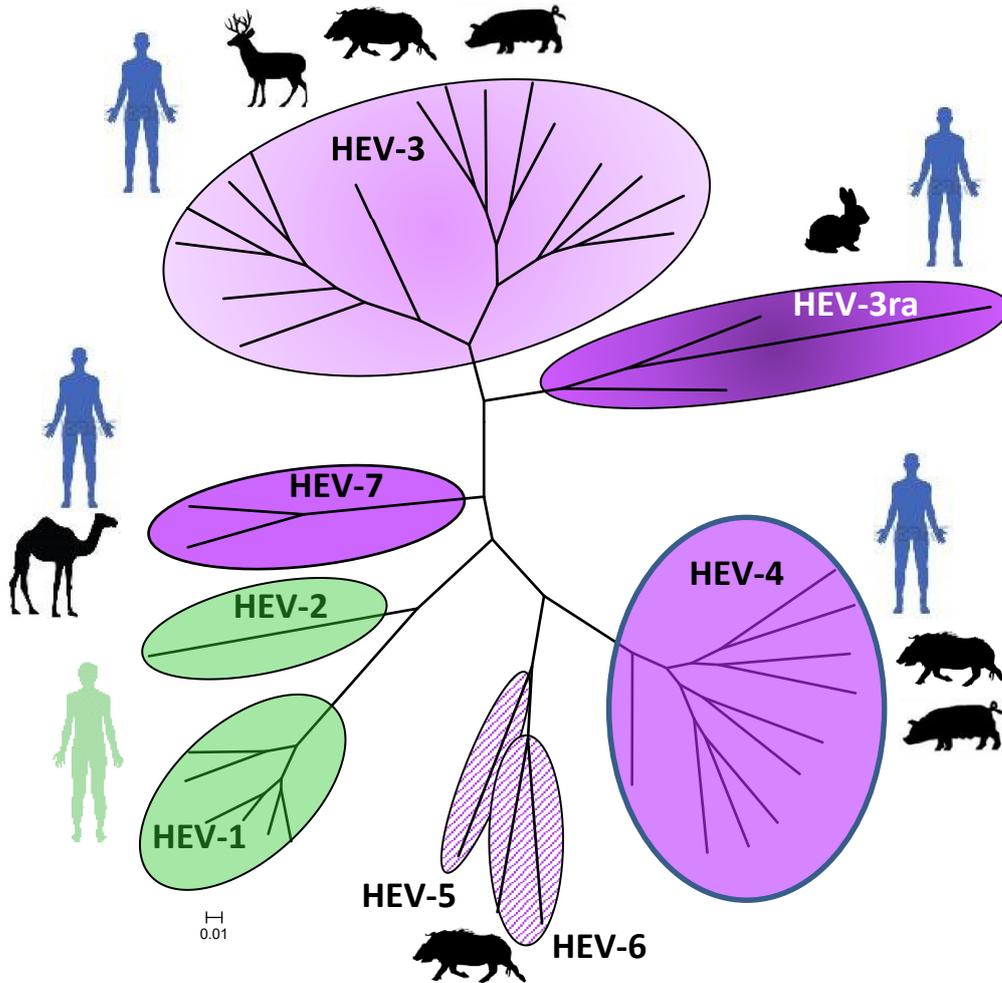


Figure 1

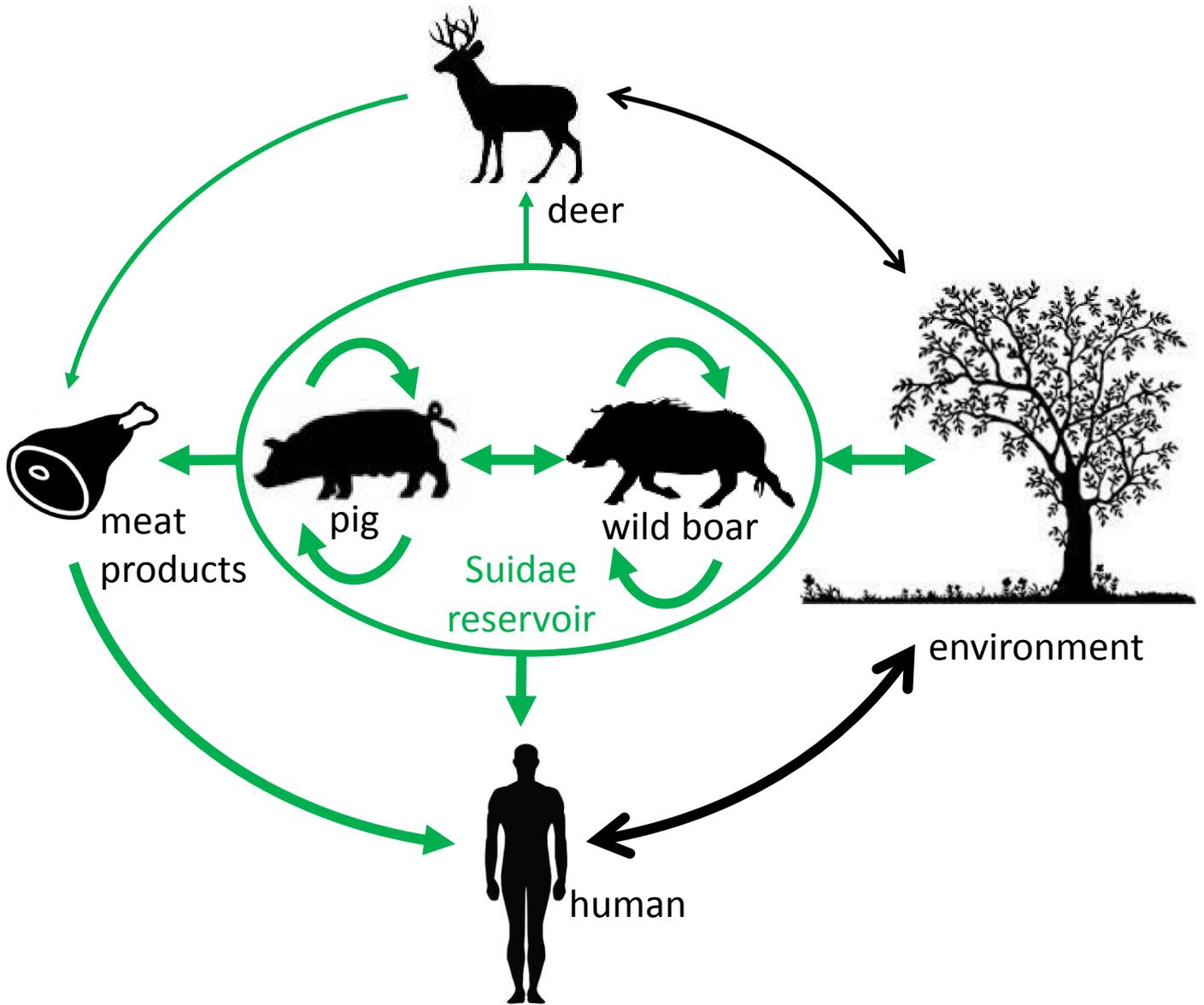


Figure 2

Supplemental Table 1. Prevalence of HEV-specific antibodies and HEV RNA among wild boars.

Location		Year	HEV antibodies	HEV RNA	Specimen	Geno- type	Refer- ence	
AUSTRALIA								
Australia	North	-	17% (15/59)	-	-	-	[39]	
ASIA								
Japan	Countrywide	2002-2004	8.6% (3/35)	-	-	-	[40]	
	Countrywide	2004-2005	1.6% (1/62)	2.3% (2/87)	Serum/liver	3	[69]	
	Ehime	Wild	2001-2004	25.5% (100/392)	3.1% (12/392)	Serum	3	[48]
		Captive		71.4% (10/14)	0% (0/14)		-	
	Gunma	2004-2006	4.5% (4/89)	1.1% (1/89)	Serum	3	[64]	
	Countrywide	2003-2010	8.1% (41/507)	3.3% (19/578)	Serum/Liver	3/4/6	[4]	
	Yamaguchi	2010-2012	41.6% (47/113)	4.5% (5/112)	Serum	4	[43]	
	Countrywide	2010-2013	11.4% (58/511)	4.2% (24/566)	Serum/Liver	3/4/6	[42]	
Ibraki	2013-2014	41.2% (28/68)	10.3% (7/68)	Serum/Liver/Feces	3	[115]		
Thailand	Central (captive)	2009	-	2% (1/51)	Feces	3	[116]	
EUROPE								
Belgium	Wallonia	2010-2011	34% (n=383)	5.3% (5/94)	Serum/Liver	3	[60]	
Estonia	Countrywide	2013	17.2% (81/471) [#]	16% (13/81) ^{##}	Serosanguineous meat juice	3	[54]	
France	Southeast	2007-2008	-	2.5% (7/285)	Liver	3	[117]	
	Countrywide	2000-2004	14% (59/421)	-	-	-	[49]	
	Southwest	2010-2011	-	5.8% (5/86)	Liver	-	[80]	
	Corsica	2009/2010 /2012	26.1% (74/284)	1.8% (5/284)	Liver/Bile	-	[55]	
Germany	North	1995-1996	-	5.3% (10/189)	Serum	3	[118]	
	Northeast/centre	2005-2008	-	14.9% (22/148)	Liver	3	[58]	
	Countrywide	2007	29.9% (32/107)	68.2% (90/132)	Liver/Bile/Serum	3	[50]	
	Centre	2008	-	14.5% (18/124)	Serum	3	[119]	
	North	1996-1997	-	3.4% (32/955)	Blood	3	[120]	
		2005-2006	-	5.2% (3/58)	Blood	3		
		2009-2010	-	10.4% (14/134)	Liver	3		
	Centre	2012-2013	41.3% (19/46)	15.2% (7/46)	Serum	3	[111]	
-	2013-2015	45% (81/180)	16.8% (39/232)	Serum/Liver	3	[56]		
Hungary	Countrywide	2005-2009	-	10.7% (8/75)	Liver	3	[78]	
Italy	Northeast	2006	-	25% (22/88)	Bile	3	[45]	
	Centre/North	2009-2012	10.2% (226/2211)	0% (0/493) [*]	Liver	-	[51]	
	Northwest	2012-2013	4.9% (29/594)	3.7% (12/320)	Liver	3	[52]	
	Centre/Northwest	2012-2014	-	1.9% (7/372)	Liver	3	[62]	
	Centre	-	40.7% (93/228)	33.5% (55/164)	Liver	3	[63]	
	Centre	2011-2012	56.2% (36/64)	9.4% (6/64)	Feces	3	[61]	
	North/South	2012-2015	-	1.5% (3/196)	Feces	3	[121]	
The Netherlands	Centre	2005	-	3.8% (1/26)	Feces	3	[122]	
	Centre/South	2005-2008	12% (165/1029)	7.5% (8/106)	Serum/Feces/Liver /Muscle	3	[66]	
Poland	Countrywide	2012-2013	44.4% (116/261)	-	-	-	[53]	
	Northwest	2012-2014	17.2% (28/163)	28.8% (47/163)	Serum/Feces	3	[123]	
Portugal	Centre (captive)	2012	-	10% (4/40)	Stool	3	[67]	
	Northeast/Centre	2011-2012	-	25% (20/80)	Liver	3		

Slovenia	Countrywide	2009-2011	30.2% (87/288)	0.35% (1/288)	Serum	-	[124]
Spain	Centre/South	2000-2005	42.7% (64/150)	19.6% (27/138)	Serum	3	[59]
	Countrywide	2000-2011	26.3% (n=942)	-	-	-	[57]
	Centre	2003-2010	57.4% (62/108)	10.1% (16/158)	Serum	3	[77]
Sweden	South	-	-	8.2% (13/159)	Serum	3	[125]
	South	2012-2015	8.2% (11/134)	7.9% (11/139)	Serum/Feces	3	[68]
Switzerland	Countrywide	2008-2012	12.5% (38/303)	-	-	-	[14]

Seroprevalence determined using serosanguineous meat juice.

RNA prevalence determined using samples from anti-HEV-positive wild boars.

* 412/493 liver samples were analysed clustered in 18 pools.

(-) Not determined or available.

Supplemental Table 2. Summary of reports on serological studies in people with occupational contact to animals.

Exposed group	prevalence	Control group	prevalence	Country	Reference
Slaughterhouse workers, butchers, pig farmers swine veterinarians	35/114 (30.7 %)	anonymous volunteers, matched by age, sex and region	161/804 (19.9 %)	Portugal	[139]
Pig farm workers	24/79 (30%)	Blood donors	162/1200 (14%)	Norway	[140]
Swine farmers Cattle farmers Sheep farmers Deer farmers Fox farmers Mink farmers Poultry farmers	57/116 (49.1%) 22/83 (26.5%) 20/65 (30.8%) 35/87 (40.2%) 21/69 (30.4%) 28/88 (31.8%) 26/92 (28.3%)	Control Subjects, age- and gender-matched	121/600 (20.2%)	China	[141]
Workers with occupational contact with swine	4/69 (5.7%)	People without occupational contact with swine	1/73 (1.3%)	Italy	[142]
Swine veterinarians	8/83 (9.6%)	Blood donors	15/170 (8.8%)	Italy	[106]
Hunters	26/126 (21%)	German Health Examination Survey for Adults	731/4352 (16.8%)	Germany	[111]
Pork butchers	76/100 (76%)	Blood donors	43/90 (47.8%)	Burkina Faso	[127]
People with recent and past direct pig contact	13/113 (11.5%)	People without recent and past direct pig contact	5/126 (4.0%)	Germany	[143]
Pet Veterinarians	7/373 (9.9%)	Matched general population	16/120 (13.3%)	Portugal	[144]
Pig farm workers Forestry workers	134/306 (43.8%) 84/231 (36.4%)	Social and administrative staff, gardeners, traders, cereal growers	84/322 (26.1%)	France	[109]
Pig farmers	39/171 (22.8%)	individuals with no history of occupational contact with pigs on a farm	79/342 (23.1%)	Thailand	[107]
Forest workers	99/555 (17.8%)	Blood donors	33/298 (11.1%)	Germany	[108]
Living on subsistence family or commercial farms, working in slaughterhouses	26/310 (8.4%)	Blood donors from urban area	4/101 (4.0%)	Brazil	[145]
Slaughterers, meat inspectors, pig farmers, veterinarians	30/106 (28.3%)	Age- and gender-matched blood donors	18/116 (15.5%)	Germany	[146]
Persons in contact with pigs	25/113 (11.8%)	Unexposed individuals	4/100 (4%)	Spain	[147]

Swine farmers, pig handlers, and swine veterinarians	19/101 (18.8%)	Volunteers with no contact with swine	4/97 (4.1%)	Spain	[148]
Wild boar hunters	19/75 (25.3%)	Residents from the same location	18/326 (5.5%)	Japan	[110]

Interaction du virus de l'hépatite E avec la réponse Interféron de l'hôte.

Mots clés : virus de l'hépatite E, ORF1, interféron, voie JAK-STAT, cellules dendritiques plasmacytoïdes

L'infection par le virus de l'hépatite E (VHE) peut entraîner une hépatite aiguë chez l'homme évoluant en hépatite fulminante dans 1-4% des cas, voire 20% chez les femmes enceintes dans les régions endémiques. Le VHE, transmis par voie entérique, est responsable de grandes épidémies d'origine hydrique dans les pays en voie de développement et de nombreux cas sporadiques d'origine zoonotique dans des pays industrialisés. La description récente de cas d'hépatites E chroniques ou d'atteintes neurologiques graves souligne l'importance de caractériser les interactions du VHE avec son hôte. L'objectif de ce projet de thèse était de caractériser les interactions entre le VHE et la réponse immune innée de l'hôte et en particulier avec le système interféron de type I (IFN-I).

La première partie de ce projet a consisté en l'étude de la modulation des voies de signalisation de l'IFN-I par la polyprotéine non-structurale ORF1 du VHE. Celle-ci est constituée de plusieurs domaines fonctionnels putatifs tels qu'une méthyltransférase (Met) ou une protéase à cystéine de type papaïne (PCP) dont les fonctions sur la signalisation IFN-I restent encore peu connues. Les résultats obtenus ont montré que le domaine MetPCP de l'ORF1 est capable d'inhiber l'activation du promoteur de l'*IFN-β* et de celui des gènes sous le contrôle de l'IFN contenant des éléments de réponse à l'IFN (ISRE), ainsi que l'expression de certains des gènes induits par l'IFN (ISGs). En recherchant le mécanisme impliqué dans l'inhibition du promoteur ISRE, nous avons montré que le domaine MetPCP inhibe la phosphorylation de STAT1 et sa relocalisation nucléaire. Nous avons également montré que le domaine MetPCP n'inhibe pas la phosphorylation de STAT2. Le mécanisme d'action du domaine MetPCP reste encore à préciser. La deuxième partie de ce projet a été de déterminer si l'infection par le VHE entraîne la production d'IFN-I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). En effet, les pDCs sont la principale source d'IFN-I et jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Les résultats obtenus suggèrent que les pDCs ne produisent que modérément de l'IFN-I lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules infectées par le VHE. L'ensemble des résultats obtenus pendant ce travail de thèse suggère que le VHE utilise plusieurs mécanismes pour moduler la signalisation IFN-I de l'hôte.

Interaction of hepatitis E virus with the host interferon response

Keywords: hepatitis E virus, ORF1, interferon, JAK-STAT pathway, plasmacytoid dendritic cells

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute hepatitis in humans that can lead to fulminant hepatitis in 1-4% of cases, and in 20% of pregnant women in endemic regions. HEV is an enterically-transmitted virus responsible for large waterborne epidemics in developing countries and numerous cases of zoonotic hepatitis E in industrialized countries. The recent description of cases of chronic hepatitis E and severe neurological disorders highlight the importance to characterize the interactions between HEV and the host. The objective of this PhD project was to characterize the interactions between HEV and the host innate immune response and particularly with the type I interferon system (IFN-I).

The first part of this project aimed to study the ability of the ORF1 non-structural polyprotein of HEV to modulate the IFN-I signalling pathways. HEV ORF1 contains several putative functional domains including a methyltransferase (Met) and a papain-like cysteine protease (PCP) whose functions on the IFN-I signalling remain poorly understood. The results obtained showed that the MetPCP domain of ORF1 inhibits IFN- β and IFN-stimulated response element (ISRE) promoter activation and the expression of some IFN-stimulated genes (ISGs). We then investigated the mechanism involved in this inhibition of ISRE promoter activation. We showed that the MetPCP domain inhibits STAT1 phosphorylation and nuclear translocation. In contrast, we found that the MetPCP domain does not inhibit STAT2 phosphorylation. However, the mode of action of MetPCP remains to be fully characterised. The second part of this project aimed to determine the ability of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) to produce IFN-I in response to HEV infection. Indeed, pDCs are the main IFN-I source and play a crucial role in innate and adaptive responses. The results obtained suggest that pDCs produce IFN-I moderately when co-cultured with HEV-infected cells. Taken together, the results obtained during this PhD project suggest that HEV has evolved different mechanisms to modulate the IFN-I host response.

