



HAL
open science

Étude des modifications post-traductionnelles de la protéine de capsid ORF2 du virus de l'hépatite E (HEV)

Maliki Ankavay

► **To cite this version:**

Maliki Ankavay. Étude des modifications post-traductionnelles de la protéine de capsid ORF2 du virus de l'hépatite E (HEV). Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS013 . tel-03654996

HAL Id: tel-03654996

<https://theses.hal.science/tel-03654996v1>

Submitted on 29 Apr 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de:
Docteur de l'Université de Lille

**Etude des modifications post-traductionnelles de la protéine de capsid
ORF2 du Virus de l'Hépatite E (HEV)**

Sous la supervision de Laurence COCQUEREL (HDR)

Rédigée et soutenue publiquement par

Maliki Ankavay

Le 10 juillet 2019

Devant le jury composé de :

Pr Réjane PAUMELLE-LESTRELIN
Dr Nicole PAVIO
Pr Hervé BOURHY
Dr François HELLE
Dr Jérôme GOUTTENOIRE
Dr Laurence COCQUEREL

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Dédicace

Je dédicace ce travail à ma mère DAWAYA Haman et à mon père BANLA Joseph qui ont fait beaucoup de sacrifices pour que je puisse réaliser des études

Remerciements

Je remercie ma Directrice de thèse **Laurence COCQUEREL** pour son encadrement tout au long de cette thèse. Ta rigueur scientifique et ta disponibilité ont été un grand atout pour l'avancement de mon projet de thèse, je t'en remercie. J'ai beaucoup apprécié la confiance et la liberté scientifique que tu m'as accordées tout au long de ma thèse, ce qui m'a permis d'explorer plusieurs aspects de mon sujet. Ta bonne humeur et ta vision positive ont créé un environnement de travail propice et agréable. En plus de tes qualités scientifiques, tu as un côté humain très appréciable, je dirais un instinct maternel remarquable. Les pommes, noisettes et cerises que tu me donnais à l'heure du goûter et les œufs « bio » de tes poules avaient certainement pour but de me redonner les forces pour être plus efficace dans mes manipes. Dire que j'ai eu de la chance de t'avoir comme Directrice de thèse.

Je remercie **Jean DUBUISSON** de m'avoir accepté dans son laboratoire pour la réalisation de mes travaux de thèse. Tes remarques et conseils m'ont permis de me remettre en question et d'améliorer beaucoup de points dans mon projet de thèse. La bonne ambiance que tu as su instaurer dans ton labo est importante pour la réalisation des travaux de recherche.

J'exprime ma gratitude à tous les membres de mon jury de thèse : **Réjane PAUMELLE-LESTRELIN, Nicole PAVIO, Hervé BOURHY, François HELLE et Jérôme GOUTTENOIRE** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Veuillez agréer l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

Je remercie **Réjane PAUMELLE-LESTRELIN** et **Nicole PAVIO** qui ont fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos critiques constructives et vos conseils scientifiques ont contribué fortement à orienter et à améliorer mon projet.

Je remercie **Hervé BOURHY** qui m'a donné la chance de réaliser mon stage de master 2 dans son laboratoire. La rigueur que vous m'aviez inculquée m'a été bénéfique au cours de la réalisation ma thèse.

Je remercie également **Yves ROUILLE** qui m'avait recommandé à Laurence pour une thèse. C'est toi que j'avais contacté le premier pour faire une thèse sous ta supervision mais cela n'a pas été possible. Tes conseils scientifiques en biologie cellulaire m'ont permis d'avancer sur plusieurs points de mon projet ces dernières années. Merci aussi pour les balades aux caps gris-nez et blanc-nez l'été dernier.

Merci à **Anne Goffard** de m'avoir donné la chance d'obtenir un financement ATER qui m'a permis d'obtenir une expérience dans l'enseignement en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie de Lille.

Merci à mes collègues de la Faculté de Pharmacie de Lille, **Elisabeth, Marie-Françoise, Josette, Elodie et Benoit** pour ce partage d'expériences et de connaissances, merci également pour votre sympathie au cours de cette année académique.

Merci à **Claire** de m'avoir appris plusieurs techniques de virologie, merci également pour ta bonne humeur tout au long de ma thèse. C'était toujours un plaisir de t'avoir comme voisine de paillasse. « J'aurais pu te rattraper dans ta chute à Essen, heureusement que ton entorse a bien guéri », je t'avais déjà évité un accident de voiture la veille de ton entorse...

Merci à **Cécile-Marie** pour tes critiques constructives tout au long de ces années de thèse qui ont permis d'améliorer mon projet. Merci également pour ta sympathie et ta bonne humeur.

Merci à **Charline et Virginie** pour vos apports techniques dans la réalisation de mon projet de thèse.

Je remercie mes stagiaires **Aurore, Martin et Thomas** d'avoir participé à la réalisation de mes travaux de thèse.

Merci à **Kévin, Karoline et Cyrine** pour votre bonne collaboration, travail en équipe et bonne humeur dans le labo.

A la « Team mange tard » Sophana, Nadjat, Czes et Rayan

Sophana, je te remercie pour tes conseils, ta bonne humeur et ton humour pendant nos repas de 13h tout au long de ma thèse

Czes, merci pour tes conseils scientifiques même pendant les pauses café et les repas de midi.

Nadjat, en plus d'être une collègue tu as été une amie, une confidente. Merci pour ta sympathie. Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle et familiale.

Rayan, je te remercie pour tes conseils, ton soutien et ta sympathie pendant mes années de thèse. Je te souhaite aussi beaucoup de chance dans ta vie professionnelle et personnelle.

A mes collègues de bureau **Thibaut et Kévin** qui m'ont supporté tout au long de la rédaction de ma thèse. Vous qui n'arriviez pas à garder le calme quand j'en avais besoin mais j'ai réussi à vous fuir pour travailler dans le calme. Je vous remercie de votre sympathie et de votre bonne humeur dans le bureau.

A la « dream team » Ariane, Anabelle et Adéline, Laura, Laure, Marie-Emmanuelle, Rehab, Lydia, Juliano, Thomas et Pauline. Merci pour la bonne ambiance dans le labo et pendant nos pauses café, vous avez contribué à rendre mes années de thèse agréables.

A Karine, Nathalie, Sandrine, Murielle et Loweise, merci de votre collaboration, sympathie, bonne humeur dans le labo

Je remercie également les membres de **l'association Goutte à Goutte Cameroun en France et au Cameroun** pour la réalisation des différents projets au cours de ces deux dernières années. Merci également pour votre bienveillance.

Je remercie aussi tous mes amis de **mes groupes de danse et de sport** qui m'ont toujours apporté une grande bouffée d'oxygène lorsque j'en avais tellement besoin.

Je remercie encore **mes parents, ma sœur et mes frères** pour leur soutien au cours de toutes ces années loin de vous.

Je remercie la plateforme de microscopie de l'Institut Pasteur de Lille pour leur appui technique.

Je remercie l'Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales (ANRS) et l'Université de Lille pour avoir financé mes travaux de thèse.

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite E (HEV) est un problème majeur de santé publique qui touche plus de 20 millions de personnes et tue environ 70 000 chaque année à travers le monde. Le HEV est la cause majeure d'hépatite virale aiguë dans le monde. En France, la séroprévalence du HEV est de 22,4% dans la population générale. Ce virus se transmet par voie féco-orale ou par consommation de viande contaminée mal cuite. Très récemment, nous avons décrit un système de culture cellulaire permettant d'amplifier efficacement le HEV. Ce système représente un outil unique pour caractériser les différentes étapes du cycle infectieux du HEV qui sont très mal connues à ce jour. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à la protéine de capsid ORF2 qui est l'unité structurale des particules virales et est donc un acteur central du cycle infectieux du HEV. La protéine ORF2 est une protéine de 660 acides aminés (aa) qui possède un peptide signal (PS) et trois sites potentiels de N-glycosylation (N1, N2 et N3). J'ai donc étudié le rôle de la N-glycosylation de cette protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV. Pour atteindre cet objectif, la souche infectieuse HEV-p6 génotype 3 a été utilisée pour infecter les cellules de la lignée hépatocytaire PLC3, sous clone de la lignée PLC/PRF/5. Les résultats obtenus ont montré que la protéine ORF2 est N-glycosylée uniquement au niveau des sites N1 et N3 ; le site N2 est défavorable à la N-glycosylation. Nos résultats ont montré que la N-glycosylation de la protéine ORF2 n'est pas importante pour sa stabilité, son oligomérisation, sa reconnaissance par des anticorps, l'assemblage et l'infectiosité des particules virales. Nous avons aussi montré que la protéine ORF2 est importée dans le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV de manière indépendante de la N-glycosylation. Nous avons identifié pour la première fois un signal de localisation nucléaire (NLS) fonctionnel en position N-terminale de la protéine ORF2 lui permettant d'interagir probablement avec l'importine $\alpha 1$. De manière surprenante, ce NLS régule non seulement l'import nucléaire de cette protéine virale, mais aussi sa translocation réticulaire. Nous avons également démontré que la protéine ORF2 est exportée du noyau des cellules hôtes en interagissant avec l'exportine1 et possède 3 signaux d'export nucléaire (NES) en position C-terminale. Ces résultats améliorent la connaissance du trafic intracellulaire de la protéine ORF2 et pourraient orienter les stratégies antivirales dirigées contre le HEV.

Mots clés : Virus de l'hépatite E (HEV), Protéine de capsid, ORF2, Modifications post-traductionnelles, N-glycosylation, Transport nucléo-cytoplasmique.

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection is a major public health problem that affects more than 20 million people and kills approximately 70,000 worldwide each year. HEV is the leading cause of acute viral hepatitis in the world. In France, the seroprevalance of HEV is 22.4% in the general population. This virus is transmitted by fecal-oral route or by consumption of undercooked contaminated meat. Very recently, we have described an efficient cell culture system to amplify HEV. This system represents a unique tool for characterizing the various stages of the infectious HEV lifecycle that are very poorly understood to date. As part of my thesis, I focused on the ORF2 capsid protein which is the structural unit of viral particles and is therefore a central player in the HEV lifecycle. ORF2 is a 660 amino acids protein that contains a signal peptide and three potential N-glycosylation sites (N1, N2 and N3). My work aimed to identify the role of the ORF2 N-glycosylation in the HEV lifecycle. Our results revealed that the ORF2 protein is N-glycosylated on the N1 and N3 sites, whereas the N2 site is not N-glycosylated. Also, the N-glycosylation has no significant relevance neither for the stability, oligomerization, antibody recognition of the ORF2 protein nor for viral assembly and viral infectivity. We also revealed that, the ORF2 protein is translocated into the nucleus of infected cells, independently of N-glycosylation. We identified for the first time a functional nuclear localization signal (NLS) located at the N-terminus of the ORF2 protein that interacts probably with the importin alpha1. Surprisingly, this NLS regulates both nuclear import and endoplasmic reticulum translocation of the ORF2 protein. Finally, we demonstrated that, the ORF2 protein possesses three nuclear export signals (NES) located at its C-terminus. The ORF2 protein interacts with the exportin1 and is exported from the cell nuclei. This interaction drives the ORF2 protein from the nucleus to the cytoplasm of the infected cells. Hence, this study led to new insights into the molecular mechanisms of the ORF2 protein and could help to the design of novel antiviral strategies against HEV.

Liste des abréviations

A

ADNc: Acide Désoxyribonucléique
complémentaire

ADP: Adénosine Triphosphate

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messagers

C

CMR1: Chromosomal Maintenance Region 1

CMV: Cytomégalovirus

D

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's
medium

Dol-PP: Dolichol-Pyro-phosphate

E

EBV: Epstein-Barr Virus

eEF1 α 1: Eukaryotic Elongation Factor 1
Isoform-1

eHEV: Virus de l'hépatite E quasi-enveloppé

ERAD: Endoplasmic Reticulum-Associated
protein Degradation

ESCRT: Endosomal Sorting Complexes
Required for Transport

Expo1: Exportine 1

F

FDA: Food and Drug Administration

G

GBF1: Guanine nucleotide exchange factor
Golgi Brefeldin A resistance Factor 1

Gt: Génotype,

GTP: Guanosine Triphosphate

H

HA: Hémagglutinine

HAV: Virus de l'hépatite A

HBc: Protéine de capside du HBV

HCV: Virus de l'Hépatite C

Hel: Hélicase

HEV: Virus de l'Hépatite E

HNANB: Hépatites non A non B

HVR: Hypervariable

HVR1: Région Hypervariable 1

I

IFN: Interféron

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

IRF3: Interferon Regulatory Factor 3

ISGF3: Interferon-Stimulated Gene Factor 3

ISGs: IFN-Stimulated Genes

ISRE: IFN-Stimulated Response Element

J

JAK-STAT: Janus Kinase-Signal Transducer
and Activator of Transcription

L

LMB: Leptomycine B

M

M: Middle

MDA5: Melanoma Differentiation
Associated gene 5

Met: Methyl-Transférase

MV: Measles Virus

M199: Medium 199

N

NA: Neuraminidase

NCR: Région Non Traduite

NES: Signal d'export nucléaire

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NLS: Signal de localisation nucléaire

NP: Nucléoporine

NPC: Nuclear Pore Complex

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame

OST: Oligosaccharyl transférase

P

P: Protruding

PCP: Papaine Cystéine Protéase

PRR: Pattern-Recognition Receptor

PS: Peptide Signal

R

RdRp: ARN polymérase ARN dépendante

RE: Réticulum Endoplasmique

RT-qPCR: Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction

RIG-I: Retinoic Acid-Inducible Gene-I

RLR: RIG-I-Like Receptors

RNP_v: ARN ribonucléoprotéine viral

RV: Rabies Virus

ra: Rabbit

S

S: Shell

SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome

SGB: Syndrome de Guillain-Barré

SINE: Selective Inhibitors of Nuclear Export,

SIRP- α : Signal Regulator Protein alpha

SPP: Signal Peptide Peptidase

SPPL: SPP-like

SeqR: Séquence répétée d'arginines

T

TBK-I: TANK-Binding Kinase-I

TLR: Toll-like receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

tsg101: Tumor Susceptibility Gene 101

V

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

W

WNV: West Nile Virus

Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV humain.....	19
Figure 2: Transmission des différents génotypes de HEV et leurs hôtes naturels	22
Figure 3: Arbre phylogénétique des différentes espèces et génotypes du HEV.	35
Figure 4: Structure du génome et des protéines de HEV	36
Figure 5: Les différents domaines de la protéine ORF1	37
Figure 6: Structure schématique de la protéine ORF2	39
Figure 7: Structure cristallographique de la protéine ORF2	40
Figure 8: Particules virales du HEV.....	42
Figure 9: Cycle infectieux du HEV.....	45
Figure 10: La voie interféron au cours d'une infection par le HEV.	53
Figure 11: Réponse humorale au cours d'une hépatite E aiguë	55
Figure 12: Différents types de N-glycanes.....	57
Figure 13: Mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes.....	59
Figure 14: Transport nucléo-cytoplasmique des protéines	65
Figure 15: Cycle cellulaire du virus de l'hépatite B (HBV).	67
Figure 16: Séquence de la protéine ORF2 et présentation des mutants réalisés.....	79
Figure 17: Localisation subcellulaire de la protéine ORF2	84
Figure 18: Distribution subcellulaire des protéines ORF2 wt et mutées.	86
Figure 19: Caractérisation des mutants par Western Blot et titres infectieux.....	88
Figure 20: Colocalisation de la protéine ORF2 avec l'importine $\alpha 1$	90
Figure 21: Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.....	91
Figure 22: Inhibition de l'export nucléaire exportine1 dépendant.....	92
Figure 23: Colocalisation des protéines ORF2 et Expo1.	93
Figure 24: Signaux potentiels d'export nucléaire de la protéine ORF2.....	94
Figure 25: Identification des signaux d'export nucléaire (NES) sur la protéine ORF2.....	95
Figure 26: Intensité de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 sauvage et des mutants NES9, NES10 et NES12	96
Figure 27: Différentes voies de production de la protéine ORF2.	104
Figure 28: Voies non productive et productive de la protéine ORF2 et la voie nucléaire	107
Figure 29: Double topologie de la protéine ORF2.....	110
Figure 30: Modèle du cycle cellulaire de la protéine ORF2 du HEV.....	115

Liste des annexes: Articles scientifiques

Annexe 1: The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself	116
Annexe 2: Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein	117
Annexe 3: Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication.....	119

Table des matières

Dédicace.....	2
Remerciements.....	3
Résumé.....	6
Abstract	7
Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des annexes: Articles scientifiques.....	11
I. INTRODUCTION GENERALE.....	17
A. LE VIRUS DE L'HEPATITE E (HEV)	17
1. HISTORIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE E.....	18
2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	18
2.1. Répartition géographique des différents géotypes du HEV	19
2.1.1. Géotypes humains appartenant à l'espèce <i>Orthohepevirus A</i>.....	19
2.1.2. Géotypes animaux du HEV transmis à l'humain.....	20
2.2. Modes de transmission du HEV	20
3. SIGNES CLINIQUES ET PATHOGENESE	23
3.1. Hépatite aiguë.....	24
3.2. Hépatite fulminante.....	24
3.2.1. Dans la population générale	24
3.2.2. Chez les femmes enceintes	26
3.3. Hépatite Chronique	27
3.4. Manifestations extra-hépatiques.....	28
3.4.1. Manifestations neurologiques	28
3.4.2. Manifestations rénales et pancréatiques.....	29
4.1. Diagnostic indirect.....	30
4.2. Diagnostic direct.....	30
5. TRAITEMENTS CONTRE LE VIRUS DE L'HEPATITE E.....	32
6. PREVENTION	33
7. CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES.....	34
7.1. Classification du HEV.....	34
7.2. Le génome du HEV.....	36
7.3. Les protéines virales	37
7.3.1. La protéine ORF1.....	37

7.3.1.1. Organisation des différents domaines de la protéine ORF1	37
7.3.1.2. Fonctions des différents domaines de la protéine ORF1	38
7.3.2. La protéine ORF2.....	39
7.3.2.1. Organisation générale de la protéine ORF2.....	39
7.3.2.2. La protéine ORF2 associée au génome viral	41
7.3.3. La protéine ORF3.....	42
7.3.4. La protéine ORF4.....	43
7.4. Cycle de réplication du HEV	44
8. MODELES D'ETUDE DU HEV	46
8.1. Culture cellulaire	46
8.2. Systèmes hétérologues et autres outils d'étude du HEV	49
8.3. Modèles animaux	49
9. REPOSE IMMUNITAIRE ET ECHAPPEMENT PAR LE HEV.....	51
9.1. Immunité innée.....	51
9.2. Immunité spécifique	54
9.2.1. Immunité humorale.....	54
9.2.2. Immunité cellulaire	55
B) LA N-GLYCOSYLATION.....	57
1. Les différents types de N-glycane	57
2. Les mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes.....	58
3. Les différents rôles de la N-glycosylation	60
4. La N-glycosylation et les virus.....	61
5. Les inhibiteurs de N-glycosylation comme antiviraux.....	63
C) TRANSPORT NUCLEO-CYTOPLASMIQUE.....	64
1. Chez les cellules eucaryotes.....	64
2. Importances du transport nucléo-cytoplasmique pour les virus	66
3. Les inhibiteurs du transport nucléo-cytoplasmique sont des antiviraux potentiels	70
3.1. Les inhibiteurs d'import nucléaire	70
3.2. Les inhibiteurs d'export nucléaire	70
II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	73
A. Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du virus de l'hépatite E (HEV).....	73
B) Etude des mécanismes du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV	74

III. RESULTATS.....	76
A) Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du virus de l'hépatite E (HEV)	76
B) Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV	77
1. Rationnel:.....	77
2. Matériel et méthodes	80
2.1. Culture cellulaire	80
2.2. Plasmide, mutagénèse et transfection.....	80
2.3. Anticorps.....	81
2.4. Immunofluorescence	81
2.5. Quantification de l'intensité de la fluorescence nucléaire de la protéine ORF2	81
2.6. Extractions cytoplasmiques et nucléaires.....	82
2.7. Western blot (WB).....	82
2.8. Titres infectieux.....	82
2.9. Traitement Leptomycine B (LMB)	83
2.10. Analyses statistiques.....	83
3. Résultats obtenus.....	83
3.1 La protéine ORF2 est importée du cytoplasme vers le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV	83
3.1.1 La protéine ORF2 est transloquée dans le noyau des cellules infectées par le HEV	83
3.1.2. La protéine de capsid ORF2 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) potentiel	84
3.1.3. Caractérisation de la fonctionnalité de la séquence riche en arginines (SeqR), NLS potentiel de la protéine ORF2.....	84
3.1.4. La protéine ORF2 colocalise avec l'Importine α1	89
3.1.5. Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.....	90
3.2. La protéine ORF2 est exportée du noyau vers le cytoplasme des cellules hôtes	91
3.2.1. L'export nucléaire de la protéine ORF2 est dépendante de l'Exportine1	91
3.2.2. La protéine ORF2 colocalise partiellement ou transitoirement avec l'Exportine1	92
3.2.3. La protéine ORF2 possède 3 signaux d'export nucléaire (NES) fonctionnels.....	93
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	99
A : Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du HEV	99
B : Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV	108

ANNEXES.....	116
BIBLIOGRAPHIE.....	123

I.INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

A. LE VIRUS DE L'HEPATITE E (HEV)

Le virus de l'hépatite E (HEV) est l'agent responsable de l'hépatite E, une maladie inflammatoire du foie. Il représente aujourd'hui la première cause d'hépatite aiguë dans le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), chaque année, environ 20 millions de personnes seraient infectées par ce virus, avec près de 3,3 millions de cas d'hépatites aiguës. Ce virus serait également à l'origine de 70 000 décès et d'environ 3000 enfants morts nés par an dans le monde, (pour revue voir (Rein et al. 2012)). De manière générale, le taux de mortalité du HEV est proche de 1% avec un pourcentage très élevé chez les femmes enceintes (pouvant atteindre 30%). L'infection par le HEV guérit le plus souvent de manière spontanée mais, dans certains cas, elle peut conduire à des hépatites aiguës, fulminantes ou chroniques (pour revue voir (Rein et al. 2012; Aggarwal & Goel 2018)). Le HEV est à l'origine de cirrhose du foie en cas d'hépatite chronique et de rares cas d'hépatocarcinomes en lien avec cette infection ont également été rapportés (Colson et al. 2019). Des manifestations extra-hépatiques, notamment neurologiques, rénales et pancréatiques ont été décrites au cours d'infections par le HEV (pour revue voir (Aggarwal & Goel 2018; Kamar & Pischke 2018)). Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique contre ce virus bien que la ribavirine soit utilisée en clinique pour traiter des cas compliqués (Anang et al. 2018). L'hépatite E a été longtemps considérée comme une infection présente uniquement dans les pays en développement. Cependant, le nombre de personnes infectées par ce virus dans les pays industrialisés suite à une transmission zoonotique est en pleine croissance depuis une décennie, faisant de ce virus un problème de santé publique mondial (pour revue voir (Ankavay et al. 2018), **Annexe 1**). Il existe 4 géotypes (gt) principaux du HEV qui infectent l'humain (HEV-1, -2, -3 et -4). Les HEV-1 et -2 sont présents dans les pays en développement (Asie du Sud, Afrique Sub-Saharienne et Amérique du nord) et se transmettent en consommant de l'eau ou des aliments souillés (pour revue voir (Nelson et al. 2018)) tandis que les HEV-3 et -4 sont présents dans les pays industrialisés et se transmettent principalement en consommant la viande des animaux infectés mal cuite (Clemente-Casares et al. 2016). Dans les pays en développement, ce sont les jeunes adultes (15-30 ans) qui sont les plus touchés avec une prédominance masculine et les femmes enceintes sont les plus vulnérables. Dans les pays industrialisés, les personnes âgées de plus de 55 ans sont les plus atteintes par cette infection (Navaneethan et al. 2008; Péron et al. 2007).

1. HISTORIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE E

Au milieu des années 1950, des cas d'hépatites non A et non B (HNANB) transmises par voie entérale ont été à l'origine de taux de morbidité et de mortalité importants. Les premières épidémies causées par les HNANB ont été notifiées pour la première fois en 1955 à Delhi en Inde après une contamination fécale des eaux de la ville causant l'infection d'environ 29 000 personnes. De 1955 à 1990, plusieurs épidémies d'HNANB transmises par voie entérale ont été enregistrées dans plusieurs parties du monde : dans le sous-continent indien (Inde, Népal, Pakistan), en Asie du Sud-Est (Burma, Indonésie), en Asie Centrale, en Afrique (Algérie, Côte d'Ivoire, Tchad, Soudan et Somalie) et en Amérique du nord (Mexique). L'eau contaminée était la source d'infection de ces épidémies. Le taux de mortalité était particulièrement élevé chez les femmes enceintes (Irshad 1999). C'est en 1983 que l'étiologie virale des HNANB transmises par voie entérale a été confirmée (Balayan et al. 1983). En 1990, le génome de cette souche virale a été séquencé et le nom de virus de l'hépatite E (HEV) (E pour Enteric/Epidemic) lui a été attribué (Reyes et al. 1990).

Les premiers cas confirmés d'hépatites E dans les pays industrialisés ont été décrits aux Etats-Unis en 1997. Une souche virale isolée chez le porc était génétiquement identique à celle retrouvée chez des patients qui n'avaient pas séjourné dans des pays endémiques (pays en développement), montrant une possible transmission inter-espèce locale (Meng et al. 1997). En 2003 au Japon, des cas d'hépatite E ont été diagnostiqués chez des patients ayant mangé de la viande mal cuite de porc, de sanglier ou de cerf (Tei et al. 2003; Yazaki et al. 2003). En Europe, l'hépatite E a été décrite chez des patients ayant consommé des Figatelles (saucisses fraîches composées principalement de viande et de foie de porc) en France (Colson et al. 2010). Ces cas d'hépatite E ont révélé pour la première fois une transmission inter-espèce du HEV dans les pays industrialisés.

2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Les 4 principaux gt du HEV qui infectent l'humain sont: les HEV-1, -2, -3 et -4. Ces HEV présentent un profil épidémiologique bien distinct. Les HEV-1 et -2 sont restreints à l'humain tandis que les HEV-3 et -4 sont des zoonoses (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)).

Certains HEV restreints à des animaux ont montré leur capacité à franchir la barrière inter-espèce. Par exemple, le HEV-7, qui infecte les camélidés (*Camelus dromedarius*), a été identifié chez un patient ayant une hépatite E chronique avec des antécédents de consommation de viande et de lait provenant de cette espèce animale (Lee et al. 2016).

Un autre cas humain d'hépatite E, pour lequel le gt identifié était le HEV-3ra (ra pour *rabbit*) infectant le lapin, a également été rapporté en Suisse (Sahli et al. 2019). Ces différents HEV présentent une répartition géographique et des sources de transmission différentes.

2.1. Répartition géographique des différents génotypes du HEV

2.1.1. Génotypes humains appartenant à l'espèce *Orthohepevirus A*

Les HEV-1 et -2 sont principalement présents dans les pays d'Afrique, d'Asie et en Amérique du nord (Mexique) (**Figure 1a et 1b**). Le HEV-1 a également été trouvé en Russie (**Figure 1a**). Le HEV-3 a une répartition cosmopolite et le HEV-4 est retrouvé majoritairement en Asie et en Europe (**Figure 1c et 1d**) (Debing, Moradpour, et al. 2016; Forni et al. 2018). Il est important de préciser qu'en Suisse, un sous type du HEV-3 spécifique et circonscrit à ce pays a été notifié, il s'agit du HEV-3s (Sahli et al. 2019).

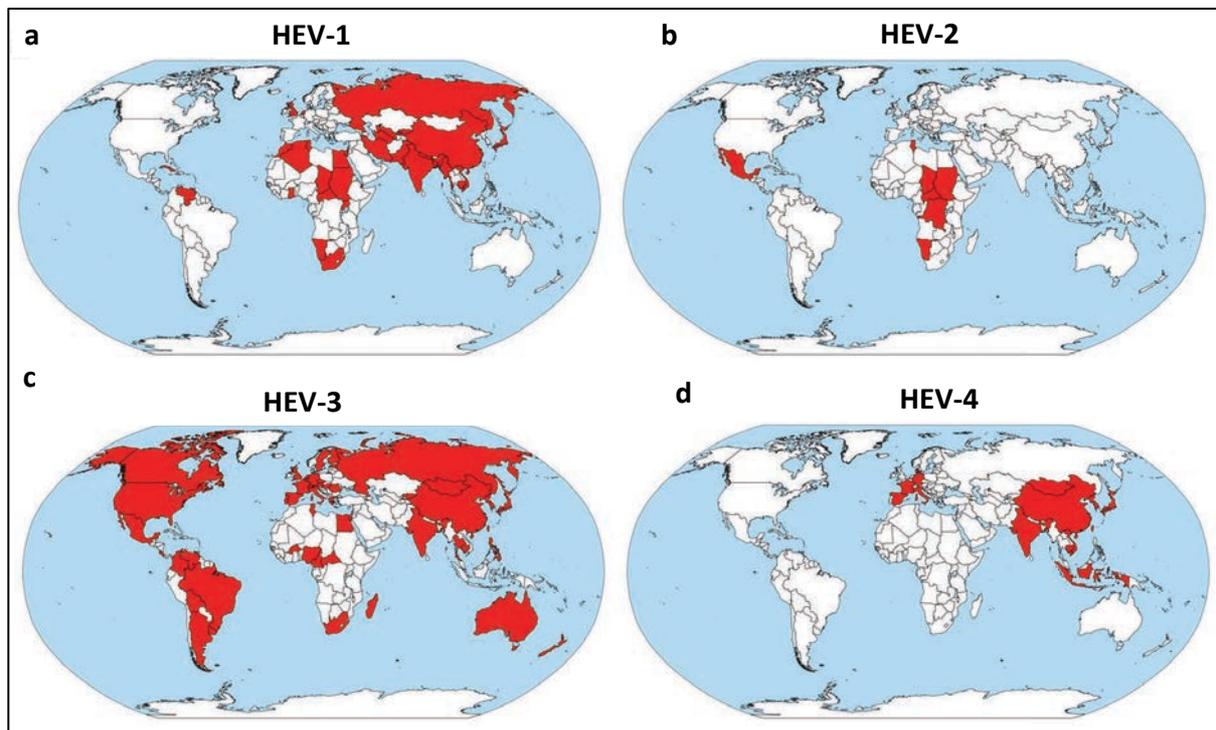


Figure 1: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV humain.

Les différents HEV recensés dans différentes parties du monde ont été cartographiés indépendamment de leur prévalence. En rouge les pays dans lesquels chaque génotype a été identifié au moins une fois. (a) Répartition du HEV-1; (b) Répartition du HEV-2; (c) Répartition du HEV-3 et (d) Répartition du HEV-4. Figure adaptée de (Forni et al. 2018).

2.1.2. Génotypes animaux du HEV transmis à l'humain

Des cas isolés de HEV animaux ont récemment été notifiés chez des humains. En France et en Suisse, le HEV-3ra a été identifié chez certains patients (Izopet et al. 2012; Abravanel et al. 2017; Sahli et al. 2019). Les HEV-5 et -6 qui infectent les sangliers n'ont pas encore été retrouvés chez l'humain notamment au Japon où ces souches circulent (M. Takahashi et al. 2014). Le HEV-7, présent chez les camélidés (*Camelus dromedarius*) (Woo et al. 2014) a été identifié chez un patient d'origine Somalienne de 55 ans, présentant une hépatite E chronique, vivant aux Emirats Arabes Unis et qui consommait régulièrement de la viande et du lait de chameau (Lee et al. 2016). Le HEV-7 a également été rapporté comme agent causal d'une hépatite E au Moyen Orient (Emirats Arabes Unis et au Pakistan) et en Afrique (Kenya, Somalie, Soudan et Egypte) (Rasche et al. 2016). Le HEV-8 a également été identifié chez les camélidés (*Bactrian camels*) en Chine et représente un danger potentiel pour l'humain (Woo et al. 2016).

2.2. Modes de transmission du HEV

Les différents HEV ont une source de contamination bien distincte. Les HEV-1 et -2 sont transmis à l'humain par voie féco-orale en consommant de l'eau et des aliments contaminés par les fèces des personnes infectées (**Figure 2**). Ces deux HEV sont principalement retrouvés dans les pays en développement où les conditions d'hygiène et de traitement des eaux sont mauvaises. Ils sont à l'origine d'épidémies en Afrique et en Asie avec un taux de mortalité très élevé chez les femmes enceintes (pour revue voir (Nelson et al. 2018)).

Les HEV-3 et -4 sont présents dans les pays industrialisés. Ce sont des zoonoses. Plusieurs espèces animales sauvages et domestiques (porcs, sangliers, cerfs, lapins) sont des réservoirs de ces deux HEV (**Figure 2**). L'humain se contamine en consommant la viande de ces animaux infectés mal cuite ou tout autre produit dérivé (figatelles, saucisses) (Renou et al. 2014). La viande de porc et de gibier est très souvent impliquée dans l'épidémiologie des HEV-3 et -4. Des études sur les aliments dérivés du porc montrent que 47 % des pâtés et 10,5% des foies de porc cru au Canada, 22% des foies de porc en Allemagne sont positifs au HEV-3 (Szabo et al. 2015; Mykytczuk et al. 2017). En France, 30% des figatelles et 2,8 à 4% des foies distribués dans les commerces, en plus 31 à 59 % des porcs d'élevages sont séropositifs pour le HEV (Rose et al. 2011; Pavio et al. 2014; Barnaud et al. 2012).

La transmission féco-orale des HEV-3 et -4 via la consommation d'aliments contaminés par des eaux souillées utilisées pour l'irrigation ne peut-être exclue à ce jour (pour revue voir (Dalton & Izopet 2018)).

Il est important de noter qu'une cuisson à cœur à une température de 71°C pendant 20 minutes permet d'inactiver le virus (Barnaud et al. 2012).

Le HEV est également transmis par voie sanguine au cours des dons de sang. Cette transmission sanguine a bien été mise en évidence dans les pays industrialisés. Les données sur la prévalence du HEV sont très souvent obtenues à partir d'études menées dans les banques de sang. En France, la séroprévalence du HEV chez les donneurs de sang est de 22,4% à l'échelle nationale et de 52,2% dans le sud de la France où la prévalence est la plus élevée (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)). Des études chez les donneurs de sang au Danemark, en Allemagne, en Irlande, en Hollande, en Espagne et en Ukraine ont montré une prévalence comprise entre 0,02 à 0,14%. La séroprévalence du HEV aux Etats-Unis est estimée à environ 6% et seulement à 0,002% chez les donneurs de sang (Pour revue voir (Nimangaonkar et al. 2018)). Le HEV est également transmis au cours de transplantation ou de greffe d'organes (Protzer et al. 2015).

La transmission materno-fœtale ou verticale du HEV par voie transplacentaire a été bien décrite dans le cas du HEV-1 et conduit à un taux de mortalité infantile important dans les pays en développement (Bose et al. 2014). Le HEV a aussi été identifié dans le lait maternel d'une femme de 34 ans atteinte d'une hépatite E aiguë et allaitant son enfant de 18 mois. Le lait maternel pourrait donc être une voie de transmission de ce virus (Rivero-Juarez et al. 2016). Dans la même voie de transmission, la sécrétion du HEV dans le lait de vaches a aussi été notifiée en Chine dans la province de Yunnan. Il s'agissait du HEV-4 présentant une homologie de 99,2 à 99,4% avec les souches de HEV-4 identifiées chez l'humain dans la même région (F. Huang, Y. Li, et al. 2016). Une étude aux Etats-Unis a montré que 20% des vaches laitières présentaient des IgG anti-HEV qui étaient spécifiques au HEV-3. Cependant, les auteurs de cette étude n'ont pas pu séquencer la souche virale qui circulait dans le bétail (Yugo et al. 2019). Cependant, la présence du HEV chez les vaches reste controversée. Certaines équipes de recherche n'ont pas pu mettre en évidence le HEV chez les vaches ni dans leur lait notamment en Chine province de Hebei (Geng et al. 2019), en Allemagne (Baechlein & Becher 2017) et en Belgique (Vercouter et al. 2018).

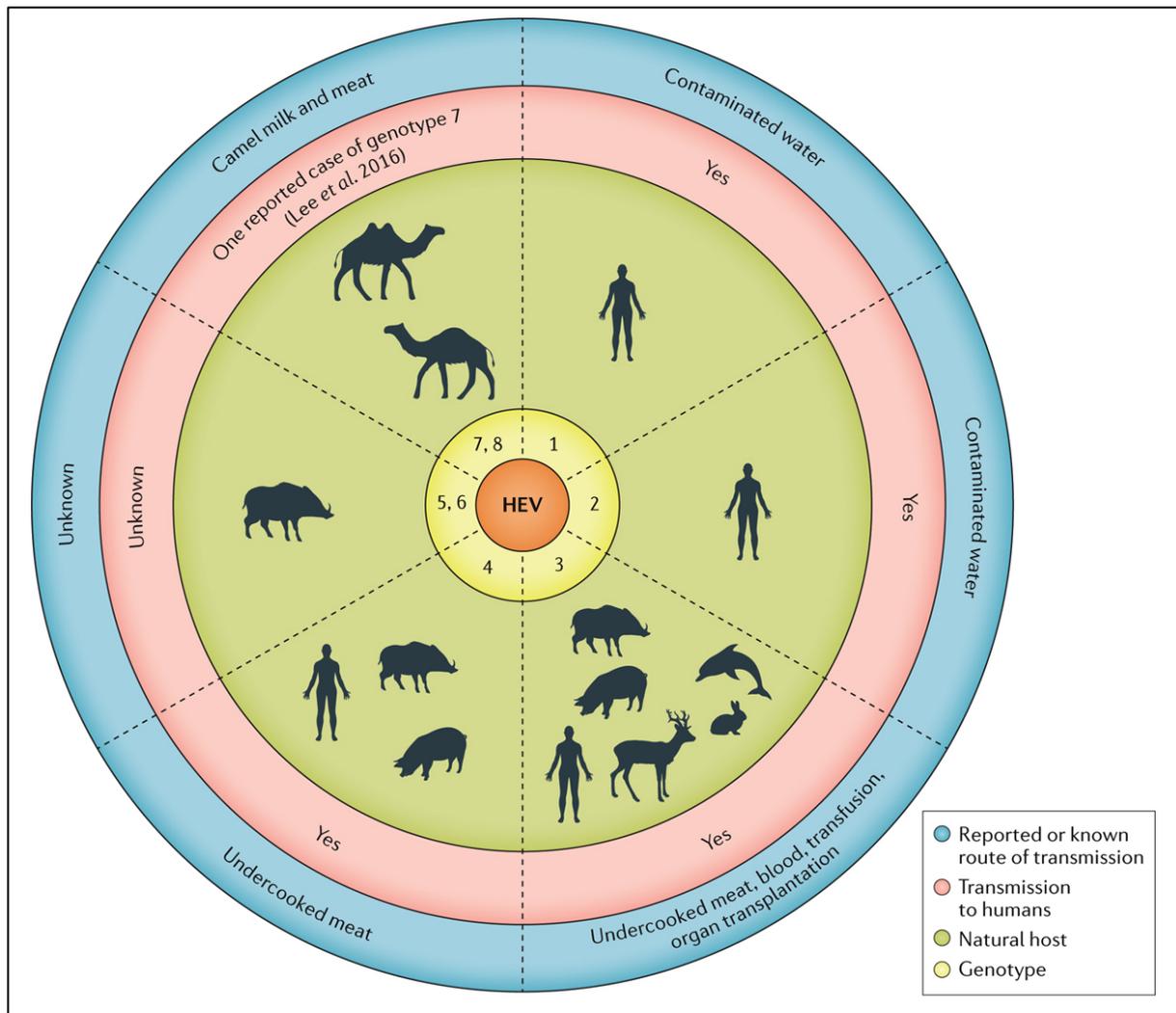


Figure 2: Transmission des différents génotypes du HEV et leurs hôtes naturels

Les HEV-1 et -2 sont strictement humains et se transmettent par voie féco-orale en consommant de l'eau ou des aliments souillés par les fèces des personnes infectées. Les HEV-3 et -4 ont plusieurs réservoirs naturels et sont transmis majoritairement à l'humain en consommant de la viande mal cuite d'animaux infectés. Les HEV-5 et -6 infectent les sangliers. La transmission de ces 2 derniers HEV à l'humain n'a pas encore été mise en évidence. Les HEV-7 et -8 infectent les camélidés (dromadaires et chameaux). Un cas de transmission humain du HEV-7 a été décrit chez un patient vivant aux Emirats Arabes Unis après une consommation de viande et de lait de dromadaire. D'après (Nimgaonkar et al. 2018).

Ainsi, ces études montrent que le HEV circulent sous forme de plusieurs génotypes ayant différents réservoirs animaux. L'humain est un hôte permissif à plusieurs de ces génotypes. Cela ouvre les questions de franchissement de la barrière d'espèce, de co-infections éventuellement d'émergence de virus mutants et virulents comme cela a été le cas pour les virus influenza pandémiques (Pour revue voir (Munier et al. 2010; Reid & Taubenberger 2003)). Aucune étude n'a jusqu'à présent étudié le risque potentiel de la co-infection des différents gt du HEV *in vitro* ou *in vivo*.

3. SIGNES CLINIQUES ET PATHOGENESE

Le HEV a un tropisme hépatique. Cependant, des manifestations extra-hépatiques telles que neurologiques, pancréatiques et rénales ont été observées. Les mécanismes de la pathogénèse du HEV sont essentiellement connus grâce aux études sur des modèles animaux et en culture cellulaire. Les données sur l'humain restent incomplètes. Le HEV infecte ses hôtes par la voie gastro-intestinale dans la grande majorité des cas. Chez l'humain, la période d'incubation varie entre 2 à 10 semaines. Pendant cette période d'incubation, le virus traverse les muqueuses intestinales pour atteindre le foie *via* la veine porte et se réplique dans les hépatocytes (Pour revue voir (Aggarwal & Goel 2018)). Des études chez les primates non humains (Singe Owl et Cynomolgus) ont montré que la réplication hépatocytaire du HEV débute environ 7 jours après inoculation parentérale et affecte 70 à 90% des cellules (Ticehurst et al. 1992).

La réplication hépatocytaire induit des lésions responsables des manifestations cliniques. La virémie apparaît plusieurs jours avant le début des symptômes, atteint son pic au même moment que l'élévation des transaminases, signe d'une atteinte hépatique. L'excrétion des particules virales dans les selles débute en même temps que la période de virémie (mais persiste 2 semaines environ après la fin de cette période) (pour revue voir (Aggarwal & Krawczynski 2000)).

En système simien, la présence des transaminases dans le sérum correspond à l'apparition des lésions hépatiques et, de manière concomitante, à la présence des anticorps spécifiques contre le HEV et à la réduction du taux de virémie. Ceci suggère que les lésions hépatiques au cours d'une infection par le HEV seraient dues à la destruction des cellules infectées par la réponse immunitaire, notamment par l'action des lymphocytes, et non à la réplication du virus en elle-même (Aggarwal & Goel 2018).

La réponse immunitaire déterminerait alors l'évolution des signes cliniques (infection auto-résolutive, hépatite aiguë, fulminante ou chronique). C'est la raison pour laquelle les personnes immuno-déprimées infectées par les HEV-3 et -4 n'arriveraient pas à combattre efficacement le virus et seraient, de ce fait, susceptibles de développer une infection chronique et plus fréquemment des manifestations extra-hépatiques (Lhomme et al. 2016; Hoofnagle et al. 2012; Debing, Moradpour, et al. 2016).

3.1. Hépatite aiguë

Les symptômes d'une hépatite E aiguë sont assez similaires à ceux retrouvés dans d'autres hépatites virales. Elle peut se diviser en trois phases : une phase prodromale, une phase ictérique et une phase de convalescence. **(i)** La phase prodromale est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal avec des symptômes tels que l'anorexie, la perte d'appétit, la fièvre, les nausées intenses, des vomissements, une fatigue et des douleurs généralisées (Aggarwal 2011). Au cours des épidémies d'hépatite E causées essentiellement par les HEV-1 et -2, la phase prodromale était présente chez environ 61% des patients pendant une durée assez variable (1 à 10 jours). Les symptômes les plus fréquents étaient l'anorexie (79%), les urines foncées (58%), les nausées et vomissement (46%), la fièvre (44%) des gastralgies (41%) suivis par d'autres symptômes tels que des démangeaisons (20%). Les examens de laboratoire ont révélé un taux de transaminases sériques (ALT et AST) élevé et un taux de bilirubine normal ou légèrement élevé (Aggarwal & Goel 2018). **(ii)** La phase ictérique ou phase de jaunisse se manifeste après la phase prodromale. Elle est caractérisée par l'apparition de jaunisse cutanéomuqueuse. Dans cette phase, on observe une diminution des symptômes et des signes prodromiques. On observe également à l'examen clinique une légère hépatomégalie et splénomégalie. Les examens de laboratoire montrent une élévation du taux de bilirubine sérique avec une diminution des transaminases sériques comparée à la phase prodromique. On peut également observer une augmentation de la phosphatase alcaline et de la gamma glutamine transpeptidase. Cette phase ictérique peut durer 2 à 4 semaines suivie d'une résolution spontanée. **(iii)** Il s'ensuit la phase de convalescence. Cette phase est caractérisée par une rémission progressive et graduelle des symptômes, la taille du foie et de la rate redevient normale, ainsi que le taux de bilirubine et de transaminases sériques (pour revue voir (Aggarwal & Goel 2018; Kamar & Pischke 2018)). Dans certaines conditions, l'évolution des hépatites E aiguë peut être très sévère et conduire à des formes fulminantes.

3.2. Hépatite fulminante

3.2.1. Dans la population générale

Environ 1% de patients souffrant d'une hépatite E aiguë développent une hépatite E fulminante. L'hépatite E fulminante débute très souvent comme une hépatite aiguë classique, puis les patients développent très vite des signes de défaillance hépatique appelée « syndrome encéphalopathie hépatique et prolongation du temps de prothrombine ».

Ce syndrome serait dû à une perte rapide des fonctions hépatiques. Les patients souffrant d'une hépatite E fulminante présentent une atrophie hépatique induite par une nécrose massive des cellules du foie. Une hypo-albuminémie et un prolongement du temps de coagulation sont également observés. Des signes neurologiques sont également rapportés en cas d'hépatite fulminante, notamment des œdèmes cérébraux et l'augmentation de la pression intracrânienne. C'est une urgence médicale qui nécessite une transplantation de foie avec un taux de mortalité très souvent élevé (40 à 60%) (Bhatia et al. 2008).

L'analyse des tissus du foie obtenus *post-mortem* des patients victimes d'une hépatite E fulminante montre des lésions telles que : des nécroses hépatocytaires, l'inflammation de la veine porte, la prolifération des canaux biliaires, une cholangite lymphocytaire, des corps apoptotiques, une cholestase et une stéatose (Aggarwal 2011).

La pathogénèse de l'hépatite E fulminante reste controversée. Il a été longtemps considéré que la survenue des hépatites E fulminantes serait liée à la différence de *gt*, mettant très souvent le HEV-1 en cause (Smith & Simmonds 2015). Cependant, une analyse approfondie de la littérature montre que les HEV-1 (Pujhari et al. 2010; Mishra et al. 2013), HEV-2 (Maila et al. 2004), HEV-3 (Shimata et al. 2018; K. Takahashi et al. 2009), et HEV-4 (Miyashita et al. 2012; Inoue et al. 2006) sont tous à l'origine d'hépatites fulminantes. La cause de ces hépatites fulminantes serait donc due à des facteurs spécifiques de l'hôte tels que la grossesse (Jilani et al. 2007; Patra et al. 2007) et des défaillances hépatiques pré-existantes (Hamid et al. 2002; Ramachandran et al. 2004).

La réponse immunitaire pourrait également être impliquée dans la pathogénèse des hépatites E fulminantes. Les patients souffrant d'une hépatite E fulminante présentent des taux d'IgM et d'IgG anti-HEV, d'IFN gamma, de TNFalpha, d'IL-2 et d'IL-10 comparativement plus élevés que ceux des patients ayant guéri spontanément (Saravanabalaji et al. 2009; Srivastava et al. 2011).

En plus, des études ont montré une infiltration importante des lymphocytes CD8 et CD4 dans le foie des patients présentant une hépatite E fulminante (Prabhu et al. 2011) montrant aussi le rôle de ces effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire dans la pathogénèse des hépatites fulminantes.

3.2.2. Chez les femmes enceintes

L'infection par le HEV conduit à un taux de mortalité d'environ 1% dans la population générale. Cependant, chez les femmes enceintes, cette infection virale cause des formes sévères d'hépatites fulminantes, induisant une décompensation hépatique, une rupture de la membrane placentaire, des avortements spontanés, la naissance d'enfants morts-nés et un taux de mortalité pouvant être 30 fois plus élevé que celui de la population générale (Pérez-Gracia et al. 2017). Le taux de mortalité prénatale due au HEV est estimé à environ 3000 décès par an (pour revue voir (Rein et al. 2012)). Le taux de transmission du HEV de la mère au nouveau-né peut atteindre 100% (R. M. Kumar et al. 2001). L'évolution clinique de l'hépatite E chez la femme enceinte est assez classique avec la survenue d'une hépatite aiguë comparable à la symptomatologie de la population générale. Cependant, elle progresse très rapidement vers une hépatite fulminante qui se manifeste par une coagulation intravasculaire, une encéphalopathie et un œdème cérébral dans environ 70% des cas (Khuroo & Kamili 2003). Le coma hépatique est la complication la plus fréquente conduisant à un décès dans près de 100% des cas (Khaskheli et al. 2015). En fonction de la charge virale, l'avortement spontané, la mortalité fœtale, la naissance d'enfants prématurés ou morts-nés surviennent dans environ 56% des cas au troisième trimestre de la grossesse (Chaudhry et al. 2015).

Les données cliniques sur les femmes enceintes infectées par le HEV sont connues grâce aux épidémies dans les pays en développement où les HEV-1 et -2 sont prédominants. Des cas d'hépatite E ont aussi été notifiés dans les pays industrialisés chez les femmes enceintes notamment en France et en Allemagne mais l'évolution est très souvent moins sévère comparée aux pays en développement (Pérez-Gracia et al. 2017). Cette différence serait due non seulement au HEV-3 et -4 qui induisent une symptomatologie moins sévère que les HEV-1 et -2 mais aussi à la différence de performance des plateaux techniques dans les hôpitaux (Pérez-Gracia et al. 2017) et probablement aussi, à la charge virale ingérée au cours de la primo-infection.

La sévérité de l'hépatite E chez les femmes enceintes s'expliquerait par une diminution des acteurs de la réponse immunitaire afin de protéger le fœtus au cours de la grossesse et du statut hormonal de la femme enceinte. Sur le plan immunitaire, il existe, au cours de la grossesse, une diminution de la réponse cellulaire notamment du taux de lymphocytes CD4 et une augmentation des lymphocytes CD8. Ce changement de la réponse immunitaire serait dû à une augmentation du taux de progestérone, œstrogène et de gonadotropine (pour revue voir (Navaneethan et al. 2008)).

Des études ont également montré que l'augmentation de ces hormones favorise la réplication virale du HEV (Pérez-Gracia et al. 2017).

Il a aussi été démontré que, chez la femme enceinte souffrant d'hépatite E fulminante, la protéine p65 du complexe de transcription NF-kB était inhibée (Prusty et al. 2007). Ces modifications hormonales, immunologiques et cellulaires seraient à l'origine de la sévérité observée au cours d'une hépatite E fulminante chez les femmes enceintes. Gouilly et collaborateurs ont montré récemment que le gt impliqué dans l'infection de la femme enceinte est responsable de cette sévérité. En effet, Gouilly et collaborateurs ont montré en système *ex vivo* que le HEV-1 a une grande capacité de réplication et cause des lésions plus importantes dans les cellules placentaires et de l'endomètre que le HEV-3. Le HEV-1 induit une apoptose significative des tissus placentaires modifiant ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Gouilly et al. 2018).

3.3. Hépatite Chronique

L'hépatite E aiguë peut persister et devenir chronique chez les personnes immunodéprimées, infectées par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Dalton et al. 2009; Kenfak-Foguena et al. 2011), sous immuno-modulateurs suite à une transplantation, ou chez des personnes subissant une chimiothérapie (Kamar et al. 2008; Haagsma et al. 2008) ou souffrant de lymphomes (Tamura et al. 2007).

L'hépatite E chronique est définie comme une persistance de la réplication du génome viral et des signes d'inflammation hépatique pendant plus de 3 mois. Les HEV-3 et -4 sont très souvent associés aux hépatites E chroniques. Les HEV-1 et 2 n'ont pas été identifiés dans ces formes d'hépatite à ce jour (pour revue voir (Kamar & Pischke 2018)). L'hépatite E chronique peut rapidement évoluer en cirrhose du foie (Kamar et al. 2008) pouvant conduire à une mort rapide (pour revue voir (Lhomme et al. 2016)). Une publication récente a révélé que le HEV serait probablement à l'origine d'hépatocarcinomes dans des rares cas (Colson et al. 2019). Une autre étude a montré que l'infection par le HEV conduit à la chronicité chez 66% des patients transplantés. La pathogénèse des hépatites E chroniques chez les patients transplantés peut s'expliquer par la prise d'immuno-suppresseurs. En effet, le tacrolimus est un immunosuppresseur utilisé chez les patients transplantés agissant en réduisant la réponse immune cellulaire (Kamar, Garrouste, et al. 2011). Chez les patients immunodéprimés par le VIH, une réduction du taux de lymphocytes CD4 à moins de 200 cellules/mm³ expliquerait la persistance du HEV (Kenfak-Foguena et al. 2011). Ces études montrent le rôle de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4+ dans la clairance du HEV.

La réduction des doses d'immunosuppresseurs au cours du traitement induit la clairance du HEV (Kamar, Garrouste, et al. 2011). Les facteurs virologiques seraient également en cause dans l'hépatite E chronique. En effet, une étude a montré que la complexité/diversité des régions M et P de la capsid virale (diversité évaluée sur le plan nucléotidique) était plus élevée chez les patients transplantés ayant développé une hépatite chronique que chez les patients guéris. Cette grande diversité génétique de quasi espèces modulerait la réponse immunitaire de l'hôte (Lhomme et al. 2012). Ce même mécanisme a été décrit pour le HCV (Virus de l'hépatite C). Il a été démontré qu'une diversité génétique de la HVR1 (région hypervariable 1) de la protéine d'enveloppe E2 au cours d'une hépatite C aiguë est associée au passage à la chronicité (Farci et al. 2000).

3.4. Manifestations extra-hépatiques

Sur le plan clinique, le HEV est à l'origine de plusieurs manifestations extra-hépatiques notamment neurologiques, rénales, pancréatiques et hématologiques.

3.4.1. Manifestations neurologiques

Un nombre important de manifestations neurologiques associées au HEV a été publié récemment. Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) est la principale manifestation neurologique dont le lien avec le HEV est établi. Cependant, d'autres manifestations neurologiques en lien avec ce virus restent à confirmer : c'est le cas du syndrome de Parsonage-Turner (ou névralgie amyotrophique de l'épaule) ou des méningo-encéphalites (pour revue voir (Kamar & Pischke 2018; Kamar, Garrouste, et al. 2011; Kamar, Bendall, et al. 2011)). Kamar et collaborateurs ont montré pour la première fois la présence de l'ARN du HEV-3 dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient de 44 ans transplanté rénal faisant une hépatite E chronique associée à des manifestations neurologiques (faiblesses musculaires proximales et le syndrome pyramidal) (Kamar et al. 2010).

L'association du SGB au cours d'une hépatite E a été rapportée pour la première fois en Inde en 2000 chez un patient de 50 ans (Sood et al. 2000). A l'heure actuelle, 4,8 à 11% des SGB sont associés à une hépatite E (pour revue voir (Pischke et al. 2017)). Le SGB est très souvent associé au HEV-3. Cependant, le premier cas de SGB associé au HEV-1 a été notifié très récemment chez un patient de 30 ans en Asie du sud (Choudhary et al. 2019). Le SGB survient non seulement au cours des infections aiguës mais aussi chroniques (Comont et al. 2014).

Le SGB est une maladie auto-immune du système nerveux périphérique qui peut se manifester au cours d'une hépatite E. Elle est due à une destruction de la myéline par une action combinée des anticorps de l'hôte, du système du complément et des macrophages. Elle peut être également causée par une destruction des axones par des anticorps auto-immuns dirigés contre les gangliosides GM1 et GD1a. Les gangliosides sont des glycolipides acides retrouvés à la surface des nerfs dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques (N-acétyl-neuraminique)).

Ce syndrome survient très souvent suite à une infection virale à CMV (Cytomégalovirus), EBV (Epstein-Barr Virus), Virus Zika ou bactérienne (*Campylobacter jejuni* et *Haemophilus influenzae*) (pour revue voir (Wijdicks & Klein 2017)). Le SGB se manifeste sur le plan clinique par une douleur et fatigue des muscles symétriques (les muscles faciaux et oropharyngés sont affectés dans 50% des cas), une paralysie des muscles faciaux, des arthralgies, une perte de la sensibilité des doigts et des orteils (acroparasthésie). Des signes comme des picotements, l'absence des réflexes ostéo-tendineux (aréflexie), un dysfonctionnement de la parole suggérant une atteinte des muscles respiratoires peut aussi être présent. Il existe également des troubles de la coordination des mouvements (ataxie et hypotonie) (Comont et al. 2014; Wijdicks & Klein 2017).

La pathogénèse du SGB au cours d'une infection par le HEV n'est pas bien connue. Elle pourrait être due à la réplication du HEV dans les cellules nerveuses ou à la réponse immunitaire contre ce virus. Le HEV a montré ses capacités à infecter des lignées neuronales humaines et à se répliquer dans le cerveau de souris et de singes, laissant suggérer que ce virus pourrait également se répliquer dans le cerveau des humains (Zhou et al. 2017). Des anticorps anti-acides sialiques (N-acétyl-neuraminique) pourraient être produits au cours d'une infection par le HEV et cibler les acides sialiques présents au niveau des axones dans le système nerveux (Wijdicks & Klein 2017).

3.4.2. Manifestations rénales et pancréatiques

Les signes cliniques relatifs à une affection rénale telles qu'une faible filtration glomérulaire, une glomérulonéphrite et une cryoglobulinémie ont été récemment rapportés au cours d'hépatites E aiguës et chroniques dans les pays où les HEV-3 et -4 sont prédominants (pour revue voir (Kamar & Pischke 2018; Guinault et al. 2016)). La pathogénèse des affections rénales dues au HEV n'est pas bien connue. Cependant, la présence de l'ARN viral et des antigènes du HEV ont été identifiés dans les urines de singes et de patients infectés par le HEV (Geng et al. 2016; Marion et al. 2018).

Deux cas de transmission du HEV *via* des greffes de rein en France ont été notifiés montrant la présence du virus dans les reins des patients infectés (Pourbaix et al. 2017).

Des cas de pancréatites aiguës ont également été rapportés au cours d'hépatite E aiguë ou fulminante (pour revue voir (Aggarwal & Goel 2018)).

Plusieurs autres manifestations extra-hépatiques ont été identifiées au cours d'une infection par le HEV. C'est le cas des hémolyses (Abid & Khan 2002) et des thrombocytopenies (Singh & Gangappa 2007).

4. DIAGNOSTIC D'UNE HEPATITE E

Le diagnostic en laboratoire d'une hépatite E peut se faire de manière indirecte ou directe.

4.1. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de l'hépatite E se fait par la détection des anticorps anti-HEV présent dans le sérum. Plusieurs tests diagnostiques sont commercialisés pour détecter les anticorps anti-HEV mais aucun n'est validé par un organisme agréé (pour revue voir (Nan & Y.-J. Zhang 2016) (Guerra et al. 2017)). La spécificité de ces tests varie entre 78,2 et 95,6% et la sensibilité varie entre 72 et 98%, ce qui induirait donc des faux négatifs et faux positifs (Drobeniuc et al. 2010). Une étude a montré qu'un test diagnostique basé sur la recherche d'IgM anti-HEV donnait des faux positifs en raison d'une réactivité croisée avec des anticorps anti-EBV et CMV. Cette même étude montrait que seuls 13 % des sérums positifs aux IgM anti-HEV étaient positifs à la RT-qPCR (Hyams et al. 2014). Les tests diagnostiques directs tels que la détection du génome viral ou une des protéines du virus restent donc les plus fiables.

4.2. Diagnostic direct

La détection du génome du HEV constitue la méthode la plus fiable pour diagnostiquer une hépatite E. L'ARN viral est détecté dans le sang des patients infectés au début de la phase symptomatique, 10 à 15 jours post-infection puis atteint son pic à environ 4 semaines post-infection puis chute significativement à la sixième semaine. L'ARN viral peut encore être détecté dans les selles 2 semaines après la chute de la virémie. La détection de l'ARN viral dans le sérum et dans les selles se fait par RT-qPCR (pour revue (Guerra et al. 2017; Kamar & Pischke 2018)).

Des tests directs permettant d'identifier la protéine ORF2 (protéine antigénique majeure du HEV) sont commercialisés. Le plus utilisé en clinique est le test ELISA-Wantaï (Wantaï

HEV-antigen ELISA^{Plus}). Ce kit a été décrit comme ayant une spécificité de 100% (Lapa et al. 2016) et une très bonne sensibilité bien qu'étant faible comparée à la RT-qPCR (Behrendt et al. 2016). Malgré une faible sensibilité de ce test comparé à la RT-qPCR, il reste néanmoins un outil important dans le diagnostic du HEV dans les pays en développement où les tests de diagnostic moléculaire ne sont pas accessibles. Cependant, les résultats de ce kit doivent être interprétés avec prudence. En effet, des études ont montré que ce kit Wantai donnait des résultats positifs lorsque la recherche du génome viral était négative par RT-qPCR (Lapa et al. 2016; Behrendt et al. 2016).

Nous avons montré que le HEV secrète des formes de sa protéine de capsid ORF2 (ORF2g et ORF2c) non associées au génome viral dans le sang des patients infectés par le HEV. Nous avons montré également que le kit Wantai-Antigen détectait préférentiellement ces formes de la protéine ORF2 non associées au génome viral présentes dans le sérum des patients infectés par le HEV (Montpellier et al. 2018) (**Annexe 2**). La présence de la protéine ORF2 en l'absence de l'ARN viral s'expliquerait aussi par le fait que cette protéine est assez stable en culture cellulaire et reste probablement longtemps dans le sérum des patients même après clairance des particules infectieuses contenant l'ARN viral (Behrendt et al. 2016). Cela montre les limites de ce kit dans le diagnostic d'une infection active du HEV. Afin de clarifier cela, une étude a été menée sur la cinétique d'apparition de la protéine ORF2 dans le plasma et les selles de souris au foie humanisé. Les résultats de cette étude ont montré que, contrairement à l'ARN viral, les niveaux d'ORF2 étaient plus élevés dans le plasma des souris infectées que dans leurs selles. Fait intéressant, la protéine ORF2 était détectée dans le plasma de souris dont l'ARN viral était négatif dans le plasma, mais positif dans les selles. Ceci après clairance virale par traitement à la ribavirine (Sayed et al. 2019).

De manière globale, le diagnostic du HEV repose sur l'analyse combinée des signes cliniques et des résultats d'examens de laboratoire tels que le taux de transaminases et la présence des anticorps anti-HEV et/ou du génome viral dans le sérum et les selles des patients.

5. TRAITEMENTS CONTRE LE VIRUS DE L'HEPATITE E

Aucun traitement spécifique contre le HEV n'a été développé à ce jour. Cependant, des antiviraux à large spectre ont montré une activité antivirale contre ce virus (Anang et al. 2018). Les hépatites E sont très souvent résolutives sans aucun traitement antiviral. Cependant, au cours des hépatites E aiguës sévères et chroniques, un traitement est nécessaire.

La ribavirine en monothérapie ou combinée avec l'interféron pégylé-alpha (IFN-PEG-a) est utilisé pour le traitement des hépatites E. Le taux de guérison varie entre 80 et 100%. (Kamar, Garrouste, et al. 2011; Mallet et al. 2010; Pischke et al. 2013; Gerolami et al. 2011). Le traitement du HEV par la ribavirine dure environ 3 à 6 mois (Anang et al. 2018). Il faut préciser qu'en cas d'hépatite chronique chez des patients transplantés, la réduction des doses d'immunosuppresseurs assure une clairance virale dans plus de 30% des cas (Kamar, Garrouste, et al. 2011). La ribavirine agit en inhibant l'inosine monophosphate deshydrogenase, déplaçant ainsi le taux de GTP de la cellule hôte et de ce fait inhibe la réplication virale (Debing, Emerson, et al. 2014). Des cas de résistance à cet antiviral ont été notifiés. C'est le cas de la mutation G1634R dans la polymérase virale qui augmente la réplication du génome viral permettant ainsi d'échapper à l'action de la ribavirine (Debing, Gisa, et al. 2014; Lhomme et al. 2015; Todt et al. 2016). Cet antiviral présente d'autres inconvénients. Il n'est pas conseillé au cours de la grossesse à cause de ses effets tératogènes. En plus, la ribavirine cause plusieurs effets indésirables tels que des anémies hémolytiques, des insomnies, et des dyspnées (Wawrzynowicz-Syczewska 2002).

Il a aussi été démontré que le sofosbuvir, analogue nucléosidique de l'uridine inhibe la réplication du HEV-3 *in vitro*. La combinaison du sofosbuvir à la ribavirine accentue cette inhibition (Dao Thi et al. 2016). De plus, une autre équipe a rapporté un cas de guérison d'une hépatite E chronique suite à un traitement par le sofosbuvir combiné à la ribavirine chez un patient de 57 ans après un échec de traitement par la ribavirine en monothérapie (Drinane et al. 2019). La combinaison ribavirine-sofosbuvir a également été efficace dans le traitement d'une hépatite E aiguë chez un autre patient de 57 ans co-infecté par le HCV (Biliotti et al. 2018). Cependant, le traitement de l'hépatite E avec le sofosbuvir reste controversé. Wang et collaborateurs ont montré que le sofosbuvir n'inhibe pas la réplication du HEV *in vitro* (Wang Hakim, et al. 2016). En plus, des échecs thérapeutiques de cas d'hépatites E chroniques en utilisant la combinaison ribavirine-sofosbuvir ont été notifiés (Todesco et al. 2018).

Face à ces résultats contradictoires sur l'efficacité du sofosbuvir dans le traitement de l'hépatite E, la survenue de résistances au cours des traitements avec la ribavirine et les effets indésirables ou contre-indications de la ribavirine, il apparaît urgent de développer de nouvelles stratégies antivirales contre le HEV et, en première intention, de se protéger contre cette infection.

6. PREVENTION

La vaccination est un moyen de prévention utilisée contre les infections microbiennes. Concernant le HEV, le premier vaccin a été développé en 2000 sur les populations à haut risque d'infection au Népal (Shrestha et al. 2007). La protéine ORF2 utilisée dans cette phase clinique avait été produite en cellules d'insectes à partir d'un système recombinant de Baculovirus (Robinson et al. 1998). Bien que l'efficacité de ce vaccin atteignait les 95,5%, les recherches ont été arrêtées puisqu'il ne présentait pas à cette époque un intérêt économique majeur (Krzowska-Firych et al. 2018).

En 2010, un vaccin efficace a été développé en Chine. Ce vaccin appelé Hecolin® ou HEV 239 est basé sur une forme tronquée de la protéine ORF2 du HEV-1. La protéine ORF2 utilisée pour ce vaccin correspond aux aa 368-606. Ce vaccin est administré en trois doses (0, 1 et 6 mois) par voie intramusculaire. Il a montré une efficacité de 100% après les 3 doses et des effets indésirables sans aucune gravité chez des patients en phase clinique 3 (Zhu et al. 2010). Ce vaccin a également montré une bonne capacité de protection 2 ans après une campagne de vaccination massive de la population en Chine (J. Zhang et al. 2014). Une étude, faite à partir de données de la phase 3 d'un essai clinique sur ce vaccin et d'une modélisation, a montré que la protection induite par ce vaccin pouvait durer plus de 30 ans (Su et al. 2017). Ce vaccin pourrait induire une protection croisée contre les HEV-1 et HEV-4, comme cela a été démontré chez les singes rhésus (Li, S. W. et al. 2005). Hecolin® est jusqu'à ce jour commercialisé uniquement en Chine. D'autres études sont nécessaires pour valider l'efficacité de ce vaccin sur les autres gt du HEV, chez les femmes enceintes, les enfants et les personnes immunodéprimées (Park 2012; Nimgaonkar et al. 2018). C'est pourquoi d'autres essais cliniques sont en cours de réalisation en utilisant des formes tronquées de l'ORF2 des HEV-1, HEV-3 et HEV-4 (Cao, Y.-F. et al. 2017; Kulkarni et al. 2016; Wen et al. 2016) (Xia, M. et al. 2016).

En résumé, un vaccin pangénotypique contre le HEV n'est pas encore disponible à ce jour. Dans les pays en développement, la prévention du HEV repose sur le respect des règles élémentaires d'hygiène avec la consommation d'eau potable et d'aliments sains. Dans les

pays industrialisés, la prévention passe par la consommation de viande (porc, sanglier et cerf) cuite à point. En effet, il a été démontré que le HEV est inactivé après une cuisson de 20 minutes à 70°C. En France, le Ministère des Solidarités et de la Santé recommande aux personnes à risque (patients immunodéprimés, patients atteints d'une hépatopathie et aux femmes enceintes) d'éviter la consommation de toute viande ou de produit dérivé de porc, sanglier ou de cerf crue ou mal cuite tels que les saucisses, les quenelles de foie et les figatelles (<https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/article/l-hepatite-e>).

Le dépistage systématique du HEV au cours des dons du sang et d'organes permettrait également de limiter la transmission de ce virus au cours des transfusions sanguines, de transplantations ou de greffes d'organe (pour revue voir (Krzowska-Firych et al. 2018)).

7. CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES

7.1. Classification du HEV

Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae*. Cette famille est divisée en deux genres, le genre *Orthohepevirus* et le genre *Piscihepevirus*. Les espèces du genre *Orthohepevirus* infectent les mammifères tandis que la seule espèce du genre *Piscihepevirus* infecte la truite. Quatre espèces appartiennent au genre *Orthohepevirus* : *Orthohepevirus* A, B, C et D. Les membres de l'espèce *Orthohepevirus* A sont repartis en 8 génotypes. Les HEV-1 et -2 infectent strictement l'humain (**Figure 3**).

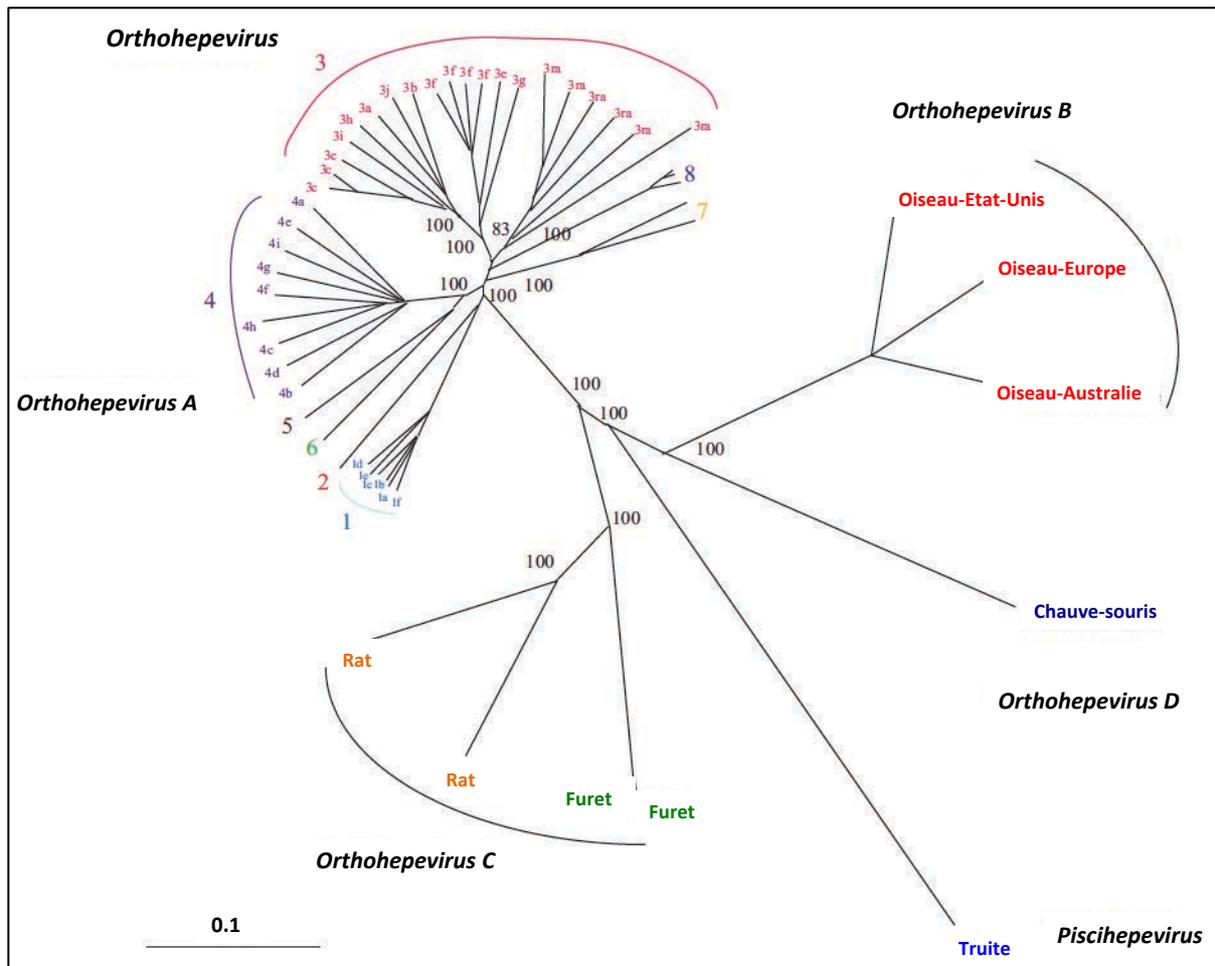


Figure 3: Arbre phylogénétique des différentes espèces et génotypes du HEV.

Cet arbre phylogénétique a été obtenu en utilisant la méthode de Neighbor-Joining à partir des séquences des génomes du HEV disponibles. Les genres *Orthohepevirus* et *Piscihepevirus* y sont représentés ainsi que les différents génotypes et sous-génotypes (en lettre). Les HEV-1 et -2 sont strictement humains et les HEV-3 à 8 ont un ou plusieurs réservoirs animaux (Adaptée de (Lhomme et al. 2018)).

Les HEV-3 et -4 infectent plusieurs mammifères tels que le porc et le sanglier ainsi que l'humain. Le HEV-3ra infecte les lapins et occasionnellement l'humain. Les HEV-5 et HEV-6 infectent les sangliers. Les HEV-7 et -8 infectent respectivement les dromadaires et les chameaux ainsi que l'humain de manière occasionnelle.

Les *Orthohepevirus B* infectent les oiseaux. Les *Orthohepevirus C* infectent les rats, les Soricidae (musaraignes), les *Peramelidae* (bandicoots) et les *Mustelidae* (visons et furets,).

Les *Orthohepevirus D* infectent les chauves-souris. D'autres membres des *Orthohepevirus* ne sont pas classés pour l'instant (**Figure 3**) (Smith et al. 2014; Doceul et al. 2016; Purdy et al. 2017).

7.2. Le génome du HEV

Le HEV possède un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7,2 kb. Le génome de ce virus est encadré par une coiffe et une queue poly A ainsi que par des régions non traduites (NCR) aux extrémités 5' et 3'. Il possède 3 cadres ouverts de lecture qui sont traduits en trois protéines appelées protéines ORF1, ORF2 et ORF3 (**Figure 4**).

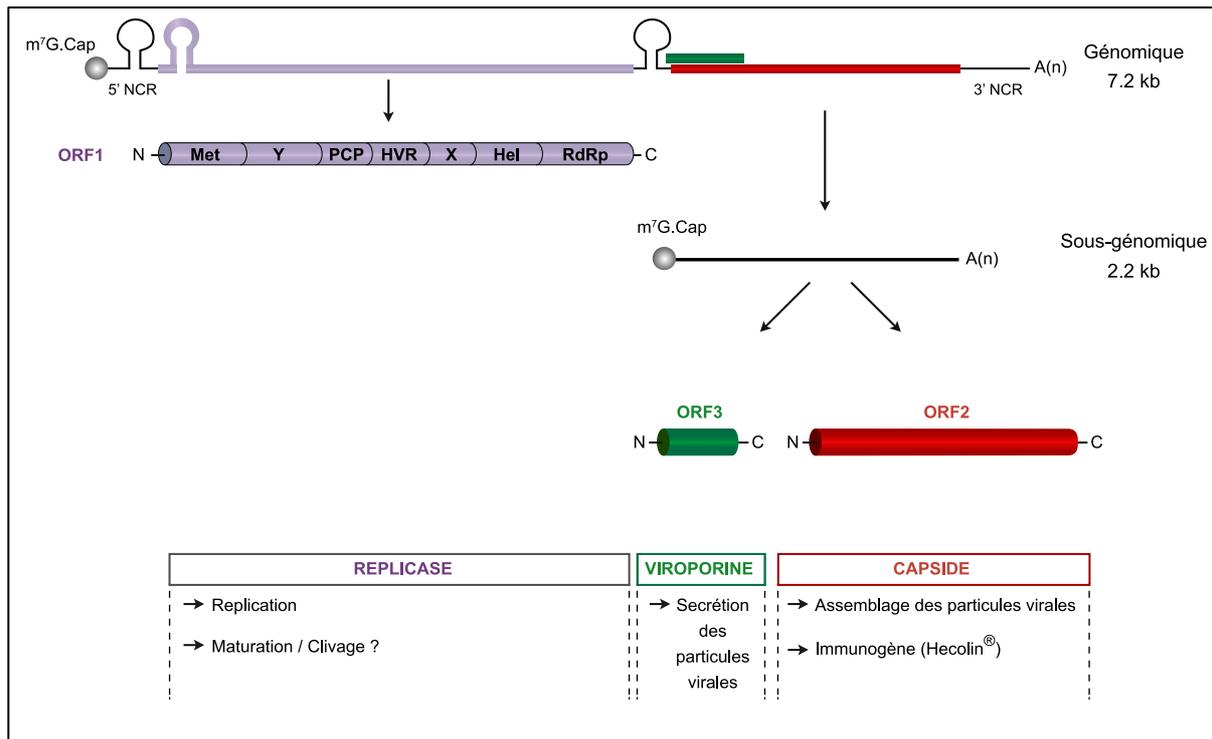


Figure 4: Structure du génome et des protéines de HEV

Le génome du HEV, d'environ 7,2kb, a une structure semblable à un ARN messager de polarité positive avec une coiffe et une queue polyA respectivement aux extrémités 5' et 3'. Ce génome code trois protéines virales appelées protéines ORF1, ORF2 et ORF3 à partir de trois cadres ouverts de lecture. Ces cadres de lecture sont encadrés par des régions non codantes (NCR). Les protéines ORF2 et ORF3 sont traduites à partir d'un ARN sous-génomique bicistronique. La protéine ORF1 avec ses différents sous domaines (voir paragraphe 7.3.1.1) et les protéines ORF2 et ORF3 sont représentées ainsi que leurs fonctions. En violet : la protéine ORF1, en rouge : la protéine ORF2 et en vert foncé : la protéine ORF3. La protéine ORF4 qui a été décrite récemment n'est pas sur cette figure. N : extrémité amino-terminale ; C : extrémité carboxy-terminale ; m⁷G.Cap : coiffe ; A(n) : queue poly(A) (Ankavay et al. 2018).

Un quatrième cadre de lecture codant une protéine appelée ORF4 a été décrit uniquement chez le HEV-1 (Nair et al. 2016). Un ARN sous-génomique bicistronique d'environ 2,2 kb est à l'origine de la production des protéines ORF2 et ORF3 (Graff et al. 2006).

7.3. Les protéines virales

7.3.1. La protéine ORF1

7.3.1.1. Organisation des différents domaines de la protéine ORF1

La protéine ORF1 ou réplicase virale possède 1693 acides aminés (aa). C'est une polyprotéine non structurale impliquée dans la réplication du génome viral. Elle possède 7 domaines distincts : le domaine Methyl-transférase (Met, aa 56-240), le domaine Y qui débute en position C-terminale du domaine Met (aa 216-442), le domaine papaïne cystéine protéase (PCP) qui commence en position C-terminale du domaine Y (aa 433-592), le domaine hypervariable (HVR ou H) ou domaine riche en prolines qui est le plus petit domaine (aa 712-778), le macrodomaine X (aa 785-942), l'hélicase (Hel, aa 960-1204) et l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp, aa 1207-1693) (Koonig et al. 1992) (**Figure 5**).

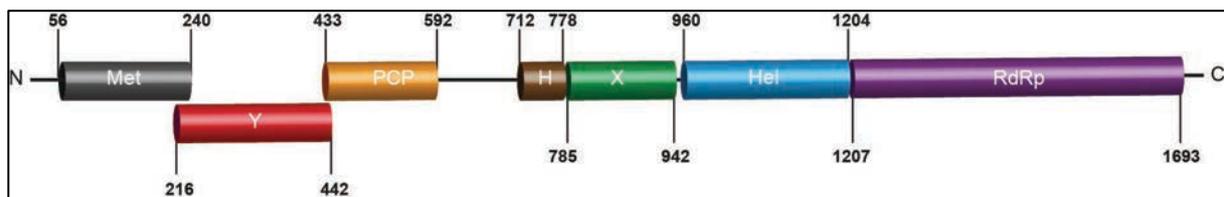


Figure 5: Les différents domaines de la protéine ORF1

La protéine ORF1 possède 1693 aa et 7 domaines distincts : le domaine Met (Methyl-transférase) en noir (aa 56-240), le domaine Y en rouge (aa 216-442) qui chevauche avec la partie C-terminale du domaine Met, le domaine papaïne cystéine protéase (PCP) en jaune (aa 433-592) qui chevauche avec la partie C-terminale du domaine Y, le domaine hypervariable (HVR ou H) ou domaine riche en prolines en marron (aa 712-778 : H), le macrodomaine X (aa 785-942) en vert, l'hélicase (Hel: aa 960-1204) en bleu et l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) (aa 1207-1693) en violet. Les positions des différents domaines sont précisées sur la figure ainsi que les positions N-terminale (N) et C-terminale (C). Les domaines qui se chevauchent sont indiqués par des décalages (Met, Y et PCP). Les espaces inter-domaines sont présentés par des tirets. Adaptée de (Koonig et al. 1992) et de (Proudfoot et al. 2019).

Ces domaines putatifs ont été déterminés par bio-informatique en comparant la séquence de la polyprotéine ORF1 du HEV à d'autres protéines non structurales de virus à ARN de polarité positive tels que le virus de la rubéole, le beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) ou virus des nervures jaunes nécrotiques de la betterave et le furovirus qui infecte également les plantes (Koonig et al. 1992).

7.3.1.2. Fonctions des différents domaines de la protéine ORF1

Les fonctions exactes des domaines Y, HVR et X ne sont pas bien connues contrairement à celles des domaines Met, PCP, Hel et RdRp qui ont été décrites dans plusieurs études.

Le domaine Met (aa 56-240) est important pour la coiffe de l'ARN génomique et possède les fonctions méthyltransférase et guanylyltransférase (Magden et al. 2001).

Le domaine Y (aa 216-442) possède des cystéines bien conservées (C336-C337) qui seraient des sites de palmitoylation permettant à la protéine ORF1 d'interagir avec les membranes cellulaires des compartiments de la voie de sécrétion comme le RE et le Golgi (pour revue voir (Lhomme et al. 2018)). La mutation de ces cystéines inhibe la réplication du génome viral montrant l'importance de ces résidus dans le cycle infectieux du HEV (Parvez 2017).

Le domaine PCP (aa 433-592) possède une activité chymotrypsine (Paliwal et al. 2014) et déubiquitine de RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene-I) et TBK-I (TANK-Binding Kinase-I) inhibant ainsi la réponse immunitaire interféron (Nan et al. 2014).

Le domaine HVR (aa 712-778) est un domaine non structuré riche en proline. Aucun rôle précis ne lui a été attribué pour l'instant. Cependant, c'est un domaine qui tolère des insertions. L'insertion de quelques aa provenant des protéines ribosomales S17 et S19 dans ce domaine procure une haute capacité de réplication et de culture au HEV *in vitro* (Shukla et al. 2011; Nguyen et al. 2012). Ce domaine pourrait donc être important pour l'adaptation du HEV au cours de son évolution.

Le macrodomaine X (aa 785-942) a été identifié chez d'autres virus à ARN positif simple brin comme chez les *Coronaviridae* (*SARS coronavirus and human coronavirus*) et les *Togaviridae* (*Venezuelan equine encephalitis virus*) et a une fonction ADP-ribose hydrolase importante dans la réplication du génome viral (Li, C. et al. 2016).

Le domaine Hel (aa 960-1204) augmenterait l'activité ADP ribose hydrolase du macrodomaine X (Li, C. et al. 2016).

Ce macrodomaine X inhibe également la sécrétion de la ferritine au cours du cycle infectieux du HEV jouant un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire (Ojha & Lole 2016).

Le domaine RdRp (aa 1207-1693) est important pour la réplication du génome viral. Ce domaine se fixe à l'extrémité 3' du génome viral qui possède deux boucles (SL1 et SL2) et une queue poly A pour synthétiser l'ARN négatif intermédiaire au cours de la réplication virale (Agrawal et al. 2001).

A ce jour, il n'est pas connu si la polyprotéine ORF1 en système infectieux est maturée en plusieurs polypeptides. Une activité enzymatique chymotrypsine a été montrée pour le domaine PCP qui permettrait de cliver les protéines ORF1 et ORF2. Des auteurs ont également montré que le facteur Xa et la thrombine étaient essentiels pour la réplication de HEV et pourraient être impliqués dans la maturation de l'ORF1 (Kanade et al. 2018). Mais ces résultats sont encore controversés puisqu'aucune équipe n'a pu montrer la maturation de l'ORF1 en système infectieux. Très récemment, un domaine protéase à Zinc présentant un domaine de liaison aux acides gras a été identifié et sa structure cristallographique résolue (Proudfoot et al. 2019).

7.3.2. La protéine ORF2

7.3.2.1. Organisation générale de la protéine ORF2

La protéine ORF2 est la plus étudiée des protéines du HEV (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)). C'est la protéine de capsid virale. La protéine ORF2 est une glycoprotéine de 660 aa, qui possède un peptide signal (PS) en position N-terminale (23 premiers aa). Elle possède également trois sites potentiels de N-glycosylation qui sont situés respectivement au niveau des Asparagines 137 (séqun N-L-S-T) ; 310 (séqun N-L-T-P) et 562 (N-T-T-A) (Jameel et al. 1996; Zafrullah et al. 1999) (**Figure 6**). Plusieurs aspects du rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV restent à élucider.

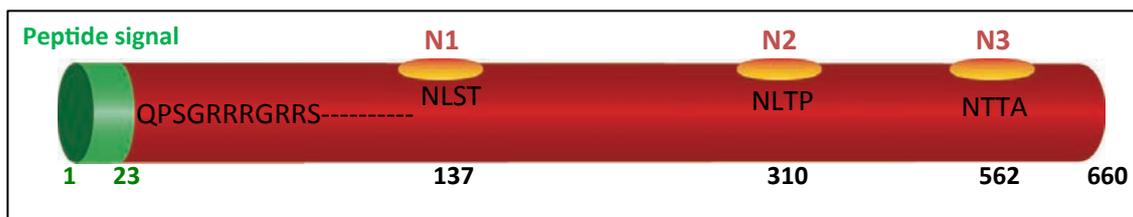


Figure 6: Structure schématique de la protéine ORF2

La protéine ORF2 possède 660 aa. Elle a un peptide signal en position N-terminale (en vert). C'est une glycoprotéine qui contient trois sites potentiels de N-glycosylation représentés en orange. Les positions des aa correspondant au peptide signal et aux trois sites de N-glycosylation y sont représentées. Une séquence riche en argines (SeqR) en aval du PS est aussi présentée.

Trois domaines distincts ont été décrits pour cette protéine ORF2 : les domaines Shell (S), Middle (M) et Protruding (P) (**Figure 7**)

Le domaine S est situé au niveau des acides aminés 129-319. Il forme une structure interne de la particule virale et est constitué de 8 feuilletés bêta anti-parallèles disposés en sandwich et de 4 hélices alpha.

Le domaine M est situé au niveau des aa 320-455. Ce domaine a une structure torsadée constituée de 6 feuillets bêta et de 4 hélices alpha. Il est exposé à la surface de la particule et est étroitement associé au domaine S.

Le domaine P, situé entre les aa 456-606, est lié au domaine M par une région riche en prolines. Ce domaine est formé de feuillets bêta torsadés. Le domaine P est également exposé à la surface de la particule virale (Yamashita et al. 2009; Xing et al. 2010). Il forme des *spikes* à la surface de la particule virale au niveau des acides aminés 482-490, 550-566 et 583-593.

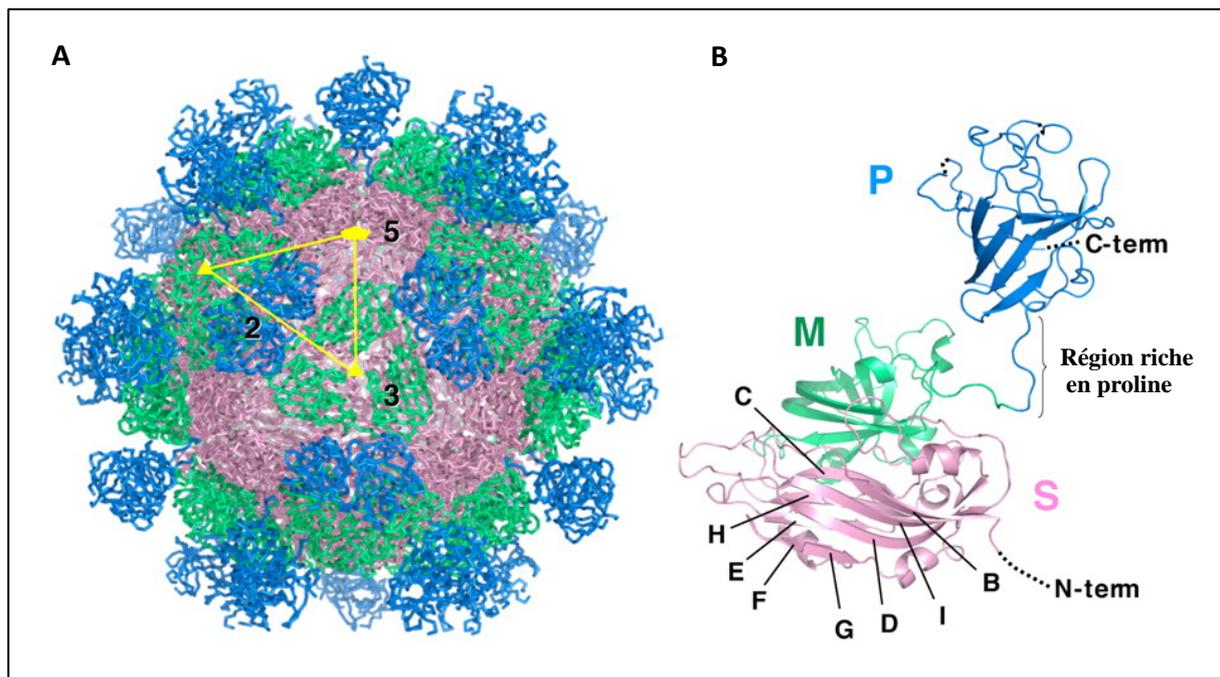


Figure 7: Structure cristallographique de la protéine ORF2

Les domaines S, M et P sont respectivement en rose, vert et bleu. (A) HEV-VLP est constitué de 16 protéines de capsid formant une sous-unité icosaédrique de 2, 3 et 5 axes indiquant une symétrie T=1. (B) La schématisation de la protéine ORF2 en 3 dimensions montre les domaines S, M et P du bas vers le haut. Les régions désordonnées sont présentées en pointillés. Les feuillets anti-parallèles conservés du domaine S sont représentés par les lettres B, C, D, E, F, G, H et I. (D'après (Yamashita et al. 2009)).

Les images de cryo-microscopie électronique révèlent 90 *spikes* à la surface de la capsid virale du HEV. Ces *spikes* joueraient probablement un rôle dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires (Xing et al. 2010; Guu et al. 2009).

Aucun récepteur spécifique utilisé par le HEV n'a été identifié à ce jour. Cependant, Yamashita et collaborateurs en se basant sur la structure cristallographique de la protéine ORF2 combinée à des approches de mutagenèse dirigée, de test de fixation des HEV-LP aux cellules Huh-7 et à la technique de cytométrie en flux ont montré que les aa T489, P491, N560, Y561, N562, T564, T585 et T586 situés dans le domaine P de l'ORF2 pourraient être impliqués dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du HEV.

Le domaine P possède également plusieurs sites antigéniques utilisés dans le développement des vaccins contre le HEV (Yamashita et al. 2009).

7.3.2.2. La protéine ORF2 associée au génome viral

Les 111 premiers acides aminés de la protéine ORF2 en position N-terminale auraient la capacité de se fixer au génome viral en 5' au niveau des nucléotides 130 à 206 du génome viral qui forment des boucles. Cette partie N-terminale de la protéine ORF2 est riche en résidus arginines (Surjit et al. 2004).

La protéine ORF2 s'assemble en capsidie icosaédrique autour du génome viral. Il a été montré que les particules virales présentent une capsidie icosaédrique de type T=3. Les monomères de capsidie s'assembleraient pour former des décamères (pentamères de dimères) qui encapsident l'ARN viral. La capsidie serait constituée de 180 copies disposées en icosaèdre ((Xing et al. 2010) (pour revue voir Ankavay et al. 2018)).

Comme le virus de l'hépatite A (HAV), le HEV est un virus quasi-enveloppé (pour revue voir Feng et al. 2014). En effet, les particules virales retrouvées dans les selles des patients sont nues tandis que celles retrouvées en culture cellulaire ou dans la circulation sanguine des patients infectés sont recouvertes d'une couche lipidique dans laquelle la protéine ORF3 serait enchâssée (**Figure 8**). L'absence de lipides sur les particules virales du HEV présentes dans les selles des patients laisse suggérer qu'une délipidation aurait lieu au cours du passage de celles-ci dans le tractus digestif par des lipases intestinales. Les particules virales non enveloppées sont 10 fois plus infectieuses que les particules nues *in vitro* (pour revue voir (Himmelsbach et al. 2018)).

En microscopie électronique, les particules virales nues obtenues en culture cellulaire ont un diamètre moyen d'environ 28 nm tandis que les particules virales enveloppées ont un diamètre moyen de 55 nm. Cependant, la taille des particules virales enveloppées retrouvées chez certains patients infectés par le HEV peut atteindre un diamètre moyen de 120 nm. Le statut lipidique des patients pourrait expliquer cette différence de taille (Montpellier et al. 2018).

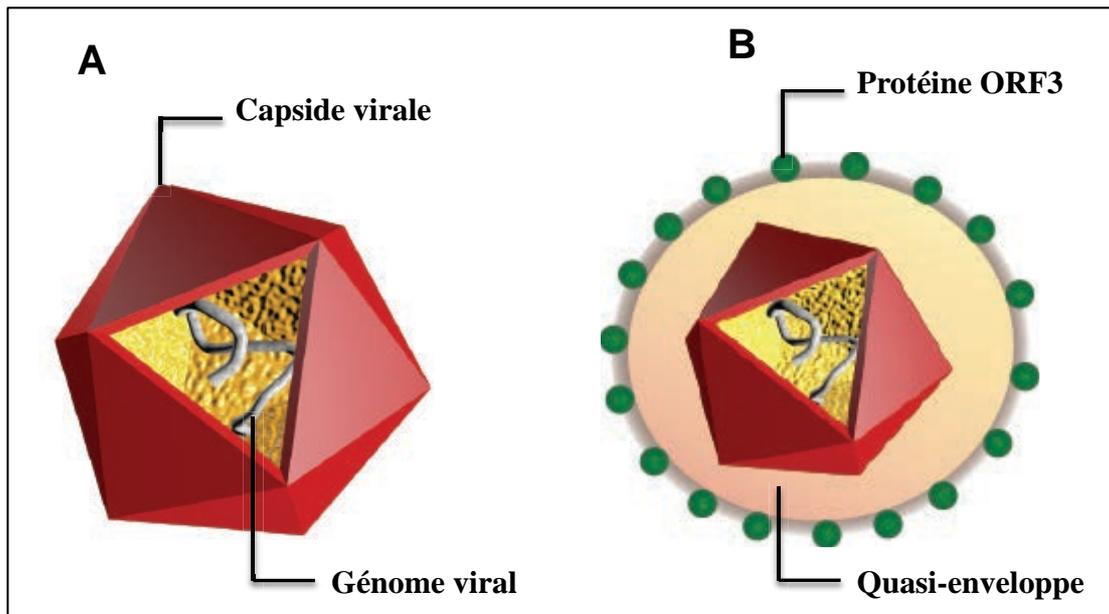


Figure 8: Particules virales du HEV

(A) Shéma de la particule nue du HEV: La capside virale et le génome sont indiqués. (B) Shéma de la particule virale quasi-enveloppée : La quasi-enveloppe dans laquelle est enchassée la protéine ORF3 est représentée.

7.3.3. La protéine ORF3

La protéine ORF3 est une protéine de 112-115 aa d'environ 13kDa. Sa taille varie en fonction des différents gt. Elle possède deux domaines hydrophobes en position N-terminale: D1 (aa 7-23) et D2 (aa 28-53) et 2 domaines riches en prolines: P1 (aa 66-77) et P2 (aa 95-111) (pour revue voir Ahmad et al. 2012). La protéine ORF3 serait enchâssée dans la couche lipidique qui recouvre les particules virales présentes dans la circulation sanguine des patients infectés par le HEV et dans les surnageants de culture de cellules infectées par le HEV (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)). La protéine ORF3 est importante pour la sécrétion des particules virales. Elle possède un motif PSAP (95-Pro-Ser-Ala-Pro-98) bien conservé chez les différents génotypes du HEV *via* lequel elle interagit avec la protéine cellulaire tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*). La tsg101 est une protéine du complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) essentiel pour le bourgeonnement et la sécrétion des virus enveloppés (Surjit et al. 2006; Kenney et al. 2015). De plus, il a été montré que la protéine ORF3 pourrait avoir une fonction de viroporine (Anon 2017). Il a également été démontré que la protéine ORF3 interagit avec le macro-domaine X de la protéine ORF1 au cours du cycle infectieux du HEV (Anang et al. 2016) probablement pour assurer une fonction importante encore indéterminée. La protéine ORF3 est phosphorylée au niveau de la sérine 80 (Zafrullah et al. 1997). Il a été démontré que cette phosphorylation est importante pour son interaction avec la protéine ORF2 (Tyagi et al. 2002).

Elle a été décrite comme étant associée aux microtubules *via* son extrémité N-terminale hydrophobe (Kannan et al. 2009). De plus, une étude récente a montré que la protéine ORF3 possède 8 cystéines (7 pour les HEV-4 et HEV-6) à son extrémité N-terminale. Ces cystéines sont des sites de palmitoylation fonctionnels. La palmitoylation des cystéines permettrait à la protéine ORF3 d'être associée aux membranes des compartiments cellulaires (RE et Golgi). Cette protéine resterait orientée du côté cytosolique des membranes. De manière intéressante, la mutation des cystéines en position N-terminale de la protéine ORF3 induit une inhibition de la sécrétion des particules virales (Gouttenoire et al. 2018), montrant l'importance de cette modification post-traductionnelle de l'ORF3 dans le cycle infectieux du HEV.

7.3.4. La protéine ORF4

La protéine ORF4 a été identifiée en 2016 uniquement chez le HEV-1. La traduction de cette protéine est induite par un stress du RE. Ce stress du RE peut être induit *in vitro* par des composés tels que la tunicamycine (qui inhibe la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes en bloquant le transfert du N-acetylglucosamine-1-phosphate (GlcNac-1-P) au Dolichol diphosphate catalisé par la GlcNac phosphotransférase) et la thapsigargine (qui inhibe le transport actif du calcium « ATPase Ca²⁺ du réticulum sarco/endoplasmique »). La protéine ORF4 est une protéine de 139, 147 et 158 aa en fonction de la souche étudiée (Nair et al. 2016).

L'ORF4 est localisé au niveau des nucléotides 2835-3308 de l'ORF1. La protéine ORF4 est assez bien conservée chez les différentes souches du HEV-1. De manière surprenante, des anticorps dirigés contre cette protéine ont été retrouvés chez 5 patients infectés par le HEV-1.

Il a été démontré que l'expression de cette protéine augmente significativement la réplication du génome viral *in vitro* en améliorant l'activité de la réplicase. La protéine ORF4 interagirait avec plusieurs composants viraux et cellulaires pour former un complexe constitué du domaine hélicase, du macrodomaine X, de la RdRp, de la protéine ORF3 et des protéines cellulaires telles que la tubuline β et le facteur d'élongation eEF1 α 1 (*Eukaryotic Elongation Factor 1 Isoform-1*). En plus de réguler la réplication virale, la protéine ORF4 pourrait donc également réguler des fonctions cellulaires. L'expression de la protéine ORF4 est dépendante du stress du RE, qui améliore la réplication du HEV-1, ceci pourrait expliquer le fait que ce génotype se cultive difficilement en culture cellulaire dans des conditions normales (Nair et al. 2016). L'expression d'une nouvelle protéine par le HEV au cours de son cycle infectieux dans des conditions de réponse cellulaire spécifique révèle une fois de plus la capacité des virus à exploiter les mécanismes cellulaires à leur avantage (Nair et al. 2016).

7.4. Cycle de réplication du HEV

Jusqu'à très récemment, l'étude des différentes étapes du cycle infectieux du HEV était difficile du fait de l'absence d'un système de culture cellulaire efficace pour ce virus. Cependant, par analogie avec d'autres virus à ARN simple brin de polarité positive et en se basant sur les récentes publications, un modèle a été proposé. L'entrée du virus dans la cellule cible se ferait par deux voies différentes pour les particules virales quasi-enveloppées (eHEV) et les particules nues (HEV) (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)). Les particules virales nues se fixeraient à la surface des cellules cibles de manière aspécifique aux protéoglycanes à héparine sulfate, comme décrit pour plusieurs autres virus (Kalia et al. 2009) (**Figure 9**). Les récepteurs cellulaires spécifiques exploités par les particules virales du HEV ne sont pas connus à ce jour (pour revue voir (Ankavay et al. 2018)). Une étude a montré que le HEV interagissait avec les récepteurs des asialo-glycoprotéines (ASGPR) (Zhang, L. et al. 2016). Les particules virales quasi-enveloppées (eHEV) entreraient dans la cellule par voie d'endocytose dépendante de la voie clathrine, de Rab5, de Rab7, de la dynamine-2 et du cholestérol. Leur entrée dans la cellule hôte serait plus lente et moins efficace que celle des particules virales nues (Kapur et al. 2012; Holla, P. et al. 2015; Yin et al. 2016). Ensuite la dégradation des lipides autour de la particule virale aurait lieu dans les lysosomes.

Après la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte, la protéine ORF1 serait directement traduite par la machinerie cellulaire. Cette protéine (réplicase) transcrit ensuite l'ARN simple brin de polarité positive en ARN simple brin de polarité négative (ARN(-)). Ces ARN(-) serviraient de matrice pour la synthèse des ARNs génomiques d'environ 7,2 kb et sous-génomiques d'environ 2,2 kb de polarité positive. Les protéines ORF2 et ORF3 sont traduites à partir des ARN sous-génomiques de polarité positive. Une fraction de la protéine ORF2 possédant un peptide signal fonctionnel serait transloquée dans la lumière du RE pour être sécrétée dans le milieu extracellulaire et une autre fraction de cette même protéine qui possède un peptide signal non fonctionnel resterait du côté cytosolique des membranes cellulaires et servirait à encapsider l'ARN génomique (pour revue, voir (Ankavay et al. 2018) (**Figure 9**)). Plusieurs facteurs viraux et cellulaires sont importants dans la réplication du HEV. Au niveau génomique, la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2, qui présente des structures en boucle bien conservées, contient le promoteur de l'ARN sous-génomique qui code les protéines ORF2 et ORF3. Des mutations introduites dans ces boucles inhibent la réplication du génome viral (Cao, D. et al. 2010). D'autres facteurs cellulaires ont également été décrits comme étant importants pour la réplication du génome du HEV.

C'est le cas de la thrombine et du facteur de coagulation Xa (pour revue voir (Himmelsbach et al. 2018)).

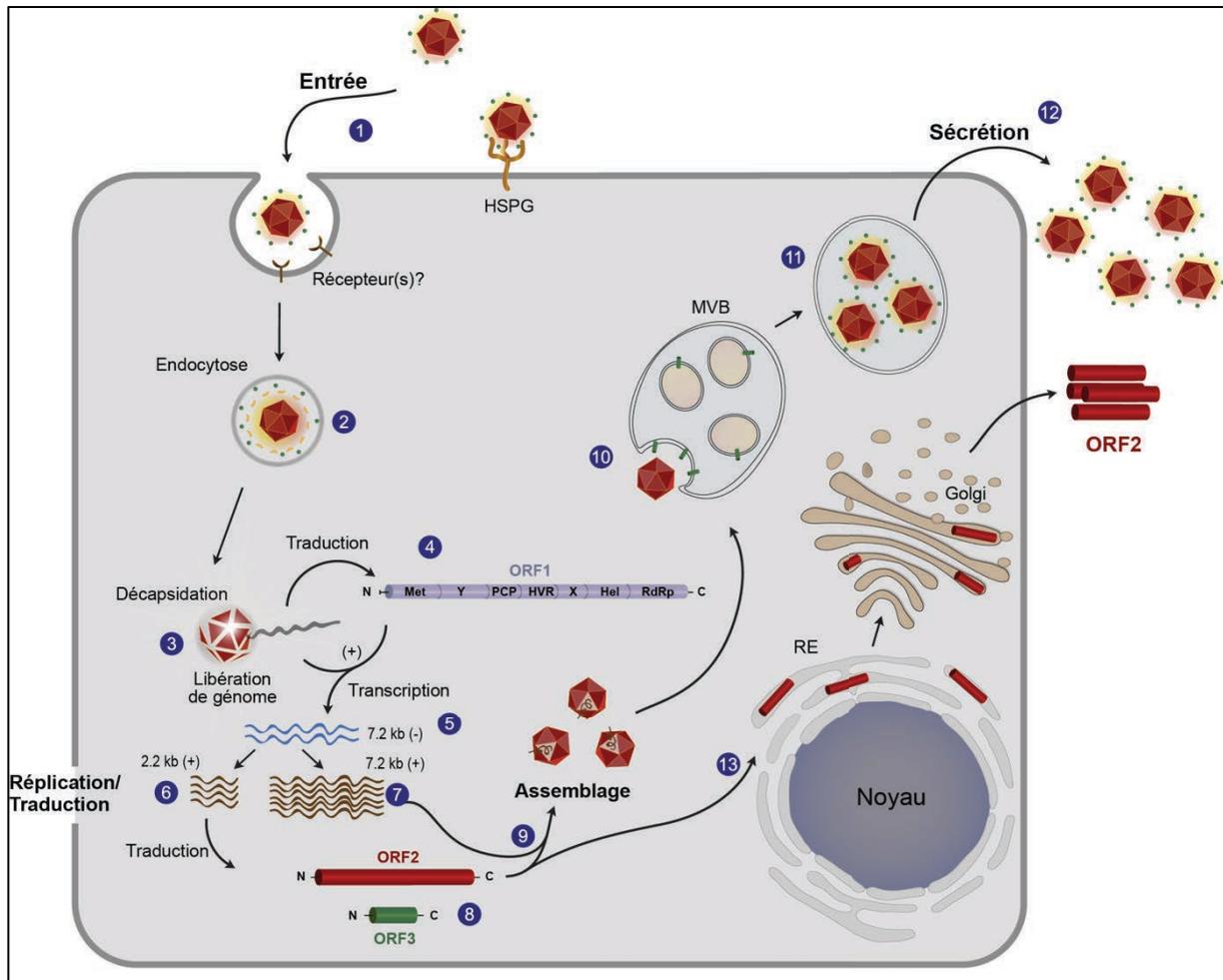


Figure 9: Cycle infectieux du HEV.

(1) L'entrée du HEV dans la cellule hôte commence par son interaction avec les protéoglycanes à héparine sulfate (HSPG) qui se trouvent à la surface des cellules. Les récepteurs spécifiques impliqués dans l'entrée du HEV ne sont pas connus pour l'instant. (2) Les particules virales entrent dans la cellule par endocytose. (3) Le génome viral est libéré dans la cellule après dégradation de la capsid virale. (4) La protéine ORF1 (réplicase) est rapidement synthétisée par la machinerie cellulaire. (5) L'ORF1 synthétiserait les ARNs de polarité négative à partir de l'ARN génomique de polarité positive. (6) Les ARNs de polarité négative serviraient de matrice pour la synthèse des ARNs sous-génomiques (2,2 kb) et génomiques (7,2 kb) de polarité positive (7). (8) Les protéines ORF2 et ORF3 sont traduites à partir des ARNs sous-génomiques. La protéine ORF2 pourrait suivre deux voies de production : (9) Une voie productive dans laquelle une fraction des protéines ORF2 servirait à encapsider le génome viral pour former les virions. (10) Les virions se retrouveraient dans les *multi-vesicular bodies* (MVB) où ils seraient enveloppés d'une bicouche lipidique dans laquelle la protéine ORF3 viendrait s'intégrer (11). (12) Les virions seraient ensuite sécrétés de la cellule hôte *via* les propriétés viroporines de la protéine ORF3. (13) Dans la voie non productive, une proportion importante des protéines ORF2 est transloquée dans la lumière du RE où elles subissent des modifications post-traductionnelles (N-glycosylation, O-glycosylation, sialylation et clivage par des protéases) pour ensuite être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Dans cette voie, il n'y a pas de formation de particules virales. D'après (Ankavay et al. 2018).

Dans un travail auquel j'ai participé, nous avons montré que la protéine GBF1 (*Guanine nucleotide exchange factor Golgi Brefeldin A resistance Factor 1*), qui est un facteur d'échange nucléotidique, est également important pour la réplication du HEV (Farhat et al. 2018) (**Annexe 3**).

Après encapsidation du génome viral, les virions sont recouverts d'une bicouche lipidique dans laquelle la protéine ORF3 est ensuite enchâssée. La protéine ORF3 importante pour la libération des virions interagirait avec le tsg101 pour assurer le bourgeonnement des virions. La protéine ORF3 exercerait sa fonction de viroporine pour libérer les virions hors de la cellule hôte *via* la voie de sécrétion des exosomes (pour revue voir (Nimgaonkar et al. 2018)) (**Figure 9**).

8. MODELES D'ETUDE DU HEV

Les études en virologie fondamentale portent sur des expérimentations *in vitro* en culture cellulaire et *in vivo* chez des modèles animaux.

8.1. Culture cellulaire

La culture du HEV en lignées cellulaires a été particulièrement difficile. Plusieurs tentatives de culture du HEV *in vitro* ont été réalisées dans différentes lignées cellulaires (des cellules primaires de macaque, des cellules primaires de reins de singes simiens, des cellules d'hépatome humain HepG2 ainsi que des cellules d'adéno-carcinome de poumon) (Tam et al. 1997; Panda et al. 2000; R. Huang et al. 1999; Oshiro et al. 2014).

Les premières tentatives de culture du HEV ont été réalisées à partir de souches cliniques et ont permis d'obtenir les premières données sur la pathogénèse de ce virus. En 1987, les selles d'un patient faisant une HNANB transmise par voie entérale ont été utilisées pour infecter des cellules hépatiques (PLC/PRF/5) *in vitro*. La formation de virions après infection dans ces cellules a pu révéler pour la première fois que le HEV se trouvait dans les selles des patients de manière naturelle et que ce virus n'induisait pas d'effets cytopathiques (Arankalle et al. 1988).

En 1990, l'identification des souches Sar-55 (HEV-1) chez un patient au Pakistan, MEX-14 (HEV-2) au Mexique et de la souche 87A en Chine a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) pour des études moléculaires du HEV. Au fil des années, ces souches ont été étudiées en culture cellulaire, c'est le cas par exemple de la souche Sar-55 qui est encore utilisée aujourd'hui (pour revue (Meister et al. 2019)). En 2007, Okamoto et

collaborateurs ont mis en place un système de culture sur cellules hépatiques PLC/PRF/5 de la souche JE03-1760F (HEV-3) isolée à partir des selles d'un patient japonais infecté (Tanaka et al. 2007).

Dans toutes ces études, le niveau de réplication du génome viral et d'expression des protéines du HEV était faible empêchant de ce fait l'étude de son cycle infectieux (pour revue voir (Nimgaonkar et al. 2018)). Les niveaux faibles de réplication du HEV *in vitro* n'ont pas été attribués aux différentes lignées cellulaires utilisées, mais plutôt aux différentes souches virales qui n'étaient pas adaptées à la culture cellulaire. En effet, en 2009 la souche JE03-1760F (HEV-3), et la souche 4HE-JF5 (HEV-4), ont été isolées chez des patients infectés par le HEV et ont été adaptées pour la culture cellulaire. Après mise en culture, ces 2 souches présentaient un niveau de réplication plus important après plusieurs passages cellulaires sur les lignées d'origine pulmonaire A549 et d'hépatocarcinome PLC/PRF/5 (Yamada et al. 2009; Tanaka et al. 2009) montrant une meilleure adaptation de celles-ci. En 2011, la souche Kernow-C1 HEV-3 a été isolée chez un patient atteint d'une hépatite E chronique et co-infecté par le VIH. Cette souche avait la particularité d'infecter plusieurs hôtes (humains, porcs et cerfs) après 6 passages en culture cellulaire (Kernow-C1/p6). Il a été démontré que cette souche avait, dans la région hypervariable de la protéine ORF1, une insertion de 58 aa (aa 21 à 75) de la protéine ribosomale S17 humaine qui est à l'origine de la grande diversité d'hôtes et de la haute capacité de réplication de la souche p6. Cette souche présentant une insertion des aa de la protéine S17 était déjà présente dans les selles du patient avant la réalisation des différents passages cellulaires. C'est au cours des passages en série sur des cellules de la lignée d'hépatocarcinome HepG2/C3A et grâce à ses capacités de réplication élevées que cette souche est devenue la quasi-espèce dominante (Shukla et al. 2011). L'insertion de ces aa de la protéine S17 par mutagenèse dans la région hypervariable de la protéine ORF1 du HEV-1 lui confère également une capacité de réplication plus élevée dans la lignée BHK-21 (cellules de fibroblaste de rein de hamster) (Hamid et al. 2002). L'insertion de nucléotides permettant la traduction des aa de la protéine cellulaire (S17) dans le génome de la souche Kernow-C1 n'est pas un événement isolé. En effet, d'autres souches du HEV présentent des insertions des aa provenant des protéines cellulaires. C'est le cas notamment de la souche LBPR-0379 (HEV-3) qui a été identifiée avec une insertion des aa provenant de la protéine S19 dans la région hypervariable de la protéine ORF1 lui procurant un avantage de croissance en culture cellulaire (Nguyen et al. 2012). Les raisons pour lesquelles ces insertions confèrent un avantage de réplication aux souches virales ne sont pas connues.

Il a été montré que la protéine S17 possède un signal de localisation nucléaire et nucléolaire permettant à la protéine ORF1 d'être importée dans le noyau des cellules hôtes (Kenney & Meng 2015; Scott P Kenney 2015). Cette localisation nucléaire de la protéine ORF1 du HEV pourrait modifier des facteurs de transcription importants pour la réplication virale, conférant ainsi une grande capacité de réplication au HEV. En 2016, une étude a rapporté que la souche Kernow-C1/p6 se réplique dans les cellules souches pluripotentes dérivées du foie et pourraient être un bon outil d'étude du HEV (Helsen et al. 2015).

Bien que la souche Kernow-C1/p6 constitue un bon modèle d'étude du HEV, les systèmes utilisés restaient assez lourds à mettre en pratique : ils exigeaient de longs temps de culture (environ 30 jours) afin d'obtenir des titres viraux et un niveau d'expression de protéines virales assez faibles ne facilitant pas l'étude fondamentale du virus (pour revue voir (Okamoto 2013; Ankavay et al. 2018).

C'est ainsi qu'en 2018, dans un travail dans lequel j'ai participé, nous avons implémenté un système de culture cellulaire efficace du HEV utilisant la souche Kernow-C1/p6 et la lignée cellulaire PLC3, un sous-clone de la lignée hépatocellulaire PLC/PRF/5. Dans ce système, la réplication du HEV est assez efficace et précoce avec une production des particules virales et une expression des protéines ORF2 et ORF3 à partir de 4 jours post-transfection (Montpellier et al. 2018) (**Annexe 2**).

Il a été démontré que le HEV se réplique également sur hépatocytes primaires humains et de macaques (Tam et al. 1997; Oshiro et al. 2014). Dans la même perspective, Meng et collaborateurs ont montré que le HEV-porcine (souche US-1 et US-2) avaient la capacité d'infecter les chimpanzés et les singes Rhesus (Meng, Halbur, Shapiro, et al. 1998).

Le HEV a différents réservoirs (humain et animaux), lui donnant la capacité de se propager dans différentes lignées cellulaires. Zhang et collaborateurs ont montré que le HEV-4 (présent dans des prélèvements de foie et écouvillons nasaux de porcs infectés) pouvait se cultiver dans les cellules de reins de porc (IB-RS-2) et de poumons humains (A549) (Zhang, H.-Y. et al. 2011). Le HEV de rat, bien qu'appartenant au genre *Orthohepevirus C*, est capable d'infecter les cellules hépatiques PLC/PRF/5 (Li, T. C. et al. 2015), HepG2 et Huh-7 (Jirintai et al. 2014) montrant que le HEV de rat peut s'adapter aux cellules humaines et être cultivé *in vitro* comme le HEV porcine. En plus, le HEV de rat a été identifié dans des échantillons cliniques et chez un patient transplanté hépatique souffrant d'une hépatite chronique (Sridhar et al. 2018).

En plus de ces systèmes de culture, d'autres études ont montré que le HEV de lapin pouvait se répliquer dans les cellules humaines (A549 et PLC/PRF/5) (Jirintai et al. 2012), et

le HEV de furet s'adapte bien sur les cellules PLC/PRF/5 (Li, T. C. et al. 2015; Yoshizaki, et al. 2016). Le HEV d'oiseau a été également cultivé sur des cellules LMH (cellules de foie de coq doré) (Huang, F. F. et al. 2005). Enfin, le HEV des chameaux a aussi été cultivé sur des cellules PLC/PRF/5 (Li, T. C., Zhou, et al. 2016).

Ces études montrent que le HEV peut se cultiver sur différentes cellules de différentes espèces et les différents génotypes animaux ont la capacité de franchir la barrière inter-espèces pour se propager dans les cellules humaines (Meister et al. 2019).

Bien qu'aujourd'hui il existe des systèmes de culture cellulaire pour étudier le cycle infectieux du HEV, il est important de rappeler que des systèmes hétérologues avaient été mis en place pour étudier les aspects fondamentaux de ce virus quand les systèmes infectieux n'existaient pas.

8.2. Systèmes hétérologues et autres outils d'étude du HEV

Des systèmes d'expression hétérologue ont été utilisés en l'absence d'un système infectieux pour étudier le HEV. Ces systèmes hétérologues permettaient d'exprimer les protéines virales, notamment des formes tronquées de la protéine de capsidie en utilisant des vecteurs d'expression ou des protéines synthétiques dans des cellules d'insectes ou bactériennes (*Escherichia coli*) (pour revue voir (Holla, R. et al. 2013)). Des anticorps anti-protéines ORF2 et ORF3 ont également été développés. Pour étudier la réplication virale, des réplicons ont été mis en place dans lesquels les gènes ORF2 et ORF3 sont remplacés par le gène codant une protéine rapportrice comme la luciférase ou la green fluorescent protein (GFP) (pour revue voir (Meister et al. 2019)).

8.3. Modèles animaux

Il est important de développer des modèles animaux pour une bonne compréhension de la pathogénèse et de la réponse immunitaire induite par le HEV. Le HEV a une grande diversité d'hôtes (Homme, porc, cerf, lapin, oiseaux, furet, rat, chameaux) (pour revue voir (Doceul et al. 2016)), ce qui facilite la mise en place d'un modèle animal d'étude de ce virus. Les primates non humains tels que les singes rhesus et cynomolgus ont été utilisés pour étudier les HEV-1 et HEV-2 (Arankalle et al. 1999; Panda et al. 1989). Plusieurs études utilisant le HEV-1 ont été réalisées sur des chimpanzés afin de comprendre la pathogénèse de ce virus, la cinétique de la virémie et l'élimination du virus dans les selles. Les primates non humains ont également été utilisés avec succès pour comprendre la réponse immunitaire induite par le HEV (Yu, C. et al. 2010).

Ces modèles animaux sont également utilisés pour des études vaccinales contre le HEV en utilisant des formes tronquées de la protéine ORF2 (Tsarev et al. 1994; Zhang, M. et al. 2002). Malheureusement, les modèles d'étude utilisant les primates non-humains ne sont pas représentatifs de ce qui se passe chez la femme enceinte. En effet chez ces primates, les risques dus au HEV sont faibles au cours de la grossesse. En plus, la transmission verticale du HEV n'a pas lieu comme chez la femme (Arankalle et al. 1993; Tsarev et al. 1995).

Le porc est également un modèle d'étude des HEV-3 et -4 car c'est un hôte naturel de ce virus. Contrairement aux primates non-humains qui sont permissifs aux HEV-1, -2 et -3, le modèle porcin reste limité aux HEV-3 et -4 (Meng, Halbur, Haynes, et al. 1998; Purcell et al. 2003). En plus, chez le porc, le HEV cause des infections asymptomatiques.

Néanmoins, les porcs ont été utilisés pour identifier les sites de réplication extra-hépatiques du HEV tels que l'intestin, le colon et les ganglions lymphatiques (Williams et al. 2001) et pour comprendre les facteurs cellulaires modulés au cours d'une infection par le HEV (Rogée et al. 2013). Le porc peut également développer une hépatite E chronique après traitement avec des immuno-modulateurs comme c'est le cas chez l'humain (Cao, D. et al. 2017).

Le lapin constitue également un bon modèle animal pour le HEV. Il a été démontré que des souches de HEV identifiées chez le lapin étaient capables d'infecter le porc et les primates non-humains démontrant la capacité de ce virus à franchir la barrière d'espèce (Cossaboom et al. 2012; Liu et al. 2013). L'infection par le HEV chez le lapin donne des signes cliniques limités mais l'animal développe une hépatite E chronique avec une réplication extra-hépatique (lésions rénales) (Wang, L. et al. 2017). De plus, des infections sévères chez les lapines gestantes avec une transmission verticale comme chez l'humain ont été observées (Xia, J. et al. 2015). Le lapin constitue donc un modèle d'étude intéressant pour le HEV.

Les modèles animaux utilisant les primates non-humains, les porcs et les lapins sont coûteux et peuvent poser des problèmes éthiques. Pour remédier à ce problème, des modèles murins ont été développés. Les souris BALB/c seraient permissives au HEV-4 (Yu, W. et al. 2018). Des souris au foie humanisé ont été développées récemment et constituent un bon outil pour l'étude de la réplication du HEV et le screening des antiviraux. Cependant, ces souris ne développent pas une immunité active contre le HEV limitant ainsi les études dans ce domaine (Sayed, Verhoye, et al. 2017; Sayed, Foquet, et al. 2017; Sayed & Meuleman 2017; Todt et al. 2018; van de Garde et al. 2016; Allweiss et al. 2016).

Le rat a été identifié comme réservoir naturel du HEV appartenant au genre *Orthohepevirus*, espèce *Orthohepevirus C* et peut être utilisé comme modèle d'étude du HEV,

notamment pour le screening de molécules antivirales. Néanmoins, ce modèle reste limité car il n'est pas permissif aux génotypes humains (Debing, Y., Mishra et al. 2016). Les furets et les oiseaux peuvent aussi constituer des modèles animaux d'étude du HEV (pour revue voir (Meister et al. 2019)).

Un bon modèle animal d'étude du HEV devrait combiner les caractéristiques suivantes : une détection du génome et des particules virales dans le sérum et dans les selles, une réponse immunitaire innée et acquise, une élévation sérique des transaminases (ALT et AST), des manifestations extra-hépatiques, le développement de formes chroniques chez des animaux immunodéprimés, une sévérité et un taux élevé de mortalité chez les femelles gestantes, être permissif aux HEV humains (pour revue voir (Meister et al. 2019)) et une bonne expression des protéines virales.

9. REPONSE IMMUNITAIRE ET ECHAPPEMENT PAR LE HEV

Au cours d'une infection virale, les cellules hôtes réagissent afin d'éliminer l'agent infectieux étranger. Le système immunitaire a pour rôle d'inhiber l'invasion de cet étranger. La reconnaissance des virus dans les cellules se fait par des senseurs cellulaires de la réponse innée ou aspécifique induisant la production de cytokines telles que l'interféron de type I (IFN) et le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) ou des cellules telles que les *Natural Killer* (NK) (Wu & Chen 2014). Ces effecteurs de la réponse immunitaire non spécifique concourent également à l'activation de la réponse immunitaire spécifique incluant les lymphocytes T et B pour une lutte plus efficace contre le pathogène (Takeuchi & Akira 2009).

9.1. Immunité innée

Par analogie avec les virus à ARN, il est décrit qu'au cours de l'infection par le HEV, l'ARN viral est probablement reconnu par plusieurs senseurs appelés : *pattern-recognition receptor* (PRR) tels que les *RIG-I-like receptors* (RLR) et *Toll-like receptors* (TLR). Ces deux senseurs reconnaissent la présence des ARNs viraux respectivement dans le cytoplasme et dans les endosomes (pour revue voir (Hakim et al. 2018)). Les senseurs RLR sont constitués des membres: *Retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I, aussi connu sous le nom de DDX58) et de *Melanoma Differentiation Associated Gene 5* (MDA5 ou IFIH1) (Wu & Chen 2014).

Concernant les TLR, il existe 13 membres et seulement 3 sont impliqués dans la reconnaissance des ARNs viraux. Ce sont les TLR3, 7 et 8 (Kawai & Akira 2011). La reconnaissance des ARNs viraux par les RLR et les TLR induit l'activation des voies de

signalisation médiées par l'IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), l'IRF7 et le facteur nucléaire NF- κ B, (**Figure 10**).

Après reconnaissance de l'ARN viral, des interférons (IFNs) et cytokines pro-inflammatoires (telles que TNF α et IL-1) sont produites (Wu & Chen 2014; Kawai & Akira 2011). Trois types différents d'IFNs sont produits au cours d'infections par des virus à ARN. Il s'agit d'IFNs de type I (IFN α , IFN β , IFN δ), de type II (dont le seul membre est l'IFN γ) et de type III (IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3, et IFN λ 4), (pour revue voir (Syedbasha & Egli 2017; Plataniias 2005)). Les IFNs se fixent à leurs récepteurs respectifs activant ainsi la voie de signalisation JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) (**Figure 10**). L'activation de la voie JAK-STAT induit la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui s'associent alors à l'IRF9 (**Figure 10**).

Le complexe STAT1/STAT2-IRF9, appelé ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) est ensuite transloqué dans le noyau pour activer la transcription de centaines d'ISGs (*IFN-Stimulated Genes*) (pour revue voir (Syedbasha & Egli 2017; Plataniias 2005)). Les ISGs sont des effecteurs de la réponse immune efficace contre plusieurs virus (Schneider et al. 2014) (**Figure 10**).

Une étude a montré un taux élevé d'ISGs au cours d'une hépatite E chronique montrant que les ISGs sont impliqués dans la réponse immunitaire innée contre le HEV (Moal et al. 2013). Une autre étude a révélé que seul l'IFN α inhibait la réplication du HEV. L'extinction du gène exprimant JAK1 ainsi que du complexe ISGF3 induit une augmentation de la réplication du HEV (Zhou et al. 2016)

Pour faire face aux défenses immunitaires innées, le HEV a mis en place des stratégies d'échappement. En effet, il a été montré que la protéine ORF3 du HEV-4 induit l'expression de SIRP- α (*Signal regulator protein α*) qui empêche la phosphorylation de l'IRF3 inhibant ainsi la production des IFN β (Huang, F. Yang, et al. 2016). Il a également été montré que le macro domaine X de la protéine ORF1 bloque la phosphorylation de l'IRF3 et le domaine PCP de cette même protéine inhibe l'activation de RIGI et TBK-1 (Nan et al. 2014) (**Figure 10**). Plus récemment, il a été montré que la région amino-terminale de la protéine ORF1 (domaines Met-Y-PCP) du HEV-3 inhibe l'activation du promoteur ISRE (*IFN-Stimulated Response Element*) et l'expression de plusieurs ISGs, en réponse à l'IFN-I.

Ce domaine Met-Y-PCP interfère avec la voie JAK/STAT en inhibant la translocation nucléaire et la phosphorylation de STAT1 (Bagdassarian et al. 2018).

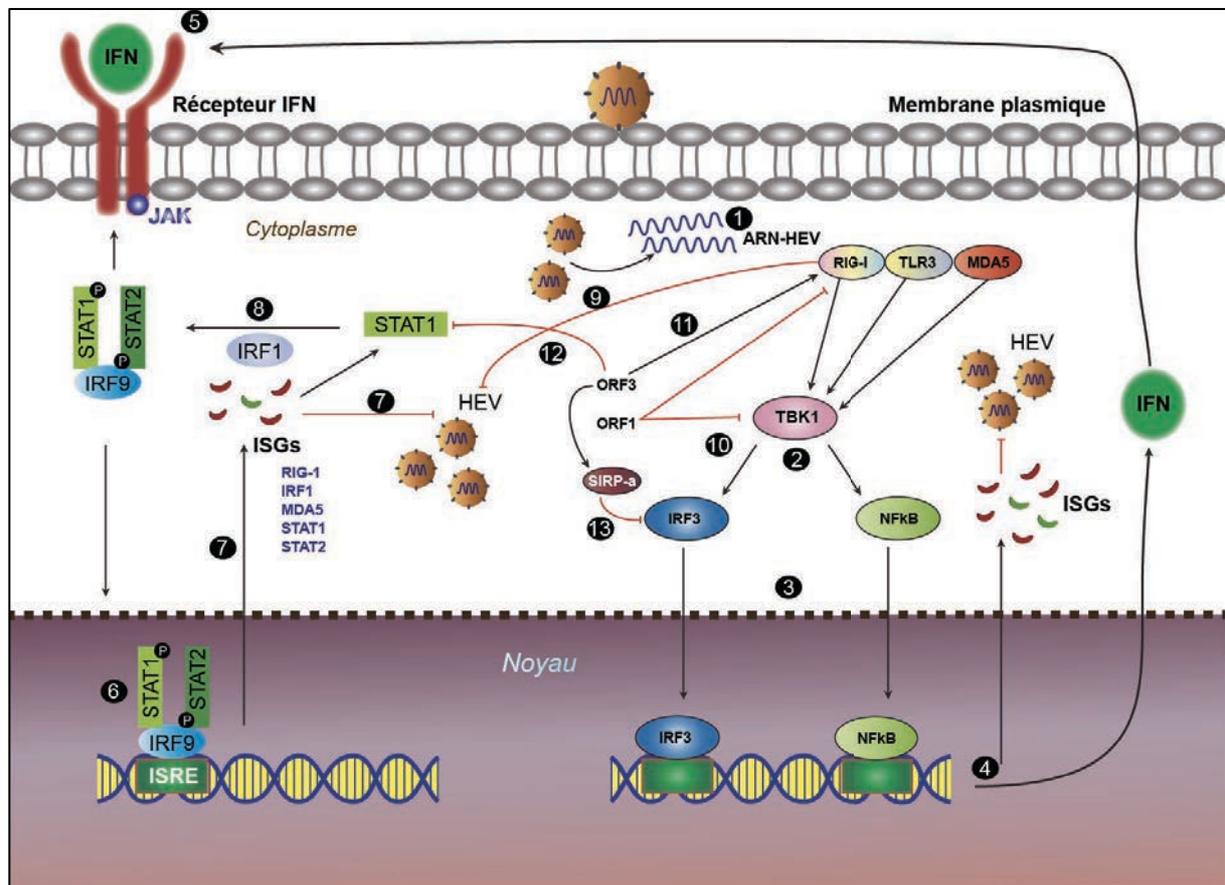


Figure 10: La voie interféron au cours d'une infection par le HEV.

(1) Au cours d'une infection par le HEV, l'ARN viral est probablement reconnu par des senseurs cellulaires appelés *pattern-recognition receptors* : RIG-I (*Retinoic acid inducible gene-1*) et TLR (*Toll-like receptor*). (2) La reconnaissance de l'ARN viral par ces senseurs induit l'activation de TBK1 (*Tank binding kinase 1*) qui va phosphoryler l'IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) et le facteur nucléaire NFκB. (3) La phosphorylation de l'IRF3 et de NFκB entraîne leur translocation nucléaire afin d'induire la production d'interférons (IFNs) et d'ISGs (*Interferon-stimulated genes*) (4). (5) La fixation de l'IFN au niveau de son récepteur active la phosphorylation de STAT (*signal transducer and activator*) 1 et 2. (6) STAT1 et STAT2 phosphorylés se fixent à l'IRF9 pour former le complexe ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). (7) Le complexe ISGF3 se fixe ensuite sur le promoteur ISRE (*IFN-stimulated response element*) et induit la production de milliers d'ISGs qui sont des effecteurs antiviraux. (8) l'IRF1 inhibe le HEV en activant la voie JAK-STAT. (9) RIG-I et MDA5 ont été identifiés comme des antiviraux potentiels contre le HEV. La protéine ORF3 a aussi la capacité d'accentuer la réponse immunitaire innée en activant directement RIG-I (11). Le HEV a développé des stratégies pour échapper aux défenses immunitaires. (10) La protéine ORF1 inhibe l'activation de RIG-I et TBK-1 *via* son activité deubiquitineuse. (12) La protéine ORF3 bloque la phosphorylation de STAT1 inhibant ainsi la production d'interféron. (13) La protéine ORF3 induit la production de la protéine SIRP-α (*Signal regulator protein alpha*) qui inhibe la phosphorylation de l'IRF3 empêchant ainsi la production d'interféron et d'ISGs. Modèle réalisé par analogie avec les virus à ARN positif et à partir des études menées en utilisant les HEV-1, HEV-3 et HEV-4. Adaptée de (Hakim et al. 2018).

Les cytokines sont également impliquées dans la réponse innée au cours d'une hépatite E. Le taux de TNF α est retrouvé élevé chez les femmes enceintes et a été associé à des cas sévères d'hépatite E (Kumar, A. et al. 2014). Il a été démontré que le TNF α inhibe faiblement la réplication du HEV et a une activité antivirale significative combinée avec l'IFN α .

De manière intéressante, le TNF α peut induire à lui seul la production d'IFN en activant le complexe NF-kB afin d'augmenter son activité antivirale (Wang, W., Xu, et al. 2016). Les patients traités avec des anti-TNF α en traitement contre une arthrite psoriasique ont développé une forme sévère d'hépatite E (Behrendt et al. 2017) montrant ainsi l'importance de cette cytokine dans l'immuno-régulation du HEV.

Le HEV est également pourvu des stratégies pour contrecarrer la réponse cytokine au cours de son cycle infectieux. Ainsi, le domaine P2 de la protéine ORF3 du HEV inhibe les TLR3 et TLR4 qui ont pour rôle d'activer la voie NF-kB.

Ceci a pour conséquence directe la réduction de la production de cytokines telles que TNF α , IL-8 et IL-1 β (He et al. 2016; Lei, Q., et al. 2016). En plus, il a été rapporté que la protéine ORF2 bloque la voie de signalisation NF-kB en empêchant la dégradation de I κ B α (Surjit et al. 2012; Tian et al. 2017).

Peu de données sont disponibles sur les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée au cours d'une hépatite E. Cependant, une étude a montré que le taux de NK dans la circulation sanguine était plus faible chez les patients HEV positifs comparés aux patients sains. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les cellules NK chez les patients HEV positifs migrent vers le site d'inflammation (le foie) (Srivastava et al. 2008). Aucune étude n'a néanmoins confirmé cela *in vitro* ou *in vivo*.

9.2. Immunité spécifique

Les médiateurs de la réponse immunitaire innée activent la réponse immunitaire spécifique afin de lutter plus efficacement contre le pathogène (Takeuchi & Akira 2009).

9.2.1. Immunité humorale

Le HEV induit une réponse immunitaire humorale au début de l'infection. L'apparition des IgM et IgG au cours d'une infection par le HEV est assez variable. De manière générale, les IgM sont détectées à des temps précoces de l'infection et persistent plusieurs mois après. Les IgG apparaissent très rapidement après l'apparition des IgM et persistent plusieurs années (pour revue voir (Lhomme et al. 2016)) (**Figure 11**).

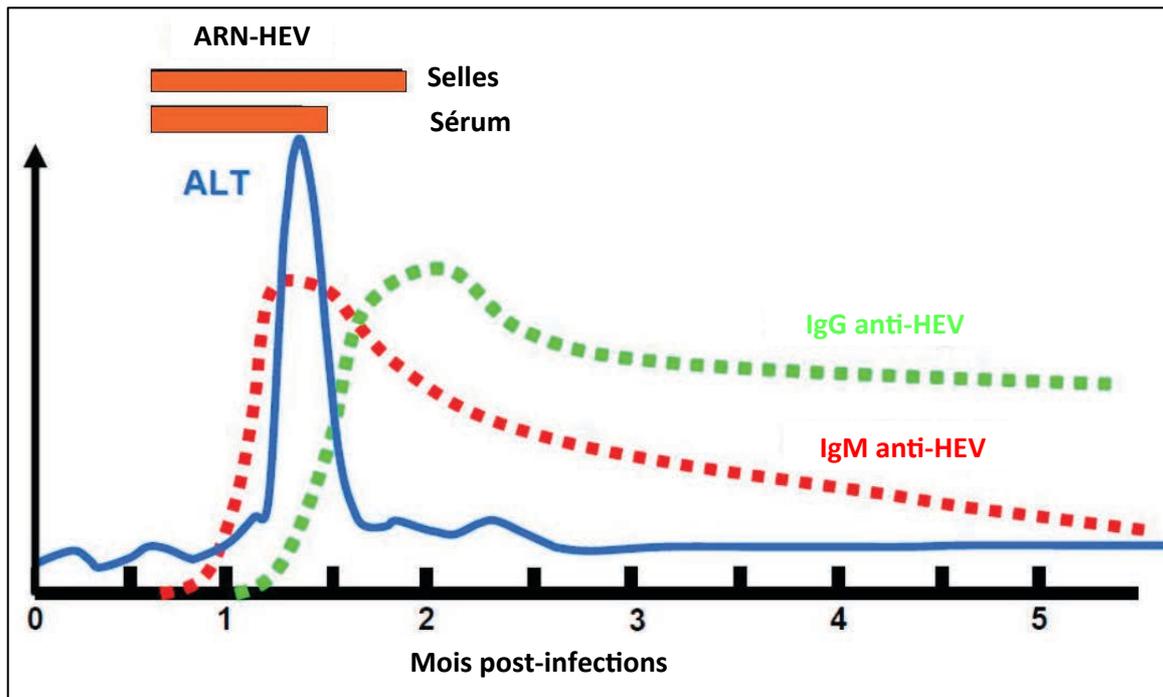


Figure 11: Réponse humorale au cours d'une hépatite E aiguë

Le taux d'IgM apparaît aux environs de la troisième semaine post-infection et atteint son pic à environ 6 semaines puis commence à chuter environ 8 semaines post-infection. Le pic de transaminases (ALT : Alanine Transférase) est superposable avec celui des IgM mais décroît rapidement. La production d'IgG débute une semaine environ après le début de la production d'IgM et atteint son pic à environ deux mois post-infection. L'ARN viral apparaît dans le sérum et les selles des patients environ deux semaines post-infection et persiste 4 semaines dans le sérum et 6 semaines dans les selles. Adaptée de (Lhomme et al. 2016).

Bien qu'il existe plusieurs génotypes de HEV, un seul sérotype est décrit, suggérant une protection croisée des anticorps (Emerson & Purcell 2001; Wang, S. et al. 2013). La protéine de capsid ORF2 possède plusieurs épitopes antigéniques qui ont conduit à la production d'un vaccin commercialisé en Chine (Tang et al. 2011).

9.2.2. Immunité cellulaire

La réponse immunitaire spécifique dirigée contre le HEV est orchestrée par les lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Il a été démontré que les patients ayant une hépatite E aiguë présentent une activation de la réponse immunitaire CD4+ et CD8+. Le taux de lymphocytes CD4+ et CD8+ était plus élevé chez les patients ayant une hépatite aiguë comparé au groupe contrôle (Husain et al. 2011). Cette réponse lymphocytaire est détectable plusieurs années (environ 12 ans) après la clairance de l'infection montrant la mise en place d'une bonne réponse de lymphocyte T mémoire spécifique du HEV (Suneetha et al. 2012; Brown et al. 2016).

Plusieurs études ont montré l'infiltration des lymphocytes dans les biopsies de foie des patients infectés par le HEV montrant une activité effectrice de ces cellules immunitaires au niveau du site d'infection. L'activité cytotoxique des CD8+ exacerbée (perforine et granzyme) de ces lymphocytes pourrait être à l'origine des défaillances hépatiques au cours des formes sévères d'hépatite E (Prabhu et al. 2011; Naik et al. 2015).

B) LA N-GLYCOSYLATION

La N-glycosylation est une modification co/post-traductionnelle des protéines. Elle consiste en un transfert en bloc d'un oligosaccharide (N-glycane) sur une protéine possédant un ou plusieurs séquons de N-glycosylation. Elle a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE). C'est un mécanisme très important dans plusieurs processus biologiques tels que la maturation des protéines, leur trafic intracellulaire et la réponse immunitaire (pour revue voir (Larkin & Imperiali 2011)).

1. Les différents types de N-glycane

Chez les cellules eucaryotes, il existe trois classes de N-glycanes déterminées par la nature des sucres qui constituent leurs branches oligosaccharidiques: (i) le type oligomannosidique dont les branches sont constituées de mannoses, (ii) le type complexe dont les branches sont constituées de molécules de N-acetylglucosamines, de galactoses et d'acides syaliques et (iii) le type hybride dont les branches sont constituées : pour certaines, de mannoses et pour d'autres, d'acide syalique et de galactose et de N-acetylglucosamine (**Figure 12**).

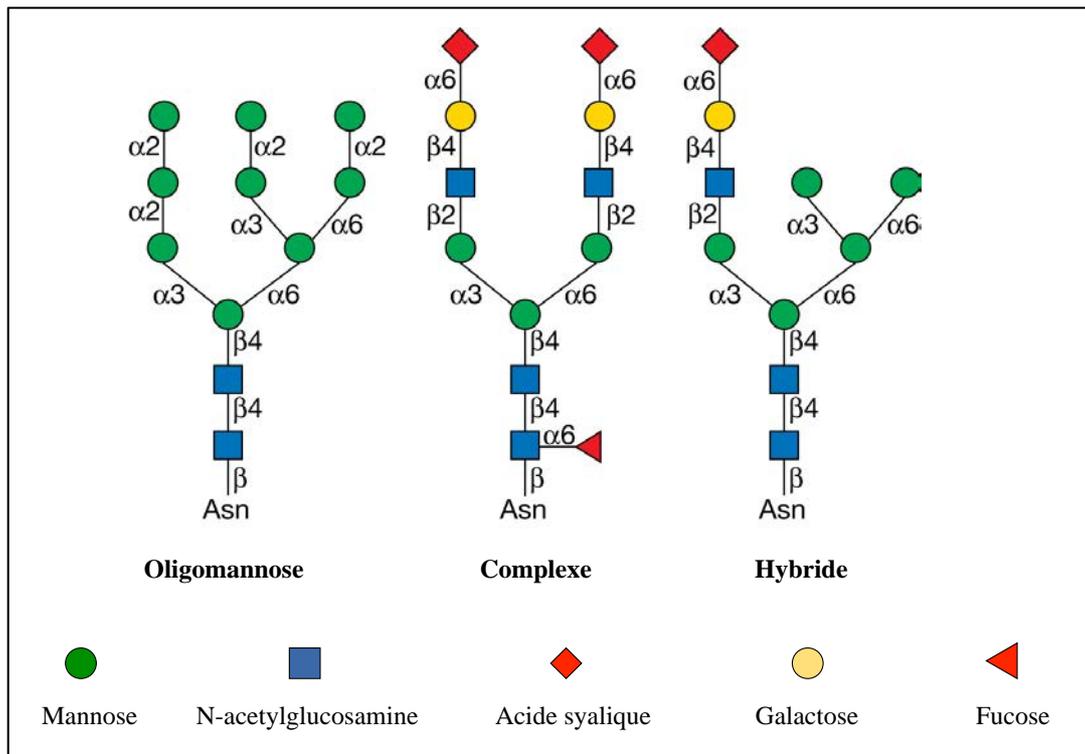


Figure 12: Différents types de N-glycanes

Il existe 3 types différents de N-glycanes liés aux séquons de N-glycosylation : (i) le type oligomannosidique dont les branches sont constituées de mannoses, (ii) le type complexe dont les branches sont constituées de molécules de N-acetylglucosamines, de galactoses et d'acides syaliques et le type hybride dont les branches sont constituées de mannoses et d'autres molécules. Le corps commun des trois types de N-glycanes est constitué de 2 molécules de N-acetylglucosamines et de 3 molécules de mannose. Adapté de (Varki, Cummings, Esko, Hart, et al. 2015).

2. Les mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes

La N-glycosylation débute dans la membrane du RE et consiste en un transfert en bloc d'un oligosaccharide (N-glycane) du dolichol-pyro-phosphate (Dol-PP) à la protéine possédant un séquen de N-glycosylation : N-X-S/T (N pour asparagine, X pour tout autre aa excepté la proline ; S pour sérine et T pour thréonine) (Larkin & Imperiali 2011). Certaines conditions sont défavorables à l'ajout d'un N-glycane, notamment la présence d'une proline en position +1 du séquen (+1 du séquen) (Bause 1983).

L'oligosaccharide (N-glycane) s'assemble au niveau de la membrane du RE et se lie au Dolichol-pyro-phosphate (Dol-PP). Il est constitué de 14 oses correspondant à la formule $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$: 2 molécules de N-acetylglucosamine (GlcNAc_2), 9 molécules de mannoses (Man_9) et de 3 molécules de glucose (Glc_3). Cet oligosaccharide est donc ensuite transféré en bloc du Dol-PP vers la protéine en cours de translocation dans la lumière du RE, ceci par l'action d'une enzyme appelée oligosaccharyltransférerase (OST) (**Figure 13**). Ensuite, le N-glycane est mûré par l'action de plusieurs enzymes telles que les glycosidases, les mannosidases et les glycosyltransférases présentes dans les compartiments de la voie de sécrétion. Au cours de la maturation des N-glycanes, la protéine est concomitamment repliée par l'action de chaperones cellulaires telles que la calnexine et la calréticuline. Enfin, la protéine correctement repliée possédant des N-glycanes mûres est sécrétée dans le milieu extracellulaire ou alors est orientée vers les membranes cellulaires selon ses signaux d'adressage (**Figure 13**). Il existe une très grande diversité de glycanes déterminant ainsi leur fonction variée (pour revue voir (Nguema-Ona et al. 2014; Larkin & Imperiali 2011)).

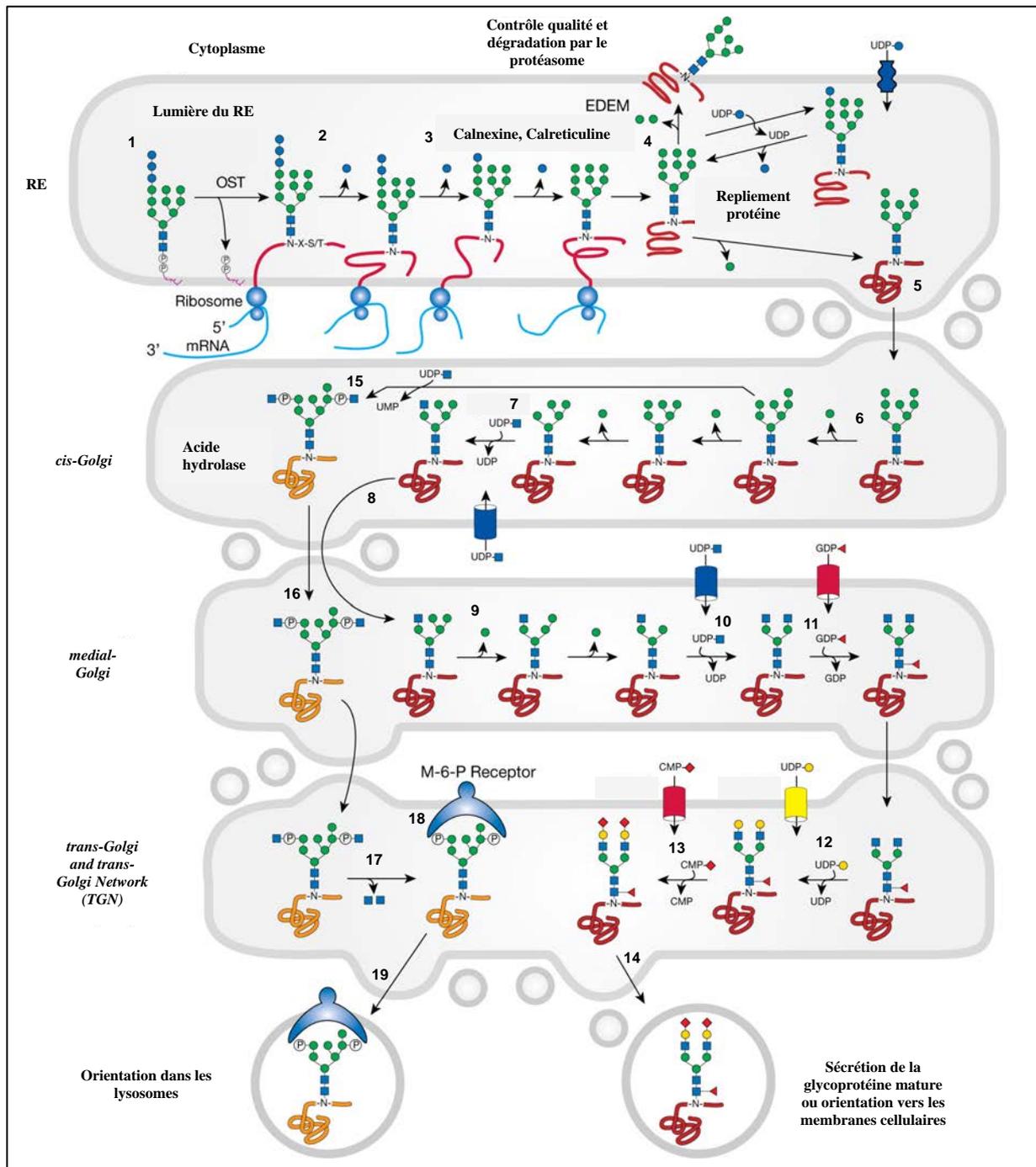


Figure 13: Mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes

(1) Le glycane ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) associé au Dolichol-Pyro-Phosphate est transféré en bloc sur l'asparagine de la protéine possédant le séquen N-X-S/T au cours de sa translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par l'action de l'oligosaccharyltransférase (OST). (2) Dans la lumière du RE, trois molécules de glucoses (Glc) sont clivées par l'action des glycosidases et deux molécules de mannose (Man) par l'action des mannosidases et un ajout d'une molécule de mannose. (3) Cette étape est associée au repliement de la glycoprotéine par l'action des chaperones cellulaires telles que la Calnexine et la Calréticuline. Les mannosidases du RE clivent également une molécule de mannose. (4) Les protéines mal repliées sont orientées par rétro-translocation vers le cytoplasme grâce à l'action de l'EDEM (*ER degradation-enhancing α -mannosidase I-like protein*) où elles sont ensuite dégradées par le protéasome (5) tandis que celles bien repliées vont passer dans le Golgi. La glycoprotéine qui passe dans le cis-golgi possède un N-glycane de type $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Pour la majorité des glycoprotéines, 3 molécules de mannose sont clivées dans le cis-golgi par l'action des mannosidases pour donner un N-glycane de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. (6) Trois molécules de mannose sont clivées et (7) une molécule de GlcNAc est ajoutée.

(8) La glycoprotéine passe ensuite dans le medial-Golgi où elle subit l'action de l' α -mannosidase II qui clive deux molécules de mannose sur le N-glycane (9). Il s'ensuit l'ajout d'un GlcNAc (10), d'un fucose (triangle rouge) (11), de galactose (12) et d'acides sialiques (13) pour former des N-glycanes complexes. (14) La glycoprotéine possédant le N-glycane mature est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire ou orientée au niveau des membranes cellulaires. (15) Dans le cas spécifique des acides hydrolases (enzymes lysosomales), le N-glycane acquiert directement le GlcNAc-1-P au niveau du C-6 des résidus mannosidiques, (16) passe dans le medial-Golgi puis une fois la glycoprotéine arrivée dans le trans-Golgi (17) les GlcNAc sont clivés par des glycosidases exposant ainsi le Mannose-6-Phosphate (Man-6-P). (18) Le Man-6-P est reconnu par des récepteurs spécifiques (*Man-6-P receptors*) et (19) l'acide hydrolase est orienté dans les lysosomes pour jouer ses fonctions de dégradation des macromolécules. RE: Reticulum endoplasmique; EDEM: *Endoplasmic-reticulum-associated Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like proteins*; UDP: Uridine diphosphate; GDP: Guanosine diphosphate; CMP: Transport de l'acide sialique. Adaptée de (Varki, Cummings, Esko, Hart, et al. 2015).

3. Les différents rôles de la N-glycosylation

Chez les cellules eucaryotes, il existe une grande diversité de N-glycanes déterminant ainsi leurs fonctions multiples. La N-glycosylation joue un rôle important dans le repliement des protéines dans le RE. En effet, les chaperones telles que la calnexine et la calréticuline reconnaissent les N-glycanes associés aux protéines et contribuent à leur repliement. Ces deux chaperones cellulaires assurent aussi l'accès à la protéine chaperone ERp57 qui aide à la formation des ponts disulfures. Les protéines qui ne parviennent pas à être correctement glycosylées adoptent une mauvaise conformation et donc ne passent pas le contrôle qualité dans le RE, et sont par conséquent orientées vers le système de dégradation des protéines nommé ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation*). En plus de son rôle dans le contrôle qualité du repliement des protéines, la N-glycosylation joue également un rôle dans l'adressage des protéines vers leur compartiment de localisation subcellulaire (Larkin & Imperiali 2011). C'est par exemple le cas des acides hydrolases (enzymes lysosomales) qui acquièrent, au cours de leur maturation, des N-glycanes possédant le Mannose-6-Phosphate qui est reconnu par des récepteurs spécifiques (*Mannose-6-Phosphate receptors*) dans le trans-Golgi afin d'être orientées dans le lysosome (**Figure 13 étapes 18 et 19**). Les N-glycanes confèrent également une certaine rigidité structurelle aux protéines les protégeant de la protéolyse et assurant leur stabilité (Wyss, D.F. & Wagner, G., 1996; Kundra & Kornfeld 1999). Elle intervient aussi dans l'oligomérisation des protéines (Helenius & Aebi 2001). Les N-glycanes jouent également un rôle dans l'interaction protéine-protéine et dans la reconnaissance cellule-cellule. C'est le cas par exemple des sélectines, protéines de la famille des molécules d'adhésion qui reconnaissent des glycanes à la surface d'autres cellules assurant l'interaction entre les cellules sanguines et les cellules des vaisseaux sanguins (Varki, Cummings, Esko, Hart, et al. 2015). D'autres protéines d'adhésion cellulaire telles que les intégrines doivent également leur fonction à leurs N-glycanes (Gu et al. 2012).

Le rôle des N-glycanes au niveau des protéines synaptiques s'étend également dans la transmission des influx nerveux (Scott & Panin 2014).

Il ressort de manière résumée que la N-glycosylation est très importante dans le fonctionnement fondamental des cellules eucaryotes. Par conséquent, toute anomalie affectant cette modification co/post-traductionnelle induit des pathologies graves regroupées sous le nom de *congenital disorders of glycosylation* (CDGs) (Freeze 2006).

Les virus au cours de leur évolution et leur interaction avec les cellules eucaryotes ont identifié l'importance de la N-glycosylation dans la fonctionnalité des protéines et sont parvenus à détourner ce mécanisme pour leur propre intérêt (Vigerust & Shepherd 2007).

4. La N-glycosylation et les virus

Les virus détournent les mécanismes de N-glycosylation dans le but d'accéder à la machinerie cellulaire de repliement et de mise en conformation des protéines. Plusieurs virus utilisent le cycle calnexine/calréticuline pour le repliement et le trafic intracellulaire de leurs protéines. Ce sont les protéines de surface ou d'enveloppe virale qui sont très souvent mises en cause (Vigerust & Shepherd 2007). La N-glycosylation est également utilisée par les virus pour assurer l'efficacité de leur cycle de réplication notamment dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires, dans la réplication virale, le trafic intracellulaire de leurs protéines, l'assemblage et la sécrétion des particules virales et dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Varki, Cummings, Esko, Stanley, et al. 2015). La mutation des sites de N-glycosylation de certaines protéines virales affecte drastiquement la viabilité et la transmissibilité de certains virus. Plusieurs virus d'intérêt médical utilisent la N-glycosylation pour rendre plus efficace une ou plusieurs étapes de leur cycle viral (Vigerust & Shepherd 2007).

Par exemple, le virus *Influenza* appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae* possède des protéines d'enveloppe telles que l'Héماغlutinine (HA) et la neuraminidase (NA), qui sont des glycoprotéines. La N-glycosylation des protéines de surface du virus *Influenza* joue un rôle important dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires (acides sialiques), l'infectiosité, la sécrétion des particules virales et l'échappement à la réponse immunitaire (Wagner, R. et al. 2000; Baigent & McCauley 2001; Tsuchiya, Sugawara, Hongo, Matsuzaki, Muraki & Nakamura 2002; Tsuchiya, Sugawara, Hongo, Matsuzaki, Muraki, Z.-N. Li, et al. 2002; Abe et al. 2004). La protéine HA possède 5 à 11 sites de N-glycosylation (Skehel & Wiley 2000). Elle joue un rôle important dans l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule en interagissant avec les récepteurs d'acides sialiques.

La présence d'un N-glycane proche du site de liaison avec les récepteurs d'acides sialiques est cruciale pour l'affinité et la spécificité de ces récepteurs (Wagner, R. et al. 2000). De plus, la présence de N-glycanes sur la protéine HA du virus *Influenza* masque les sites antigéniques permettant à ce virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Abe et al. 2004).

Le VIH, virus appartenant à la famille des *Retroviridae*, possède également des glycoprotéines d'enveloppe dont la glycoprotéine gp120 qui fait partie des protéines les plus glycosylées qui existent dans la nature. Elle présente 18 à 33 sites potentiels de N-glycosylation (Korber et al. 2001). Les N-glycanes liés à la protéine gp120 sont importants pour son attachement aux récepteurs de lymphocytes T-CD4. L'abolition de la N-glycosylation de la protéine gp120 réduit son attachement aux T-CD4 et par conséquent l'infectiosité et la pathogénicité virales (Fenouillet et al. 1990; Montefiori et al. 1988). Les glycanes qui décorent la protéine gp120 masquent également ses sites antigéniques (Wei et al. 2003).

Le WNV (*West Nile virus*) appartenant à la famille des *Flaviviridae*, possède également une protéine d'enveloppe appelée E1 qui est N-glycosylée et joue un rôle important dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires. Sa N-glycosylation est nécessaire pour sa mise en conformation, son repliement dans le RE et dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales (Hanna et al. 2005).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV possèdent respectivement 5 et 11 sites de N-glycosylation. La N-glycosylation des protéines E1 et E2 joue un rôle important dans leur repliement, dans l'assemblage et l'infectiosité des particules virales, dans les mécanismes d'entrée virale et dans l'évasion immunitaire (pour revue voir (Lavie et al. 2018)).

Il ressort clairement que la N-glycosylation est importante dans plusieurs étapes du cycle infectieux de plusieurs virus issus de différentes familles.

Concernant le HEV, sa protéine de capsid ORF2 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation. Une étude a montré que les 3 sites étaient occupés par des N-glycanes, le site 2 étant le site principal de N-glycosylation (Zafrullah et al. 1999) malgré une proline en position +1 du séquen. Cette étude a été réalisée en analysant la forme intracellulaire de la protéine ORF2. Néanmoins, nous avons montré tout récemment que la protéine de capsid intracellulaire (ORF2intra) n'est pas N-glycosylée. Nous avons également montré que le HEV sécrète une quantité importante de formes glycosylées de sa protéine de capsid (appelées ORF2g et ORF2c) dans le surnageant des cellules productrices et dans les sérums des patients infectés par ce virus.

Ces formes glycosylées ne sont pas associées au génome viral. Par contre, la protéine ORF2 associée au génome viral (ORF2i) n'est pas glycosylée (Montpellier et al. 2018) (**Annexe 2**). Aucune étude sur l'importance de la N-glycosylation de la protéine ORF2 prenant en compte ces nouveaux éléments n'a été réalisée jusqu'à ce jour.

5. Les inhibiteurs de N-glycosylation comme antiviraux

Bien que la N-glycosylation soit un mécanisme important pour les protéines cellulaires, elle peut néanmoins être inhibée afin de contrecarrer une infection virale. Plusieurs inhibiteurs de N-glycosylation ont montré leur activité antivirale. Le tableau 1 résume les différentes familles de virus susceptibles d'être inhibées par des inhibiteurs de N-glycosylation *in vitro* et *in vivo*.

Tableau 1 : Les inhibiteurs de N-glycosylation sont des antiviraux potentiels

Famille	Virus/ protéines	Composés	Mécanismes	Impact sur le cycle infectieux	Références
<i>Retroviridae</i>	HIV-1/ gp120	N-butyldeoxy- nojirimycine	Inhibe la α - glucosidase	Inhibition de l'assemblage et l'infectiosité virale	(Fischer et al. 1995) (Fischer et al. 1996)
	HIV-1/ gp120	Chloroquine	Inhibe la glycosyltransfé - rase	Réduit la charge virale	(Romane- lli et al. 2004) (Savarino et al. 2006)
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV/ protéine M	N-butyldeoxy- nojirimycine	Inhibe la α - glucosidase	Bloque l'assemblage et la sécrétion des particules virales	(Block et al. 1994)
<i>Rhabdoviridae</i>	VSV/ protéine G	Deoxy- nojirimycine et Castano- spermine	Inhibent les glycosidases	Réduit l'assemblage viral	(Schlesin- ger et al. 1984)
<i>Flaviviridae</i>	HCV/ protéines E1E2	Tunicamycine	Inhibe la GlcNAc- phosphotransfé rase	Réduit l'assemblage viral	(Reszka et al. 2010)
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza virus A et B</i>	Chloroquine	Inhibe la glycosyltransfé -rase	Inhibe l'infectiosité et la sécrétion des particules	(Savarino et al. 2006)

Les enzymes impliquées dans la N-glycosylation seraient donc des cibles potentielles dans le développement d'antiviraux.

C) TRANSPORT NUCLEO-CYTOPLASMIQUE

1. Chez les cellules eucaryotes

Chez les cellules eucaryotes, le noyau qui possède l'information génétique est séparé du cytoplasme par une double membrane appelée enveloppe nucléaire. La réplication de l'ADN et la synthèse des ARN messagers (ARNm) se déroulent dans le noyau tandis que la biosynthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme. Le transport des protéines et des ARNs entre le cytoplasme et le noyau se fait à travers un complexe de pores nucléaires (NPC). Les NPC sont constitués d'environ 30 protéines différentes appelées nucléoporines (NP) situées au niveau de l'enveloppe nucléaire. Le transport de petites molécules telles que les ions dans le noyau se fait de manière passive à travers les NPC. Par contre, le transport de macromolécules de haut poids moléculaire (de poids moléculaire supérieur à 30-40 kDa) est sélectif (pour revue voir (Wente & Rout 2010; Sorokin et al. 2007)). Le transport des macromolécules du cytoplasme vers le noyau concerne très souvent des protéines ou des ribonucléoprotéines virales (ARN associés à des protéines) tandis que le transport des molécules du noyau vers le cytoplasme concerne très souvent des ARNm, des ribonucléoprotéines et enfin des protéines (Wente & Rout 2010).

Chez les cellules eucaryotes, l'import nucléaire des macro-protéines est régulé par des protéines de la famille des karyophérines ou importines α et β . Les importines β se fixent directement aux protéines qui possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS) et les transportent du cytoplasme vers le noyau à travers les NPC (**Figure 14A**). Dans le cas de certaines protéines, l'importine β a besoin d'un adaptateur, l'importine α qui se fixe au NLS de la protéine à transporter. L'importine β se fixe alors sur l'importine α et le complexe importine- β/α -protéine est transporté dans le noyau. Dans les cellules humaines, il existe environ une vingtaine d'importines β . Cependant, l'importine β la plus souvent impliquée dans le transport des protéines possédant un NLS classique (NLSc) et ayant besoin de l'importine α comme adaptateur est l'importine β -1. Il existe environ 6 importines α différentes qui se fixent directement sur les NLS des protéines. Les NLS sont des séquences constituées de résidus chargés positivement (notamment des arginines : R et des lysines : K). Il existe 2 types de NLS classiques : (i) les NLS monopartites qui sont constitués de la séquence consensus K-R/K-X-R/K, et (ii) les NLS bipartites constitués de la séquence consensus K/R-K/R-(10-12 acides aminés)-3K/R (pour revue voir (Ibarra & Hetzer 2015; Sorokin et al. 2007)).

Concernant l'export nucléaire, les protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES) sont reconnues par les exportines qui les transportent du noyau vers le cytoplasme (**Figure 14B**). L'exportine1 (Exp1) ou CMR1 (*Chromosomal maintenance region 1*) est l'exportine qui reconnaît les protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES). (pour revue voir (Wente & Rout 2010)). Les NES sont des séquences riches en résidus hydrophobes (leucine, phénylalanine, méthionine, isoleucine) (pour revue voir (Fung et al. 2015)). L'export des macromolécules du noyau vers le cytoplasme concerne très souvent les ARNs. C'est ainsi que l'exportine-t et l'exportine5 assurent l'export des ARNs vers le cytoplasme, l'exportine5 exporte aussi les micro ARN (pour revue voir (Sorokin et al. 2007)). Concernant les ARNm, ils sont transportés par les protéines de la famille des TAP/NXF (pour revue voir (Lei, E. P. & Silver 2002; Juillard et al. 2009)).

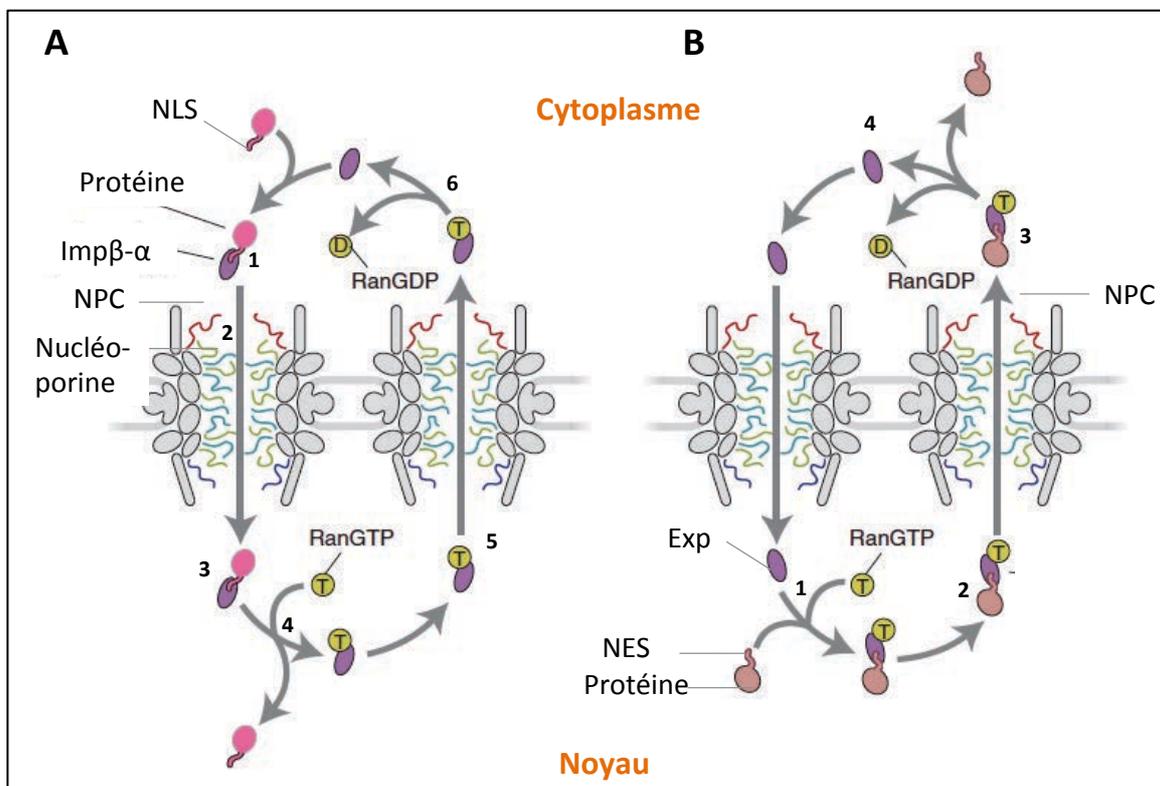


Figure 14: Transport nucléocytoplasmique des protéines

(A) **Import nucléaire** : La translocation des protéines de poids moléculaire supérieur à 30-40 kDa dans le noyau est régulée par les importines (Imp). (1) L'importine α reconnaît des signaux de localisation nucléaire (NLS) sur des protéines et s'y fixe. L'importine β se fixe ensuite à l'importine α . (2) Le complexe Imp β - α -protéine interagit avec les nucléoporines et (3) est ensuite transloqué dans le noyau en traversant les pores nucléaires (NPC). (4) La protéine est ensuite dissociée du complexe par la fixation de RanGTP (*Ran GTPase activating protein*) à l'importine β/α dans le noyau. (5) L'importine β/α est exportée du noyau pour être recyclée. (6) Enfin, l'hydrolyse du GTP de la protéine Ran dans le cytoplasme libère l'importine β/α la rendant disponible pour un autre cycle d'import nucléaire. (B) **Export nucléaire**: (1) Concernant l'export nucléaire, les exportines (Exp) reconnaissent les signaux d'export nucléaire (NES) sur les protéines. La fixation de RanGTP à l'exportine augmente son affinité à cette dernière protéine. (2) Le complexe Exp-RanGTP-protéine est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme à travers les NPC. (3) Dans le cytoplasme, l'hydrolyse du GTP permet la dissociation du complexe et enfin (4) l'exportine est transloquée dans le noyau pour assurer un nouveau cycle. Adaptée de (Wente & Rout 2010).

Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines et des ARNs cellulaires est très important dans la régulation des facteurs de transcription et l'expression des gènes. Cependant, plusieurs virus détournent ce mécanisme pour améliorer plusieurs étapes de leur cycle infectieux (pour revue voir (Yarbrough et al. 2013)). C'est le cas par exemple du virus de l'hépatite B (HBV) qui réplique son génome dans le noyau des cellules hôtes (Karayiannis 2017) et du virus de la rage qui inhibe la réponse immunitaire STAT dépendante des cellules hôtes via le trafic nucléo-cytoplasmique de sa phosphoprotéine (protéine P) (Rowe et al. 2016).

2. Importances du transport nucléo-cytoplasmique pour les virus

Plusieurs virus d'intérêt de santé publique détournent le transport nucléo-cytoplasmique des protéines pour améliorer leur répllication et échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (pour revue voir (Yarbrough et al. 2013)) ; quelques exemples seront présentés dans les paragraphes suivants.

Les virus à ADN (le virus de l'hépatite B, les Adénovirus, les Herpesvirus) exceptés les *Poxviridae*, répliquent leur génome dans le noyau de la cellule hôte. Ils ont besoin du bagage enzymatique présent dans le noyau des cellules hôtes notamment de l'ARN polymérase II. C'est le cas par exemple du **virus de l'hépatite B (HBV)**. Le HBV est un important pathogène humain. Il appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Il possède un génome à ADN circulaire, bicaténaire partiellement simple brin. Son génome code 7 protéines dont sa protéine de capsid core (HBc). C'est une protéine qui s'assemble en particules virales de symétrie icosaédrique (Karayiannis 2017). Le HBV a mis en place des stratégies ingénieuses afin de transporter son génome dans le noyau des cellules. La protéine de capsid HBc possède un domaine riche en arginines constitué de 4 séquences riches en arginines en position C-terminale (aa en position 147-183). Parmi ces 4 séquences riches en arginines, deux sont des NLS et deux des NES fonctionnels (Li, H.-C. et al. 2010). De manière résumée, la capsid virale HBc est importée dans le noyau des cellules hôtes suite à son interaction avec le complexe importines- α/β et ses 2 NLS fonctionnels (**Figure 15, étape 1**). Après décapsidation, l'ADNrc (*relaxed circular DNA*) est relargué dans le noyau (**Figure 15, étape 2**) où il est converti en ADNccc (*covalently closed circular DNA*) par la ligase topoisomérase (**étape 3**). Ensuite, l'ADNccc est transcrit en ARN pré-génomique (ARNpg) en utilisant l'ARN-polymérase II ADN-dépendante cellulaire (**étape 4**).

Les ARNpg sont exportés du noyau vers le cytoplasme soit en interagissant directement avec l'exportine (TAP/NXF1), soit en interagissant avec la protéine HBc qui se fixe d'une part à l'ARNpg, *via* son domaine riche en arginines, et d'autre part à l'exportine TAP/NXF1, *via* ses deux NES (**étape 5**). Les ARNm viraux sont ensuite traduits par la machinerie cellulaire et les protéines virales (HBc et la polymérase) sont synthétisées (**étape 6**).

La protéine HBc synthétisée encapside l'ARNpg (**étape 7**) pour former les particules virales immatures. L'ARNpg est ensuite rétro-transcrit en ADN simple brin (ADNs) par la transcriptase inverse virale (**étape 8**) puis en ADNrc pour former les particules virales matures (**étape 9**). Les particules virales matures sont soit sécrétées (**étape 10**) soit recommencent un nouveau cycle nucléaire (**étape 1**). Ainsi, le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid HBc est au centre du cycle infectieux du HBV. L'inhibition de ce transport nucléo-cytoplasmique affecte considérablement la réplication du génome viral et pourrait être une cible de développement d'antiviraux (Li, H.-C. et al. 2010; Blondot et al. 2016; Karayiannis 2017).

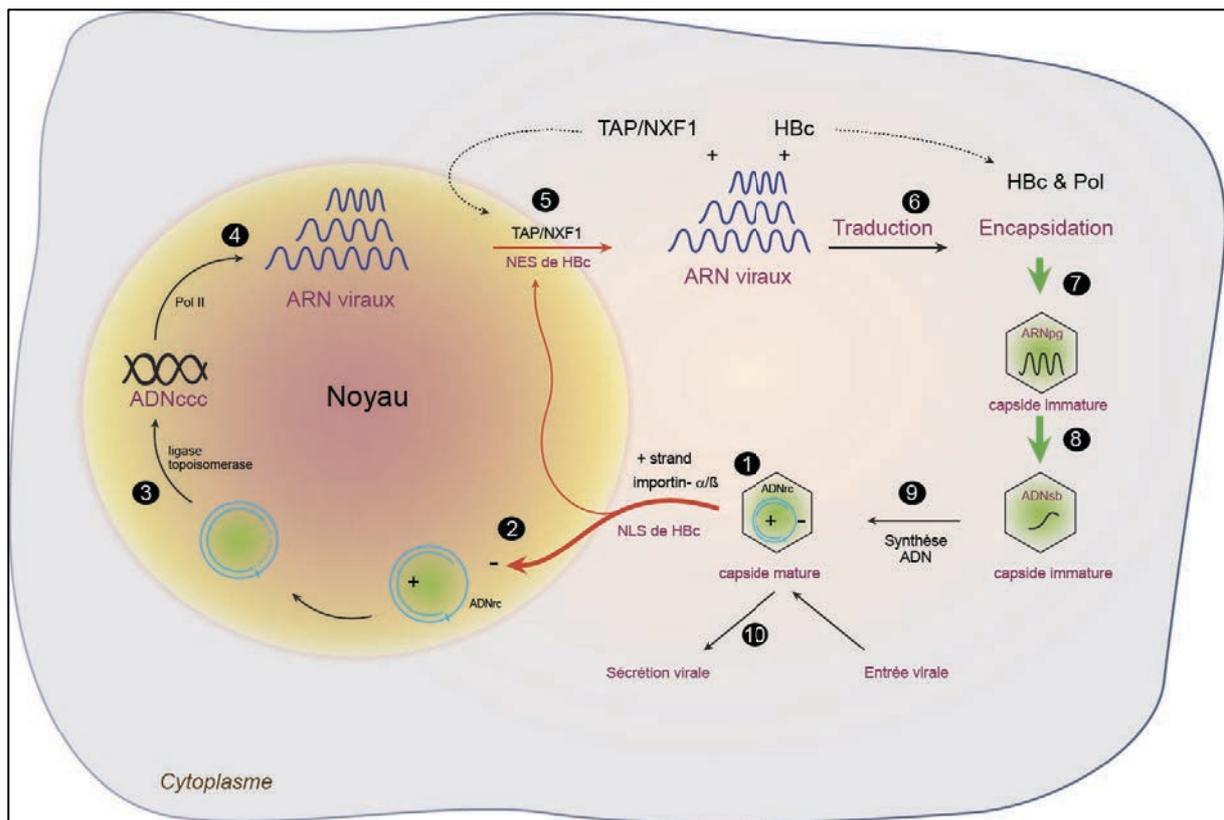


Figure 15: Cycle cellulaire du virus de l'hépatite B (HBV).

Voir le texte principal pour les détails de la figure. Adaptée de (Li, H.-C. et al. 2010). ADNrc : *relaxed circular DNA*, ARNpg : ARN pré-génomique, Pol II : ARN-polymérase II ADN-dépendante cellulaire ADNs : ADN simple brin.

Contrairement aux virus à ADN, la majorité des virus à ARN non segmentés, simple brin se répliquent dans le cytoplasme des cellules infectées. Cependant, plusieurs protéines structurales (comme les protéines de capsid) de ces virus ont, en plus de leur rôle dans l'assemblage des particules virales, une localisation nucléaire afin d'améliorer la réplication du génome viral dans la cellule hôte ou inhiber la réponse immunitaire. C'est le cas par exemple des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* et *Coronaviridae* (pour revue voir (Wulan et al. 2015)).

Le **virus de l'hépatite C** (HCV) appartient à la famille des *Flaviviridae*. C'est un virus à ARN simple brin de polarité positive. Sa protéine de capsid core (c) a une localisation nucléaire à un stade très précoce du cycle infectieux (6 heures post-infection). La protéine core du HCV possède 3 NLS reconnus par l'importine α afin d'être transloquée dans le noyau des cellules hôtes (Suzuki et al. 2005; Cerutti et al. 2011). Cette protéine possède également un NES lui permettant d'interagir avec l'exportine1 afin de rejoindre le site d'assemblage cytoplasmique (Cerutti et al. 2011). Il a été démontré que la protéine core du HCV interagit avec la ribo-nucléoprotéine nucléaire hétérogène K (HNRNPK) (Hsieh et al. 1998). L'inhibition du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine core du HCV induit une diminution de la production virale (Cerutti et al. 2011). Il est à préciser que la protéine core d'autres virus de la famille des *Flaviviridae* (*Dengue virus*, *West Nile virus*, *Japanese encephalitis virus*) exploitent également le transport nucléo-cytoplasmique (pour revue voir : (Wulan et al. 2015)).

Le **virus de la rougeole (Measles virus : MV)** appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, virus à ARN simple brin de polarité négative non segmenté. Sa nucléocapsid (NP) possède un NLS et un NES (Sato et al. 2006). La nucléoprotéine du MV joue un rôle d'antagoniste de la réponse immunitaire IFN- α/β et γ en inhibant la translocation nucléaire de STAT. La translocation nucléaire de cette protéine est importante pour son rôle d'antagoniste à la réponse immunitaire (Takayama et al. 2012).

En plus des protéines de capsid, d'autres protéines virales exploitent également le transport nucléo-cytoplasmique. C'est le cas de la phosphoprotéine (protéine P) du **virus de la rage**. Le virus de la rage (*Rabies virus* : RV) appartient à la famille des *Rhabdoviridae* et est constitué d'un génome à ARN d'environ 12kb, simple brin de polarité négative non segmenté. La protéine P du RV est une protéine de 297 aa. Comme la protéine L (*large protein* ou polymérase virale) et la nucléoprotéine (NP), la protéine P est une composante importante du complexe de réplication virale.

En plus de son rôle crucial dans la réplication et la transcription du génome viral, la protéine P est un antagoniste important de la réponse immunitaire innée dépendante de STAT. Pour mieux assurer cette fonction, la phosphoprotéine P exploite le transport nucléocytoplasmique des cellules hôtes (pour revue voir (Delmas et al. 2010)). Elle possède des NLS et NES en position C-terminale lui permettant de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau des cellules hôtes en interagissant avec les importines et exportines (Rowe et al. 2016).

Le virus *Influenza* est le prototype des virus à ARN segmenté, simple brin, de polarité négative. Il appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*. La réplication et la transcription du génome de ce virus se déroulent dans le noyau des cellules hôtes. C'est l'un des rares virus à ARN connu qui se réplique dans le noyau. Son génome code trois protéines d'enveloppe (l'hémagglutinine, la neuraminidase et la protéine M2) ainsi que la protéine de matrice M1. La polymérase trimérique (PB1, PB2 et PA) associée à la nucléoprotéine (NP) et à l'ARN viral constitue l'unité de base de réplication et de transcription du génome viral appelée ARN ribonucléoprotéine viral (RNPv). Le génome du virus *Influenza* code également la nuclear export protein (NEP) et des protéines non structurales (NS1, NS3). La majorité de ces protéines possèdent des NLS et des NES qui interagissent respectivement avec les importines et les exportines afin d'assurer un transport nucléocytoplasmique efficace. Ainsi, la protéine NS1 possède 2 NLS et 1 NES, les sous-unités de la polymérase PB1, PB2 et PA possèdent respectivement 1, 2 et 2 NLS. La nucléoprotéine NP possède 2 NLS et 3 NES. La protéine M1 possède 1 NLS et 1 NES et la NEP diffuse de manière passive dans le noyau (protéine de 14 kDa) mais possède 2 NES (pour revue voir (Li, J. et al. 2015; Boulo et al. 2007)). Au cours du cycle infectieux du virus *Influenza*, la RNPv est importée dans le noyau à des temps précoces de l'infection pour assurer la réplication du génome viral. Les protéines virales nouvellement synthétisées (NP, NEP, M1) sont ensuite importées dans le noyau pour assurer l'assemblage de la RNPv et son export du noyau vers le cytoplasme pour l'assemblage en particules virales. L'inhibition de l'import ou de l'export nucléaire de l'une ou de plusieurs de ces protéines affecte négativement la réplication du génome viral (pour revue voir (Li, J. et al. 2015; Boulo et al. 2007)).

Concernant **le HEV**, Lenggenhager et collaborateurs ont montré en analysant des biopsies de foie de patients infectés par le HEV, que la protéine de capsid ORF2 a une localisation nucléaire (Lenggenhager et al. 2017). Nous avons également démontré en utilisant une approche de fractionnement cellulaire que la protéine ORF2 du HEV se localise non seulement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau (Ankavay et al. 2019).

Cependant, les mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2 et l'importance de cette localisation nucléaire dans le cycle infectieux du HEV ne sont pas connus à ce jour.

Ces quelques exemples illustrent de manière résumée l'importance du transport nucléo-cytoplasmique dans le cycle infectieux de nombreux virus. Plusieurs inhibiteurs du transport nucléo-cytoplasmique ont été développés et ont montré une activité antivirale.

3. Les inhibiteurs du transport nucléo-cytoplasmique sont des antiviraux potentiels

Le premier inhibiteur du transport nucléo-cytoplasmique, identifié il y a une vingtaine d'années, est la leptomycine B (LMB) qui inhibe spécifiquement l'exportine1. De manière intéressante, ces 5 dernières années ont été marquées par la découverte et la caractérisation de plusieurs inhibiteurs non seulement de l'export mais aussi de l'import nucléaires. Plusieurs de ces inhibiteurs font l'objet d'études précliniques/cliniques dans le traitement du cancer et des infections virales (Jans et al. 2019).

3.1. Les inhibiteurs d'import nucléaire

L'ivermectine est l'inhibiteur d'import nucléaire le mieux caractérisé à ce jour. C'est un composé approuvé par la FDA pour le traitement des infections parasitaires humaines et animales, (pour revue voir (González Canga et al. 2008)). Son pouvoir inhibiteur de l'import nucléaire a été découvert en 2011 au cours d'un screening sur le HIV. En effet, l'ivermectine inhibe spécifiquement la voie d'import dépendante des importines $\alpha/\beta 1$ mais n'affecte pas celle de l'importine $\beta 1$ seule (Wagstaff et al. 2011). L'ivermectine inhibe par conséquent le cycle infectieux des virus qui exploitent la voie d'import nucléaire dépendante des importines $\alpha/\beta 1$ tels que le HIV (Wagstaff et al. 2011), le virus de la Dengue (Wagstaff et al. 2012) et le virus *Influenza* (Götz et al. 2016). D'autres inhibiteurs des importines ont été également identifiés. C'est le cas de l'importazole et la karyostatine qui inhibent l'importine $\beta 1$. Cependant, aucune étude clinique n'est réalisée actuellement pour ces deux derniers composés (pour revue voir (Jans et al. 2019)).

3.2. Les inhibiteurs d'export nucléaire

La leptomycine B (LMB) qui cible spécifiquement l'exportine1 a été isolée de *Streptomyces*. Elle se fixe de manière covalente et non réversible au niveau de la cystéine 528 de l'exportine1 inhibant ainsi son interaction avec les NES présents sur les protéines. De part sa forte cytotoxicité *in vivo*, l'utilisation de la LMB est limitée aux études *in vitro* du transport nucléo-cytoplasmique des protéines (Mathew & Ghildyal 2017).

De nouveaux inhibiteurs de l'exportine1 ont été développés par Karyopharm Pharmaceuticals appelés KPT-SINE (SINE : *Selective Inhibitors of Nuclear Export*). Ces inhibiteurs se fixent de manière covalente mais réversible (contrairement à la LMB) à l'exportine1 (Fung & Chook 2014). Les KPT-SINE sont des molécules à visée thérapeutique dans le cadre du traitement des cancers solides et du sang (Sun et al. 2016; Turner et al. 2012).

Parmi les KPT-SINE, deux composés, le Selinexor (KPT-330) et le Verdinexor (KPT-335) sont en phase clinique. Selinexor est impliqué dans une quarantaine d'essais cliniques et est approuvé par la FDA pour le traitement du myélome multiple (Vogl et al. 2018). Verdinexor quant à lui inhibe la réplication du virus *Influenza* et est bien toléré en phase clinique I (Perwitasari et al. 2016; Mathew & Ghildyal 2017).

Ainsi, les inhibiteurs de l'import et de l'export nucléaires des protéines sont de potentiels antiviraux qui pourraient être utilisés en thérapie contre plusieurs virus pathogènes humains et animaux.

II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

A. Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du virus de l'hépatite E (HEV)

L'hépatite E est actuellement la première cause d'hépatite aiguë dans le monde. Environ 20 millions de personnes sont infectées chaque année par ce virus. Le HEV est à l'origine d'environ 77 000 décès par an. Longtemps considéré comme un problème de santé publique touchant uniquement les pays en développement, l'hépatite E a été identifiée récemment comme étant une zoonose dans les pays industrialisés dont le nombre de cas diagnostiqués a fortement augmenté ces dernières années. L'hépatite E est maintenant considérée comme un problème émergent.

L'étude du HEV en culture cellulaire a longtemps été difficile. Cependant, des outils d'étude ont pu voir le jour ces dernières années permettant ainsi de dévoiler quelques aspects fondamentaux du cycle infectieux de ce virus. Tout récemment, nous avons implémenté un système de culture cellulaire du HEV en utilisant le HEV-3, souche Kernow-C1/p6 et les cellules PLC3 (clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5). Nous avons pu montrer que le HEV produit au moins trois formes différentes de la protéine ORF2: (i) la forme ORF2i ou forme infectieuse associée au génome viral qui est non glycosylée (ii) la forme ORF2g ou forme glycosylée (N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée) et (iii) la forme ORF2c ou forme clivée de la forme ORF2g. Les formes ORF2g et ORF2c ne sont pas infectieuses, ne forment pas de matériel particulaire mais sont N-glycosylées, O-glycosylées, sialylées et massivement sécrétées dans le surnageant des cellules en culture cellulaire et dans le sérum des patients infectés par le HEV (Montpellier et al. 2018).

Plusieurs questions de recherche ont été posées après l'obtention de ces derniers résultats sur le HEV à savoir: Quel est le rôle exact de la N-glycosylation des formes ORF2g et ORF2c dans le cycle infectieux du HEV ? Pourquoi le HEV secrète massivement des formes de sa protéine de capsid non associée aux particules infectieuses dans le sérum des patients infectés ou dans le surnageant des cellules en culture ? **Mon premier objectif de thèse était donc de déterminer le rôle de la N-glycosylation dans le cycle infectieux du HEV.**

B) Etude des mécanismes du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV

Nous avons démontré au cours de l'étude sur la N-glycosylation que la protéine de capsid ORF2 est transloquée dans le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV (Ankavay et al. 2019). Cette observation a également été faite par Lenggenhager et collaborateurs dans le noyau d'hépatocytes provenant de biopsies de foie de patients infectés par le HEV (Lenggenhager et al. 2017). Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines de haut poids moléculaire chez les cellules eucaryotes est régulé par les protéines de la grande famille de karyophérine (importines et exportines). Les importines reconnaissent spécifiquement des protéines qui possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) et les transportent du cytoplasme vers le noyau. Les exportines, quant à elles, reconnaissent les protéines qui possèdent un signal d'export nucléaire (NES) et les transportent du noyau vers le cytoplasme. Plusieurs virus détournent ces mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique pour améliorer la réplication de leur génome ou pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (Yarbrough et al. 2013). Concernant le HEV, les mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 et son importance dans le cycle infectieux de ce virus ne sont pas connus. Il se pose donc plusieurs questions sur la localisation nucléaire de la protéine ORF2: (i) Par quel mécanisme la protéine ORF2 est importée dans le noyau des cellules infectées par le HEV ? (ii) Quel est le rôle de la localisation nucléaire de cette protéine dans le cycle infectieux du HEV ?

Mon deuxième objectif de thèse était donc de déterminer les mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2 et son importance dans le cycle infectieux du HEV.

III.RESULTATS

III. RESULTATS

A) Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du virus de l'hépatite E (HEV)

La protéine ORF2 est une protéine de 660 aa qui possède un peptide signal N-terminal (23 premiers acides aminés) et trois sites potentiels de N-glycosylation. Les trois sites potentiels de N-glycosylation de cette protéine sont situés respectivement au niveau des asparagines 137 (séquen N-L-S-T) ; 310 (séquen N-L-T-P) et 562 (séquen N-T-T-A) (pour revue voir (Ankavay et al. 2018) et (Nimgaonkar et al. 2018)). La N-glycosylation est importante pour la maturation, la stabilité et le trafic intracellulaire des protéines cellulaires et virales ainsi que dans plusieurs étapes du cycle infectieux de différents virus (Varki, Cummings, Esko, Hart, et al. 2015; Vigerust & Shepherd 2007). Jusqu'à ce jour, aucune étude sur le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV n'a été réalisée dans un système infectieux robuste.

Dans cette première partie de ma thèse, plusieurs approches expérimentales ont été combinées pour comprendre le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2: la mutagenèse dirigée, la génétique inverse, l'immunofluorescence, la microscopie confocale, le western blot, la détermination des titres infectieux, la RT-qPCR, le fractionnement subcellulaire, la séparation des protéines par gradient d'iodixanol et la spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont montré que la protéine ORF2 est N-glycosylée uniquement au niveau des sites N1 et N3, le site N2 n'étant pas favorable à la N-glycosylation contrairement aux résultats publiés en utilisant des systèmes hétérologues. Nous avons révélé que la N-glycosylation de la protéine ORF2 n'affecte pas son oligomérisation, sa stabilité ni sa reconnaissance par différents anticorps et notamment ceux produits chez les patients infectés par le HEV. Elle n'a également aucun impact sur l'assemblage et l'infectiosité des particules virales. Enfin, nous avons démontré que la protéine ORF2 est transloquée dans le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV de manière indépendante de la N-glycosylation (Ankavay et al. 2019). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Scientific Reports* (IF 2017 : 4,122) intitulée : « **New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle** ».

Maliki Ankavay^a, Claire Montpellier^a, Ibrahim M. Sayed^{b,c,s}, Jean-Michel Saliou^a, Czeslaw Wychowski^a, Laure Saas^a, Sandrine Duvet^d, Cécile-Marie Aliouat-Denis^a, Rayan Farhat^a, Valentin de Masson d'Autume^a, Philip Meuleman^b, Jean Dubuisson^a and Laurence Cocquerel^{a,*}

B) Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV

1. Rationnel:

L'identification des différentes formes de la protéine ORF2 ainsi que leurs modifications post-traductionnelles nous ont permis d'émettre l'hypothèse qu'il existe probablement un mécanisme de régulation fine de l'expression de la protéine de capsid ORF2 qui pourrait alors suivre deux voies de production:

- **une voie productive d'assemblage** conduisant à l'expression de la protéine ORF2i qui est la forme associée aux particules infectieuses. Dans cette voie, le peptide signal (PS) de la protéine ORF2 ne serait pas fonctionnel. La protéine ORF2i resterait donc du côté cytosolique des compartiments membranaires de la voie de sécrétion pour ensuite rejoindre le site d'assemblage des particules virales (qui n'est pas connu à ce jour). Dans cette voie, une fraction de la protéine ORF2 subit également une translocation nucléaire pour sans doute contrôler certaines fonctions cellulaires afin de promouvoir la réplication virale et/ou altérer la réponse antivirale de la cellule infectée. Nous avons appelé la protéine ORF2i retrouvée dans le noyau la forme ORF2ni (n pour nucléaire et i pour intracellulaire).

- **une voie non-productive d'assemblage** conduisant à la sécrétion massive des protéines ORF2g/ORF2c qui ne sont pas associées à du matériel infectieux. Dans cette voie, la protéine ORF2 est transloquée dans la lumière du RE, processus durant lequel son PS est clivé et la protéine est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée. La protéine ORF2g (g pour glycosylée) suivrait alors la voie de sécrétion où elle subirait des modifications post-traductionnelles : maturation des N-glycanes, et maturation par des protéases (clivage au niveau d'une séquence riche en arginines (SeqR) en amont de la S³⁴) pour générer la forme ORF2c (c pour clivée).

La protéine ORF2 est constituée de 660 aa dont les 23 premiers aa correspondent au PS (**Figure 16, ligne pointillée**). Néanmoins, la présence d'une SeqR juste en aval du PS (**Figure 16, résidus R en bleu**) constituerait probablement un contexte défavorable à la fonctionnalité optimale de ce PS. Comme décrit précédemment, la séquence de la protéine ORF2 présente également 3 sites potentiels de N-glycosylation (**Figure 16, cadres**) mais seuls les sites 1 et 3 des protéines ORF2g et ORF2c sont occupés par des N-glycanes (Ankavay et al. 2019). Des analyses de spectrométrie de masse et marquage N-terminal nous ont permis de définir les extrémités N-terminales des protéines ORF2i, ORF2g (Montpellier et al. 2018) et ORF2c (Ankavay et al. 2019).

Le premier aa de la protéine ORF2i est la Leucine¹⁴ alors que celui de la protéine ORF2g est la Serine³⁴ et celui de la protéine ORF2c est la Serine¹⁰² (**Figure 16**).

Ces résultats indiquent que : (i) Dans le contexte de la protéine ORF2i, le PS de cette protéine ORF2 n'est pas clivé, la protéine n'est donc probablement pas transloquée dans la lumière du RE. L'absence de glycosylation de la protéine ORF2i conforte cette hypothèse. (ii) L'analyse de la séquence et des modifications post-traductionnelles des protéines ORF2g et ORF2c indique que leur PS est clivé lors de leur translocation dans la lumière du RE et sont probablement maturées par des protéases du type furine (dont la séquence consensus de clivage est (R-X-R/K-R) correspondant aux SeqR situées en amont des formes ORF2g et ORF2c (**Figure 16**).

Ces observations montrent que le cycle infectieux du HEV ou tout au moins la production de particules virales infectieuses serait donc finement régulée par l'adressage différentiel de la protéine de capsid ORF2. En utilisant notre système de culture du HEV-3 et des cellules PLC3 (clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5) (Montpellier et al. 2018), nos résultats montrent pour la première fois que la protéine ORF2 possède un NLS classique de type monopartite en position N-terminale constitué d'une séquences riche en arginines (SeqR) en position (28-RRRGRR-33). De manière surprenante, nous avons observé que cette SeqR régule non seulement l'import nucléaire de la protéine ORF2 mais aussi sa translocation réticulaire. Nous avons également montré que la protéine ORF2 colocalise avec l'importine $\alpha 1$. En plus, en utilisant la LMB, un inhibiteur de l'exportine1, nos résultats ont montré que la protéine ORF2 est exportée du noyau vers le cytoplasme de manière dépendante de l'exportine1. Nous avons pu identifier précisément les signaux d'export nucléaire (NES) présents sur cette protéine. La protéine ORF2 possède 3 NES fonctionnels situés en position C-terminale (au niveau des résidus 465, 540 et 640). Enfin, nous avons montré que la protéine ORF2 colocalise avec l'exportine1. L'analyse de l'importance de ce transport nucléocytoplasmique dans le cycle infectieux du HEV est en cours de réalisation (Données non publiées et confidentielles).

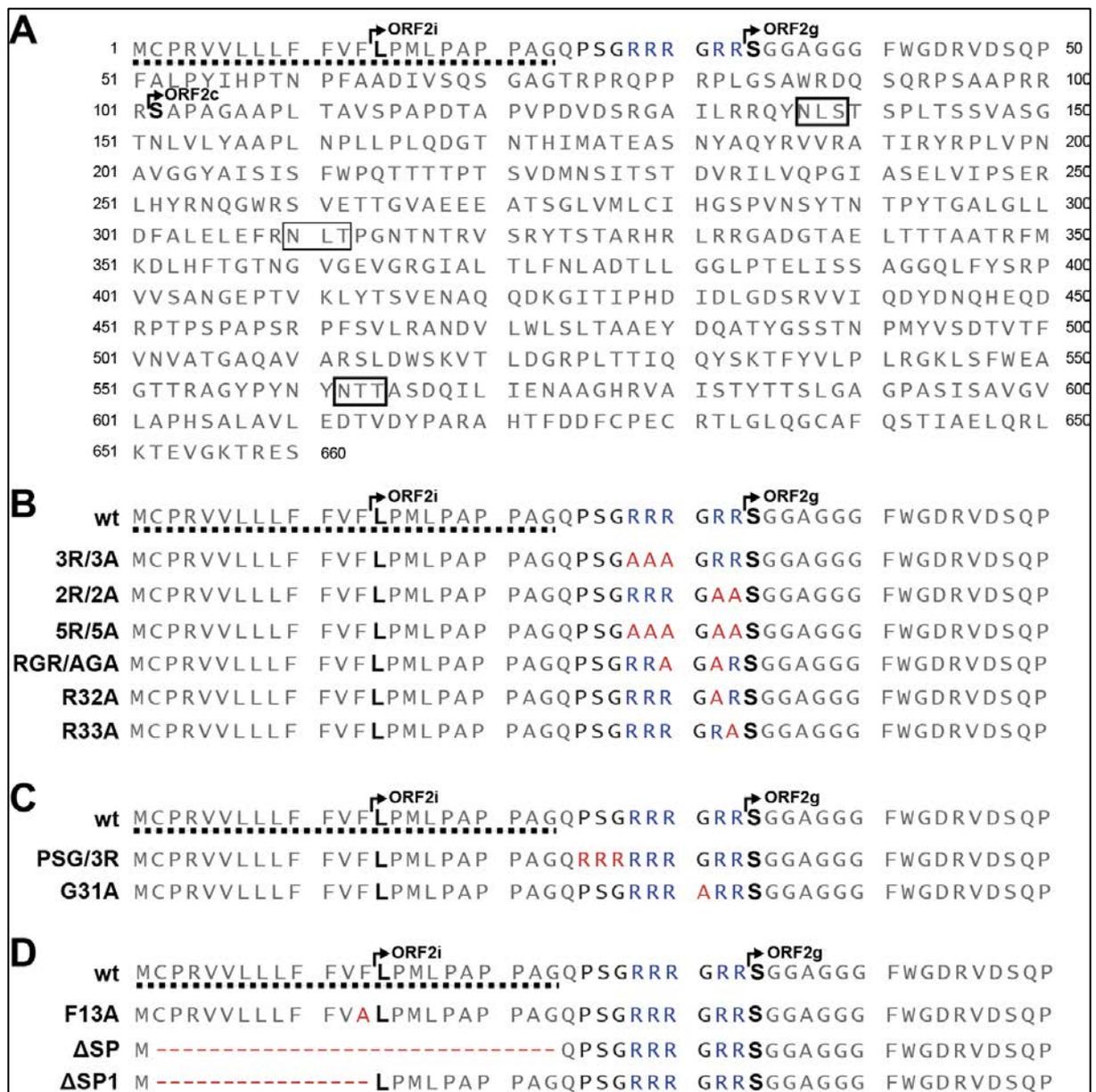


Figure 16: Séquence de la protéine ORF2 et présentation des mutants réalisés

(A) La protéine ORF2 possède 660 acides aminés. Elle possède un peptide signal (SP) en position N-terminale (représenté par des pointillés). Les séquences des différentes formes de la protéine ORF2 sont représentées par des flèches (ORF2i, ORF2g et ORF2c). Les 3 sites potentiels de N-glycosylation sont représentés par des rectangles. (B) Les différents mutants de la séquence riche en arginines (potentiel NLS) sont présentés. (C) Les mutants PSG/3R et G31A (D) Les différents mutants du peptide signal.

2. Matériel et méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cellules PLC3 (sous-clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5) (Montpellier et al. 2018) et Huh.7.5 ont été cultivées à 37°C dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1 % d'acides aminés non essentiels (Life Technology). Les cellules PLC3 transfectées avec les ARN cappés du HEV-3 souche Kernow-C1/p6 ont été cultivées à 32°C dans du DMEM/M199 (1v:1v) supplémenté de 1 mg/ml d'Albumax ITM, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de pyruvate de sodium (Life Technology).

2.2. Plasmide, mutagenèse et transfection

Le plasmide pBlueScript SK(+) portant l'ADNc pleine longueur du génome du HEV-3 souche kernow C-1/p6 (Numéro d'accèsion JQ679013) adaptée à la culture cellulaire, nous a été offert gracieusement par S.U. Emerson (Shukla et al. 2012). Les mutations de la SeqR et des NES ainsi que les délétions du PS complet ou partiel ont été réalisées par mutagenèse dirigée en utilisant le pBlueScript SK(+)-HEVp6 comme matrice. Les mutations ont été introduites en utilisant des amorces possédant les mutations ou les délétions voulues. Pour cela, des séries de PCR ont été réalisées en utilisant la Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, NEB). Les fragments sauvages ont été échangés par les fragments mutés obtenus par PCR en utilisant les sites de restrictions de différentes enzymes présentes sur le plasmide pBlueScript SK(+)-HEVp6 et par ligation *in vitro*. La présence des mutations a été vérifiée par séquençage. Les ARN génomiques (ARN cappés) de la souche sauvage et des mutants ont été obtenus par transcription *in vitro* avec le kit mMMESSAGE mMACHINE[®] (Ambion) selon les recommandations du fabricant. Le plasmide pBlueScript SK(+)-HEVp6 sauvage et mutés préalablement linéarisé en 3' au niveau du site de restriction MluI a été utilisé comme matrice. Les ARN cappés HEV-p6 sauvage ou mutés ont été ensuite transfectés dans les cellules PLC3 (PLC3/HEV-p6 sauvage et mutés) par électroporation en utilisant l'électroporateur Gene Pulser XcellTM apparatus (Bio-Rad).

2.3. Anticorps

Un anticorps monoclonal murin anti-ORF2 (1E6 #AB-827236, Millipore) a été utilisé pour détecter la protéine ORF2 en immunofluorescence et en western blot. Les anticorps: monoclonal de lapin anti-exportine1 (Exportine-1/CRM1, #43249, Cell Signaling Technology) et polyclonal de chèvre anti-importine alpha 1 (Anti-KPNA2, #ab6036, Abcam) ont été utilisés. Les anticorps: monoclonal murin anti- β tubuline (#AB-609915, Sigma) et polyclonal de lapin anti-Lamine B1 (#AB-443298, Abcam) ont été utilisés pour contrôler la qualité des extractions nucléaires et cytoplasmiques. Les anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (Cy3 ou Alexa 488) correspondant aux anticorps primaires ont été commandés chez Jackson ImmunoResearch.

2.4. Immunofluorescence

Les cellules PLC3/HEV-p6 sauvage et mutés ont été cultivées sur des lamelles dans des plaques 24 puits et fixées 3 jours post-électroporation (p.e.) avec 3% de paraformaldehyde (PFA) pendant 20 minutes à température ambiante (TA). Ensuite, les cellules ont été perméabilisées respectivement avec du méthanol frais 100% et du Triton X-100 0,5% pendant 5 minutes et 10 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec 10% de sérum de chèvre ou de cheval pendant 30 minutes, puis incubées avec un anticorps anti-ORF2 (1E6) dilué au 1/500 pendant 30 minutes à TA. Les anticorps primaires anti-exportine1 et anti-importine alpha1 ont été utilisés respectivement au dilution 1/400 et 1/200. Après 3 étapes de lavage avec du PBS 1X, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à des fluorochromes (Cy3 ou Alexa 488) correspondant à l'anticorps primaire utilisé. Les noyaux des cellules ont été marqués concomitamment avec le DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) dilué au 1/500. Après 3 étapes de lavage avec du PBS 1X, les lamelles ont été montées sur des lames portes objets avec du Mowiol 4–88 (Calbiochem), ensuite les cellules ont été analysées au microscope confocale LSM (Zeiss), objectif 40x à immersion. La détermination de la colocalisation de la protéine ORF2 avec les protéines cellulaires exportine1 ou importine alpha1 a été effectuée en calculant le coefficient de pearson avec le logiciel CoLocalizer pro.

2.5. Quantification de l'intensité de la fluorescence nucléaire de la protéine ORF2

La quantification de la fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ (Version 1.51) comme décrit précédemment (Ankavay et al. 2019).

De manière simplifiée, les régions d'intérêt (ROI) ont été délimitées autour des noyaux des cellules PLC3/HEV-p6 sauvage et mutés et des cellules PLC3 non transfectées (contrôle négatif) à partir des images obtenues en microscopie confocale. Les mesures suivantes ont été réalisées : "*Area, Integrated density et Mean gray value*". L'intensité totale de fluorescence de la protéine ORF2 (ITFO) a été calculée selon la formule suivante: $ITFO = \text{"Integrated density" des régions d'intérêt sélectionnées sur des cellules positives à l'ORF2} - (\text{"Area" des régions d'intérêt sélectionnées sur des cellules positives à l'ORF2} \times \text{"Mean gray value" du bruit de fond de fluorescence des ROI sélectionnées autour des cellules d'intérêt})$. Ensuite, l'ITFO exacte (ITFOE) a été déterminée en réduisant l'auto-fluorescence des cellules PLC3 non transfectées (contrôle négatif) selon la formule suivante: $ITFOE = ITFO - \text{"Integrated density" déterminée autour du noyau des cellules PLC3 non transfectées traitées dans les mêmes conditions que les cellules transfectées}$.

2.6. Extractions cytoplasmiques et nucléaires

Six jours p.e., les cellules PLC3/HEV-p6 sauvage et mutés ont été trypsinées avec de la trypsine-EDTA à partir de flasques T75 confluentes (6×10^6 cellules). Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS 1X puis les extractions cytoplasmiques et nucléaires ont été réalisées en utilisant le kit commercialisé Thermo Scientific #78833 selon les recommandations du fabricant.

2.7. Western blot (WB)

Six jours p.e., les surnageants des cellules PLC3/HEV-p6 sauvage et mutés ont été collectés puis chauffés à 80°C pendant 20 minutes ainsi que les extraits cytoplasmiques et nucléaires en présence du Tampon Laemmli en condition réductrice (en présence de DTT: Dithiothréitol). Les protéines ont ensuite été séparées par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 10% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham). Les protéines cibles (ORF2, Exportine1, Importine alpha1, tubuline et lamine B1) ont été détectées en utilisant les anticorps primaires spécifiques et secondaires couplés à la peroxydase par la technique de chemiluminescence.

2.8. Titres infectieux

Les surnageants (SN) obtenus à 6 jours p.e. ont été utilisés pour infecter les cellules Huh-7.5 naïves (3×10^3 cellules) dans des plaques 96 puits platées 24h avant infection.

Trois jours post-infection, les cellules ont été fixées et la protéine ORF2 a été détectée par immunofluorescence comme décrit ci-dessus. Les cellules positives à l'ORF2 ont été comptées en microscopie à épifluorescence comme des cellules infectées. Ensuite, le nombre de cellules infectées pour chaque dilution a été quantifié et utilisé pour déterminer les titres infectieux en FFU/ml (Focus Forming Unit/ml).

2.9. Traitement Leptomycine B (LMB)

Les cellules PLC3/HEV-p6 sauvages cultivées sur des lamelles ont été traitées à 8 jours p.e. avec de la LMB (#9676, Cell Signaling Technology) à 20 nM. La LMB est un inhibiteur de l'Exportine1. Seize heures post-traitement, les cellules ont été fixées et la protéine ORF2 a été détectée en utilisant un anti-ORF2 par immunofluorescence. L'intensité de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ comme décrit ci-dessus.

2.10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism version 5.0. Le test de student (T-test) a été utilisé pour comparer les pourcentages. Les valeurs p ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

3. Résultats obtenus

3.1 La protéine ORF2 est importée du cytoplasme vers le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV

3.1.1 La protéine ORF2 est transloquée dans le noyau des cellules infectées par le HEV

Nous avons observé que la protéine de capsid ORF2 du HEV présente non seulement une localisation cytoplasmique mais aussi nucléaire (**Figure 17 et 18A**). Cette localisation subcellulaire a également été décrite par Lenggenhager et collaborateurs sur des biopsies de foie de patients infectés par le HEV (Lenggenhager et al. 2017). Nous avons confirmé cette localisation cytoplasmique et nucléaire en réalisant des extractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules produisant le HEV (Ankavay et al. 2019) et (**Figure 19B et 19C**).

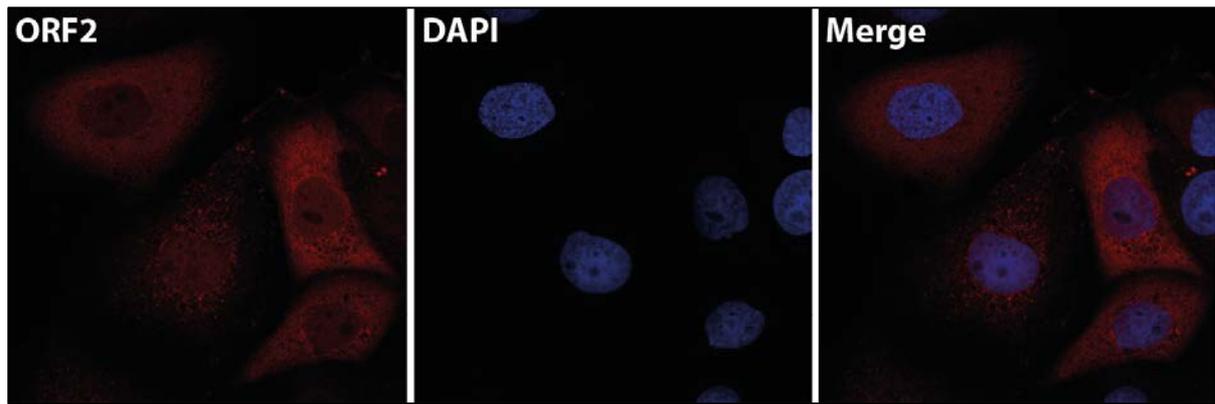


Figure 17: Localisation subcellulaire de la protéine ORF2

Les cellules PLC3 ont été électroporées avec les ARN capés du HEV souche p6 transcrits *in vitro*. 3 jours post-électroporation, les cellules ont été fixées puis la protéine ORF2 a été identifiée par immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques. Les images présentées ici ont été prises en microscopie confocale objectif 40x. En rouge la protéine ORF2, en bleu le noyau des cellules et merge est la superposition du marquage ORF2 et du DAPI.

3.1.2. La protéine de capsid ORF2 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) potentiel

Les mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 ne sont pas connus à ce jour. Il est décrit dans la littérature que les protéines cellulaires et virales qui exploitent le transport nucléo-cytoplasmique possèdent des signaux de localisation nucléaire (Yarbrough et al. 2013).

Afin de savoir si la protéine ORF2 possède un NLS potentiel, sa séquence en aa a été analysée dans un site de prédiction des NLS appelé NLSTramus (Nguyen Ba et al. 2009). Les résultats ont montré que cette protéine ORF2 possède une séquence riche en arginines (SeqR) qui pourrait correspondre à un NLS de type monopartite situé au niveau des résidus 28-RRRGR-33 (**Figure 16A, résidus en bleu**).

3.1.3. Caractérisation de la fonctionnalité de la séquence riche en arginines (SeqR), NLS potentiel de la protéine ORF2

Afin de caractériser la SeqR qui se situe en aval du PS de la protéine ORF2 et en amont du premier aa (S^{34}) de la forme ORF2g, une série de mutants a été générée (**Figure 16**) :

(i) Pour étudier l'impact de la SeqR sur la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2 et sur la translocation nucléaire, nous avons remplacé les résidus R par des résidus Alanine (A), comme indiqué dans la **Figure 16B**.

(ii) Pour étudier l'impact de l'ajout d'une SeqR sur la fonctionnalité du PS et du NLS potentiel, nous avons construit le mutant PSG/3R pour lequel les résidus PSG ont été remplacés par trois résidus R supplémentaires, comme indiqué dans la **Figure 16C**.

(iii) Pour étudier l'importance du résidu Glycine³¹ (G) qui est totalement conservé parmi les souches HEV, nous l'avons muté en alanine, comme indiqué dans la **Figure 16C**.

(iv) Pour étudier l'importance de la Phenylalanine¹³ (F) en position -1 de l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2i sur la maturation de celle-ci et l'assemblage de particules infectieuses, nous l'avons muté en alanine, comme indiqué dans la **Figure 16D**.

(v) Pour étudier l'impact de la délétion de la séquence du PS de la protéine ORF2 sur le cycle infectieux du HEV, nous avons délété soit la totalité (Δ SP) soit la partie N-terminale de ce PS (Δ SP1), comme indiqué dans la **Figure 16D**.

L'ensemble des mutations a été généré par mutagenèse dirigée dans le contexte de la souche infectieuse du HEV-p6. Les ARNs transcrits et cappés *in vitro* ont été transfectés par électroporation dans des cellules PLC3.

Trois jours après électroporation, les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps anti-ORF2 (1E6). Les niveaux d'électroporation ont été contrôlés par comptage des cellules marquées (microscopie à épifluorescence et logiciel ImageJ).

La distribution subcellulaire de chacun des mutants a été analysée par microscopie confocale (**Figure 18**). A 6 jours post-électroporation, les surnageants (SN) des cellules transfectées ont été récoltés, analysés par Western Blot (WB) avec un anticorps anti-ORF2 (1E6) (**Figure 19**) et utilisés pour définir les titres infectieux (**Figure 19D**). A partir des cellules transfectées, des extraits cytoplasmiques (EC) et nucléaires (EN) ont été préparés (kit Thermo Scientific) et analysés par WB avec des anticorps dirigés contre la protéine ORF2 (1E6) mais aussi contre des protéines permettant de contrôler la qualité des extraits préparés: le marqueur nucléaire Lamine B1 et le marqueur cytoplasmique Tubuline (**Figure 19B et 19C**).

Les différents mutants présentaient des niveaux d'électroporation d'environ 90% pour chacune des constructions (données non montrées). Les immunofluorescences (IF) et l'analyse des EC ont montré que les protéines ORF2 sauvage ou mutées étaient exprimées à des niveaux équivalents (**Figure 19B**).

Par contre, les analyses de microscopie confocale, de WB des différents extraits et les titres infectieux ont montré que les mutations induisaient des phénotypes différents : (i) la mutation de la SeqR (mutants 3R/3A, 2R/2A, 5R/5A, RGR/AGA, R32A et R33A, **Figure 16**) conduisait à une inhibition significative voire totale de la localisation nucléaire de l'ORF2 (**Figure 18A et Figure 19C**), en comparaison avec la protéine sauvage, indiquant que cette SeqR constitue probablement un NLS fonctionnel.

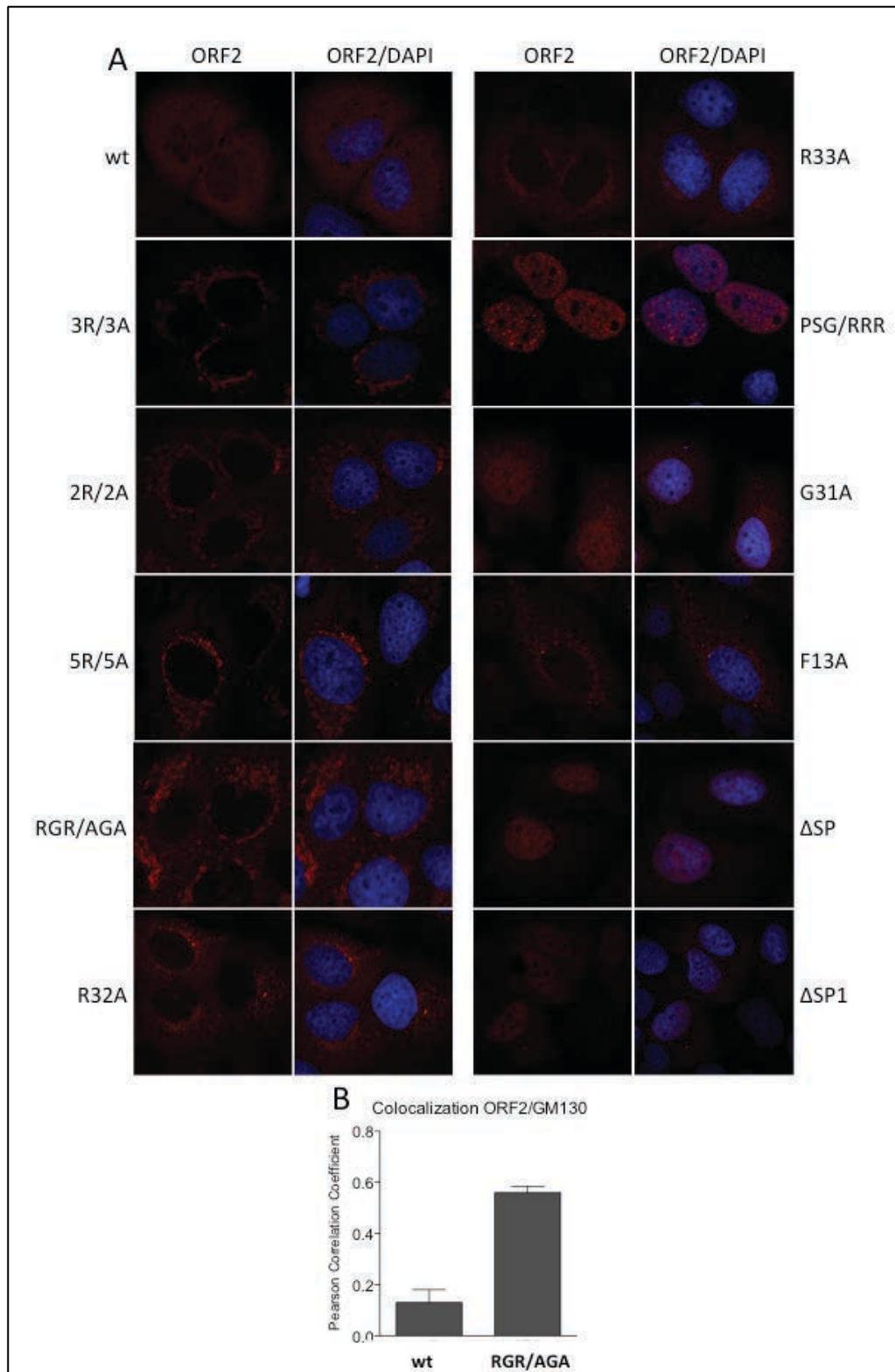


Figure 18: Distribution subcellulaire des protéines ORF2 sauvage et mutées.

(A) Les cellules PLC3 transfectées avec l'ARN de la souche HEV-p6 sauvage ou portant la mutation indiquée ont été fixées puis marquées avec un anticorps anti-ORF2 (1E6) à 3 jours post-électroporation. Les marquages ont été analysés par microscopie confocale (objectif x40). (B) Analyse de la colocalisation de l'ORF2 avec le marqueur Golgien GM130 (Logiciel CoLocalizer Pro).

Nous avons identifié deux formes de la protéine ORF2 dans le noyau : une forme à une taille apparente de 80 kDa similaire à la protéine ORF2_{intra} que nous avons appelée ORF2_{ni} (n pour nucléaire et i pour intracellulaire) et une forme plus basse d'environ 70 kDa qui est probablement un produit de clivage de la forme ORF2_{ni} que nous avons appelée ORF2_{nc} (n pour nucléaire et c pour clivée), **Figure 19C**.

La diminution de localisation nucléaire était accompagnée d'une accumulation de la protéine ORF2 dans un compartiment périnucléaire correspondant à l'appareil de Golgi (**Figure 18A**). En effet, le calcul des coefficients de corrélation de Pearson (PCC) a montré que la mutation RGR/AGA induit une colocalisation de la protéine ORF2 mutée avec le marqueur Golgien GM130 (**Figure 18B**). Les calculs de PCC ORF2/GM130 des autres mutants sont à réaliser.

D'autre part, la mutation des résidus R conduisait à l'apparition de formes de la protéine ORF2 de plus haut poids moléculaire dans les EC (**Figure 19B**) ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de la protéine ORF2 dans les SN des cellules transfectées (**Figure 19A**) qui est représentative du niveau de translocation de celle-ci dans la lumière du RE. Ces résultats indiquent que la mutation de la SeqR augmente la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2. L'analyse des titres infectieux a montré que la mutation de ces résidus R conduisait à une perte d'infectiosité de l'ensemble des mutants sauf le mutant R33A (**Figure 19D**). Ces résultats suggèrent que la translocation nucléaire de la protéine ORF2 pourrait jouer des fonctions importantes dans le cycle infectieux du HEV.

(ii) A l'inverse, l'ajout de résidus chargés (**PSG/3R, Figure 16A**) conduisait à une augmentation massive de la localisation nucléaire de la protéine ORF2 (**PSG/3R Figure 18A et Figure 19C**), en comparaison avec la protéine sauvage, indiquant que l'introduction de résidus R à l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2 augmente sa translocation nucléaire. Par contre, cet effet était accompagné d'une inhibition totale de la sécrétion de la protéine ORF2 (**PSG/3R, Figure 19A**) similaire aux mutants de délétion du PS indiquant que ces résidus chargés inhibent la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2. L'analyse des titres infectieux a montré que le mutant PSG/3R n'était plus infectieux (**Figure 19D**).

(iii) La mutation de la Glycine³¹ (G31A) conduisait à un phénotype peu marqué en WB sur la compartimentation de la protéine ORF2 (**Figure 19B et 19C**). L'analyse des titres infectieux a montré que le mutant G31A n'était plus infectieux (**Figure 19D**).

(iv) L'analyse de l'effet de la mutation de la Phénylalanine¹³ (F13) en position -1 de l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2_i montrait une distribution subcellulaire similaire à la protéine sauvage. Par contre, l'analyse des titres infectieux a montré que le mutant F13A

était moins infectieux, indiquant que ce résidu pourrait être essentiel à la maturation de la protéine ORF2 et l'assemblage des particules infectieuses (**Figure 19D**).

(v) De manière attendue, la délétion de la totalité (Δ SP) ou de la moitié (Δ SP1) du PS de la protéine ORF2 conduisait à une inhibition totale de sa sécrétion (**Figure 19A**) du fait de l'absence de translocation dans la lumière du RE.

Mais de manière intéressante, la protéine ORF2 subissait toujours une translocation nucléaire (**Figure 19C, Δ SP et Δ SP1**) indiquant que la translocation nucléaire de la protéine ORF2 est probablement indépendante de sa translocation réticulaire. L'analyse des titres infectieux a montré que les mutants de délétion du PS n'étaient plus ou peu infectieux (**Figure 19D**).

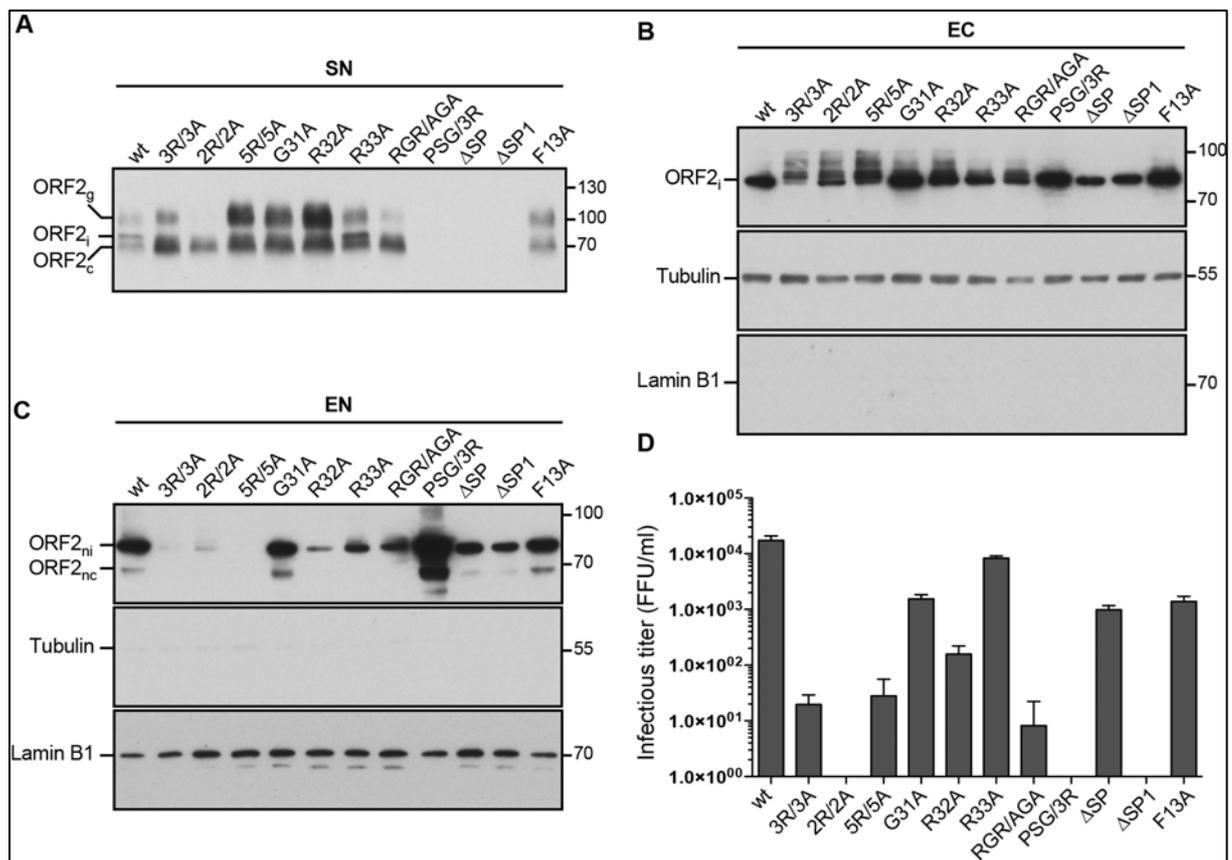


Figure 19: Caractérisation des mutants par Western Blot et titres infectieux.

Les ARN transcrits et capés *in vitro* ont été transfectés par électroporation dans les cellules PLC3. A 6 jours post-électroporation, les surnageants (SN) des cellules transfectées ont été récoltés, analysés par Western Blot (**A**) et utilisés pour définir les titres infectieux (**D**). A partir des cellules transfectées, des extraits cytoplasmiques (**EC**) et nucléaires (**EN**) ont été préparés et analysés par WB (**B et C**) avec des anticorps dirigés contre la protéine ORF2 (**1E6**) mais aussi contre le marqueur nucléaire lamin B1 et le marqueur cytoplasmique Tubulin afin de contrôler la qualité des extraits préparés.

3.1.4. La protéine ORF2 colocalise avec l'Importine $\alpha 1$

La protéine ORF2 possède donc un NLS fonctionnel constitué d'une SeqR (28-RRRGRR-33) qui régulent non seulement sa localisation nucléaire mais aussi sa translocation réticulaire. Dans les cellules eucaryotes, les protéines ayant des NLS sont reconnues spécifiquement par des importines α qui les transportent (en complexe avec l'importine $\beta 1$) du cytoplasme vers le noyau via les pores nucléaires (NPC). Il existe 6 différentes importines α présentes dans les cellules eucaryotes humaines (Sorokin et al. 2007; Ibarra & Hetzer 2015).

Afin d'identifier spécifiquement l'importine impliquée dans le transport nucléaire de la protéine ORF2, nous avons réalisé une étude comparative des séquences NLS de certaines protéines virales et des importines avec lesquelles elles interagissent. Nous avons trouvé dans la littérature que la protéine Leader du virus Epstein-Barr (Epstein-Barr nuclear antigen leader, EBNA-LP) possède un NLS riche en arginine de séquence (RRVRRR) similaire à celle de la protéine ORF2 (RRRGRR). L'interaction de cette protéine virale EBNA-LP avec l'Importine $\alpha 1$ a été confirmée par cristallographie (Nakada & Matsuura 2017).

Afin de déterminer si la protéine ORF2 colocalise aussi avec l'Importine $\alpha 1$, un co-marquage de la protéine ORF2 et de l'Importine $\alpha 1$ a été réalisé sur des cellules PLC3-HEVp6. Ensuite, le PCC a été déterminé en utilisant le logiciel CoLocalizer Pro (**Figure 20**). Ces analyses ont montré un PCC de 0,9 indiquant que la protéine ORF2 et l'Importine $\alpha 1$ colocalisent dans les cellules transfectées par le génome du HEV.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine ORF2 possède un NLS monopartite (SeqR) à son extrémité N-terminale qui régule non seulement son transport dans le noyau des cellules mais aussi sa translocation réticulaire. La protéine ORF2 colocalise avec l'Importine $\alpha 1$. Cette SeqR joue donc un rôle important dans l'équilibre fin de l'adressage de la protéine ORF2 entre les voies nucléaire, cytosolique et réticulaire, probablement essentiel au cycle infectieux du HEV. L'expression de la protéine ORF2 serait donc finement régulée au niveau post-traductionnel.

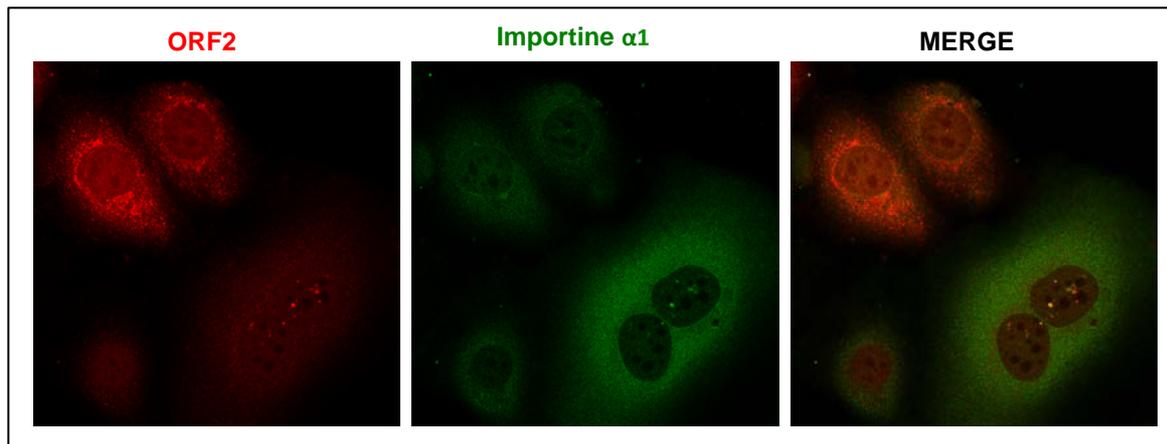


Figure 20: Colocalisation de la protéine ORF2 avec l'Importine $\alpha 1$.

Les cellules PLC3/HEVp6 ont été comarquées avec un anti-ORF2 (Rouge) et un anti-Importine $\alpha 1$ (Vert). Les cellules ont été observées en microscopie confocale, objectif 40x. Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) a été déterminé dans la zone délimitant les noyaux des cellules. $PCC > 0,9$. $n=50$.

3.1.5. Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2

Afin de mieux comprendre le dynamisme du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2, une cinétique a été réalisée. Pour cela, les cellules PLC3 ont été électroporées avec les ARN cappés de la souche HEV-p6 et fixées à 24, 48 et 72 heures post-électroporation. La protéine ORF2 a été identifiée par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-ORF2 (1E6). Les cellules ont été observées en microscopie confocale. L'intensité de fluorescence de la protéine ORF2 dans le noyau des cellules positives a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ.

Les résultats obtenus ont montré que la protéine ORF2 s'accumule précocement dans le noyau des cellules productrices du HEV, dès 24h post-électroporation. Une réduction de 70% de la localisation nucléaire de cette protéine a été observée entre 24h et 72h post-électroporation suggérant que la protéine ORF2 serait probablement importée puis exportée très rapidement du noyau vers le cytoplasme des cellules hôtes (**Figure 21A et B**).

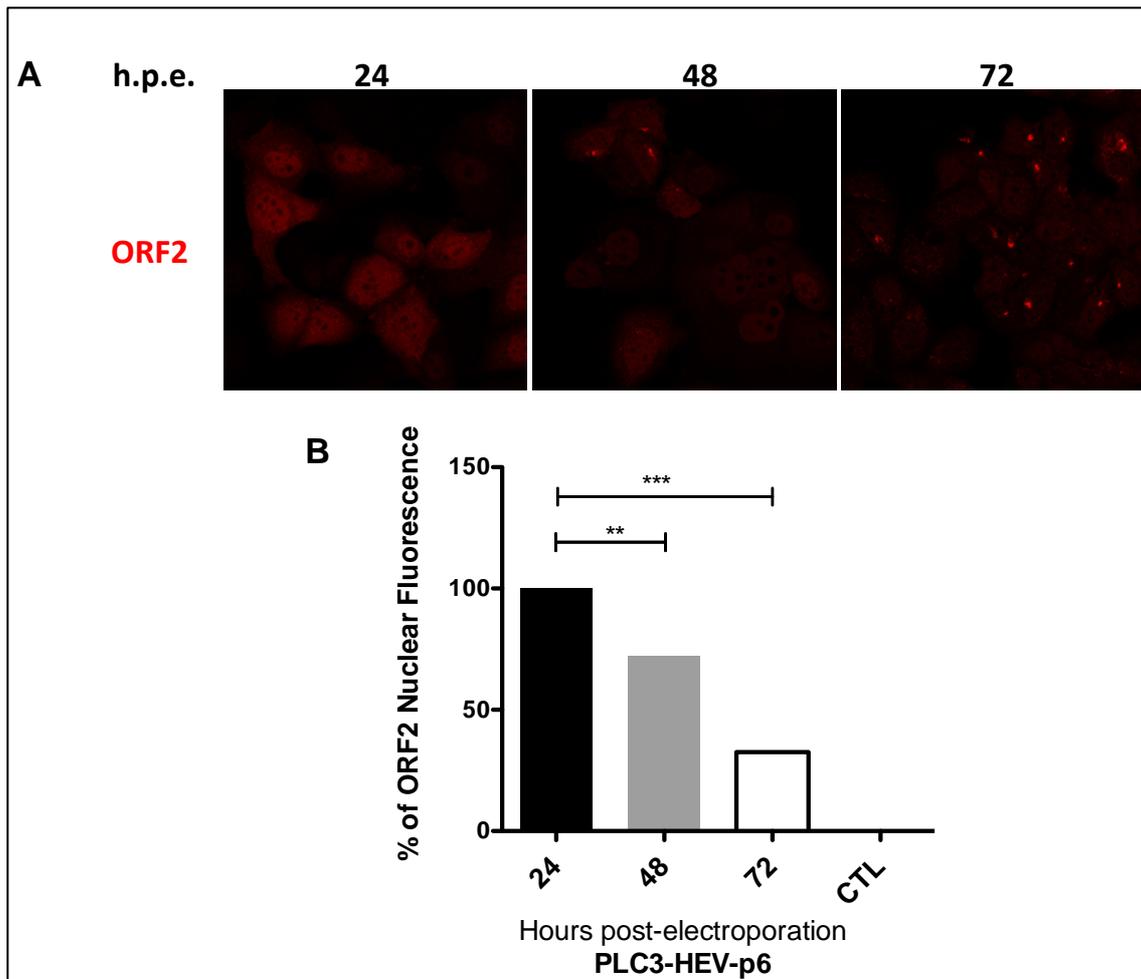


Figure 21: Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.

(A) Les cellules PLC3 ont été électroporées avec les ARN cappés de la souche HEV-p6. Les cellules ont ensuite été fixées 24, 48 et 72 heures post-électroporation (h.p.e) et la protéine ORF2 a été identifiée par immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique. Les cellules ont été observées en microscopie confocale. (B) L'intensité de fluorescence de l'ORF2 a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ (n=50). Les moyennes des intensités de fluorescence nucléaire de l'ORF2 ont été ajustées en pourcentage par rapport à 24 h p.e.

3.2. La protéine ORF2 est exportée du noyau vers le cytoplasme des cellules hôtes

3.2.1. L'export nucléaire de la protéine ORF2 est dépendante de l'Exportine1

Nous avons ensuite analysé le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2. Plusieurs protéines cellulaires et virales sont exportées du noyau vers le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ce mécanisme fait intervenir l'Exportine1 (Exp1 ou CRM1 : Chromosomal Maintenance 1) ainsi que la protéine G Ran couplée au GTP. Dans le noyau, l'Exp1 se lie au cargo (la protéine à transporter) en reconnaissant un signal d'export nucléaire (NES). Les NES sont composés majoritairement d'acides aminés hydrophobes (Leucine, Phenylalanine, Methionine, Isoleucine) ou motifs riches en leucines.

Afin d'analyser le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2, un inhibiteur spécifique de l'Exp1, la leptomycine B (LMB) a été utilisée (pour revue (Mathew &

Ghildyal 2017)). Nous avons observé par immunofluorescence, une accumulation nucléaire de la protéine ORF2 dans les cellules traitées avec la LMB comparée aux cellules non traitées (**Figure 22A, LMB(+)**). L'analyse de l'intensité de la fluorescence de la protéine ORF2 dans le noyau des cellules hôtes (n=72) a été réalisée avec le logiciel ImageJ et a montré 5 fois plus de protéine ORF2 dans le noyau des cellules traitées comparée aux cellules non traitées avec la LMB (**Figure 22B**), indiquant que la protéine ORF2 du HEV est exportée vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant de l'Expo1.

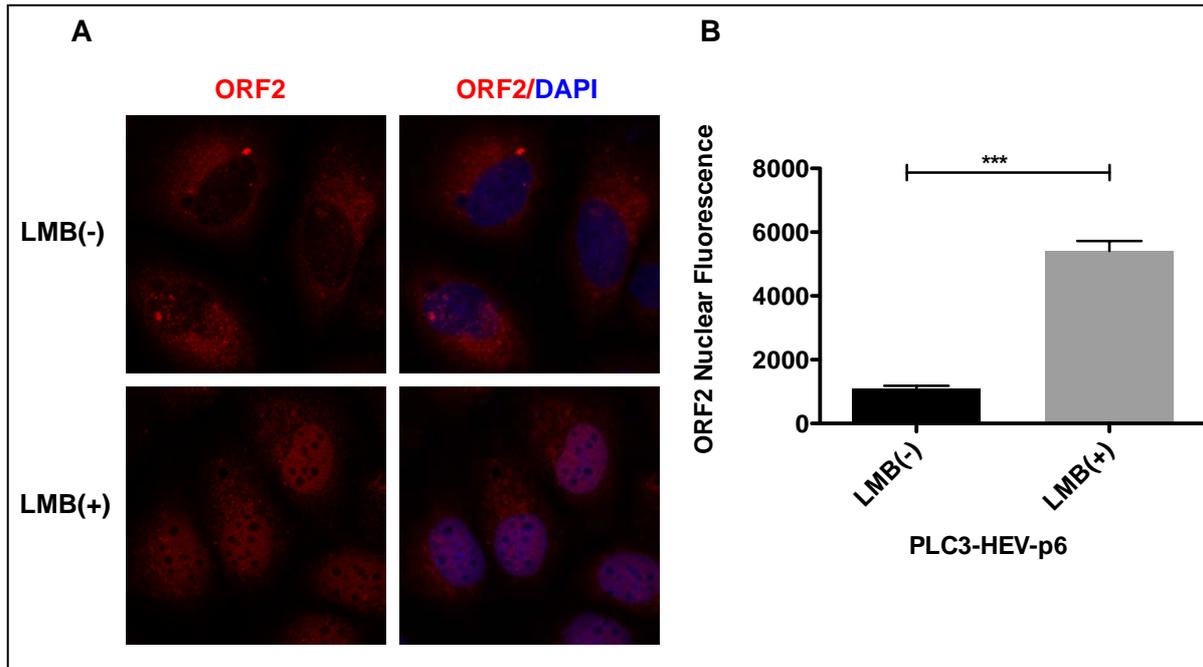


Figure 22: Inhibition de l'export nucléaire dépendant de l'Exportine1.

Les cellules PLC3-HEVp6 ont été traitées avec la Leptomycine B (LMB) à 20nM pendant 16 heures. (A) Les cellules ont été fixées et analysées en immunofluorescence puis en microscopie confocale. En rouge la protéine ORF2 et en bleu, le noyau des cellules. (B) L'intensité de fluorescence de l'ORF2 a été quantifiée avec le logiciel ImageJ, (n=72). (-) : Cellules non traitées ; (+) : Cellules traitées.

3.2.2. La protéine ORF2 colocalise partiellement ou transitoirement avec l'Exportine1

Afin de vérifier que la protéine ORF2 colocalise avec l'Expo1, une colocalisation a été réalisée en utilisant des anticorps dirigés contre ces deux protéines. De manière intéressante, les résultats ont montré un PCC égal à 0,5 (n=40), indiquant que la protéine ORF2 colocalise partiellement ou transitoirement avec l'Expo1 dans le noyau des cellules (**Figure 23**).

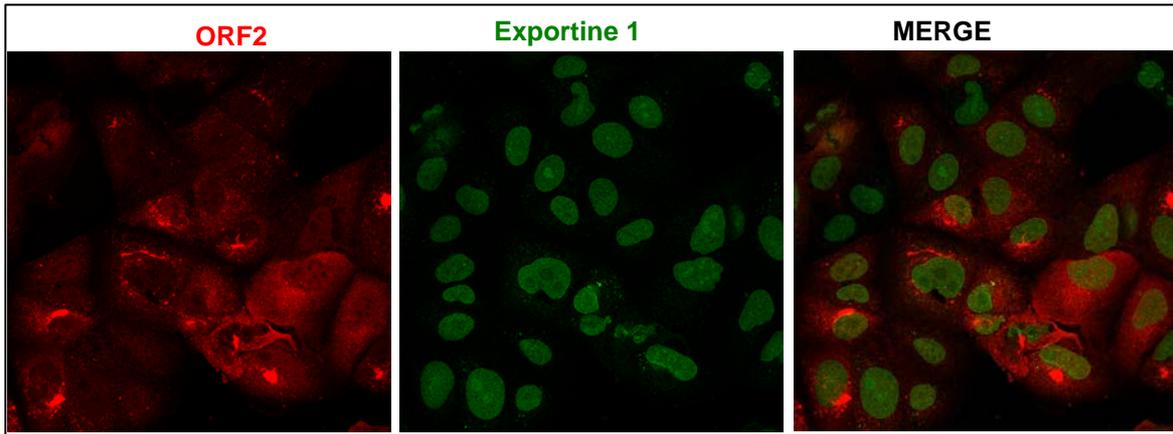


Figure 23: Colocalisation des protéines ORF2 et Exportine1.

Les cellules PLC3-HEVp6 ont été fixées puis marquées avec un anticorps anti-ORF2 (Rouge) et anti-Exportine1 (Vert). Les images ont été analysées en microscopie confocale. Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) a été déterminé (dans la zone délimitant les noyaux) avec le logiciel Colocalizer Pro, PCC= 0,5. n=40.

3.2.3. La protéine ORF2 possède 3 signaux d'export nucléaire (NES) fonctionnels

Nos résultats montrent que la protéine ORF2 est exportée du noyau des cellules produisant le HEV de manière dépendante de l'Expo1. Cela suggère qu'elle possède au moins un NES. Afin d'identifier précisément le ou les NES sur la protéine ORF2, sa séquence a été analysée manuellement en cherchant des séquences consensus de NES. Nous avons pu identifier 12 motifs putatifs NES sur la protéine ORF2 (**Figure 24, en vert**). Les séquences consensus des NES sont constituées d'acides aminés hydrophobes (Leucine, Valine, Isoleucine, Phenylalanine ou Méthionine) (Pour revue voir (Fung et al. 2015)). Les résidus hydrophobes de chaque NES potentiel ont été mutés en Alanine par mutagenèse dirigée. Les ARN cappés des différents mutants et de la souche sauvage ont été électroporés dans des cellules PLC3 et fixées 3 jours post-électroporation.

La protéine ORF2 a été ensuite détectée par immunofluorescence et les images ont été prises en microscopie confocale. Tous les mutants s'exprimaient à un niveau identique à la souche sauvage exceptés les mutants NES4, NES7 et NES11 (qui ne s'exprimaient pas). Les résultats ont montré que les mutants NES9, NES10 et NES12 présentent une accumulation nucléaire de la protéine ORF2 de manière assez similaire au phénotype observé dans les cellules PLC3-HEVp6 traitées avec la LMB (**Figure 25**).

10	20	30	40	50	60
MCPRVLLLEF	FVFLPMLPAP	PAGQPSGRRR	GRRSGGAGGG	FWGDRVDSQP	FALPYIHPTN
70	80	90	100	110	120
PFAADIVSQS	GAGTRPRQPP	RPLGSAWRDQ	SQRPSAAPRR	RSAPAGAAPL	TAVSPAPDTA
130	140	150	NES1	NES2	170
PVPDVDSRGA	ILRRQYNLST	SPLTSSVASG	TNLVLYAAPL	NPLLPDQDGT	NTHIMATEAS
190	200	210	220	230	NES3
NYAOYRVVRA	TIRYRPLVPN	AVGGYAISIS	FWPQTTTTPT	SVDMNSITST	DVRIIVQPGI
NES4	260	270	280	290	300
ASELVIPSER	LHYRNQGWRS	VETTGVAEEE	ATSGLVMLCI	HGSPVNSYTN	TPYTGALGLL
NES5	320	330	340	350	360
DFALELEFRN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	LRRGADGTAE	LTTTAATRFM	KDLHFTGTNG
NES6	NES7	390	400	410	420
VGEVGRGIAL	TLFNADTLL	GGIPTELISS	AGGQLFYSRP	VVSANGEPTV	KLYTSVENAQ
NES8	440	450	460	NES9	480
QDKGITIPHD	IDLGDSRVVI	QDYDNQHEQD	RPTPSPAPSR	PFSVLRANDV	LWLSLTAAEY
490	500	510	520	530	540
DQATYGSSTN	PMYVSDTVTF	VNVATGAQAV	ARSLDWSKVT	LDGRPLTTIQ	OYSKTFYVLP
NES10	560	570	580	590	NES11
LRGKLSFWEA	GTTRAGYPYN	YNTTASDQIL	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV
610	620	630	640	NES12	660
LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTTAEIQRL	KTEVGKTRES

Figure 24: Signaux potentiels d'export nucléaire de la protéine ORF2.

La protéine ORF2 du HEV est une protéine de 660 acides aminés. 12 sites potentiels d'export nucléaire (NES) ont été identifiés sur cette protéine. Les séquences consensus des NES sont constituées d'acides aminés hydrophobes (Leucine, Valine, Isoleucine, Phenylalanine ou Méthionine). En vert : Les différents NES et les résidus hydrophobes mutés en Alanine. Les rectangles représentent les sites potentiels de N-glycosylation. En mauve, le signal de localisation nucléaire (NLS).

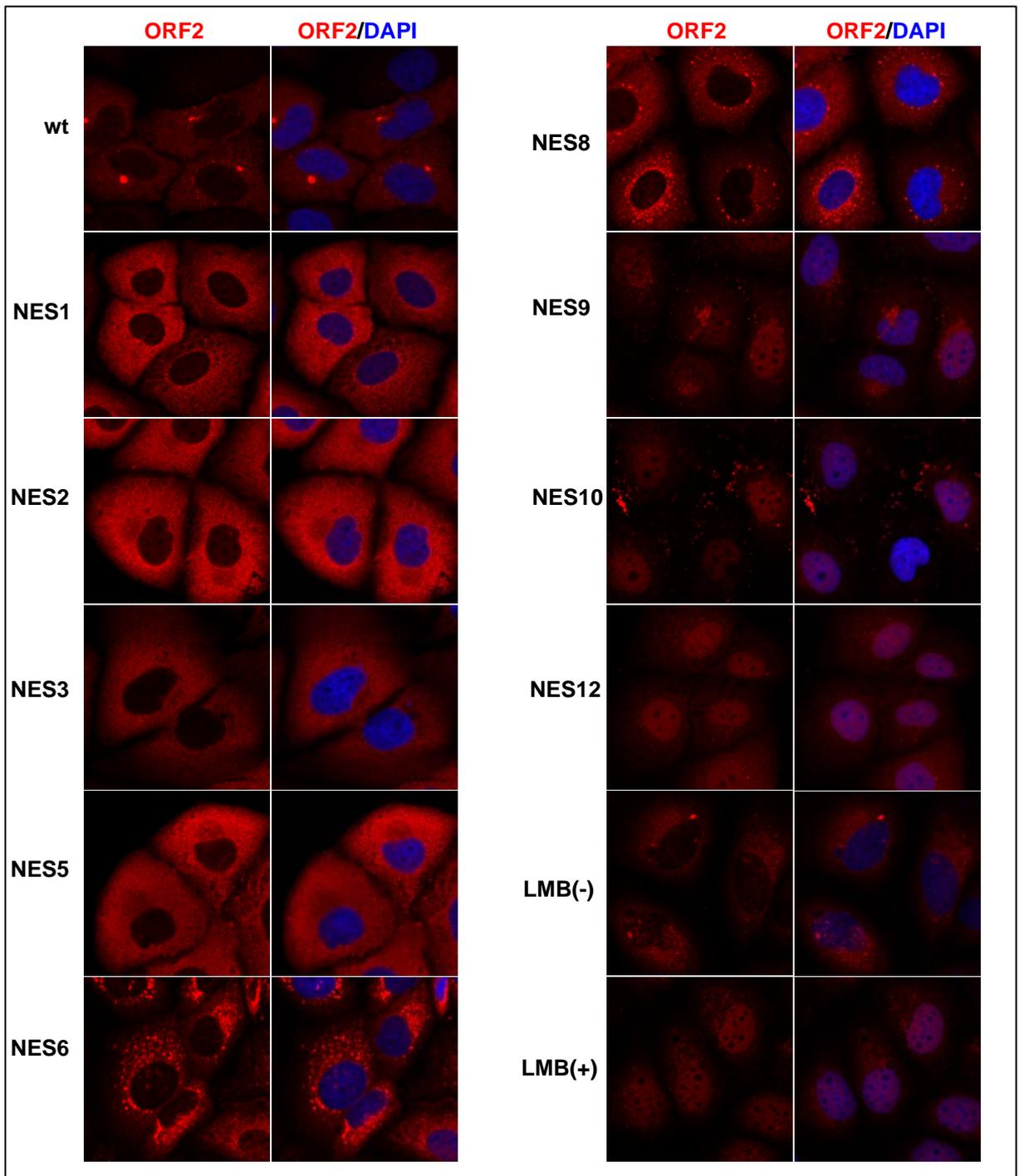


Figure 25: Identification des signaux d'export nucléaire (NES) sur la protéine ORF2.

Les cellules PLC3 ont été électroporées avec les ARN cappés de la souche sauvage HEV-p6 (wt) et des mutants NES. Les cellules ont été fixées 3 jours post-électroporation puis l'ORF2 (rouge) et le noyau des cellules (bleu) ont été marqués par immunofluorescence. Les images présentées ici sont des images de microscopie confocale, objectif 40x. Les cellules PLC3-p6 non traitées par la Leptomycine B (LMB(-)) et traitées (LMB(+)) sont aussi présentées.

Afin de confirmer l'accumulation nucléaire des mutants NES9, NES10 et NES12 comparée à la souche sauvage, les intensités de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 ont été déterminées en utilisant le logiciel ImageJ. Les quantifications ont confirmé une accumulation nucléaire significative de la protéine ORF2 dans le cas de ces mutants, en comparaison avec la souche sauvage p6 (**Figure 26**). Ces résultats suggèrent que la protéine ORF2 possède trois NES fonctionnels en position C-terminale (NES9 : résidus 465-475 ; NES10 : résidus 539-547 et NES12 : résidus 640-650).

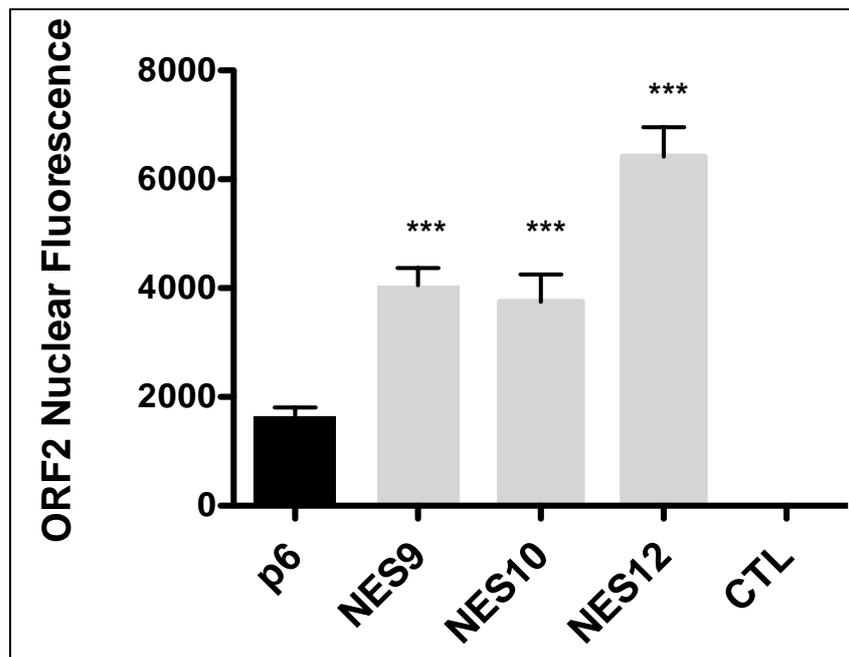


Figure 26: Intensité de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 sauvage et des mutants NES9, NES10 et NES12

Les cellules PLC3 ont été électroporées avec les ARNs cappés de la souche sauvage HEV-p6 (p6) et des mutants NES9, NES10 et NES12. Les cellules ont été fixées 3 jours post-électroporation puis marquées par immunofluorescence. Les intensités de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 ont été déterminées en utilisant le logiciel ImageJ. n=50.

En résumé, nos résultats montrent pour la première fois que la protéine ORF2 possède un NLS classique de type monopartite en position N-terminale constitué d'une SeqR (28-RRRGR-33). Ce NLS se situe en aval du PS de la protéine ORF2 et en amont du premier aa (S³⁴) de la forme ORF2g. De manière surprenante, nous avons observé que cette SeqR régule non seulement l'import nucléaire de la protéine ORF2 mais aussi sa translocation réticulaire. Nous montrons également que la protéine ORF2 colocalise avec l'Importine α 1. En utilisant la leptomyicine B, un inhibiteur de l'Exportine1, nos résultats montrent que la protéine ORF2 est exportée du noyau vers le cytoplasme des cellules hôtes de manière dépendante de l'Exportine1 à des temps précoces du cycle viral.

Nous avons pu identifier précisément les sites d'export nucléaire (NES) présents sur cette protéine. La protéine ORF2 possède 3 NES fonctionnels situés en position C-terminale (au niveau des résidus 465, 540 et 640). Enfin, nous avons montré que la protéine ORF2 colocalise avec l'Exportine1. La détermination de l'importance de ce transport nucléocytoplasmique dans le cycle infectieux du HEV est en cours de réalisation (**Données non publiées et confidentielles**).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A : Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du HEV

Nous avons montré dans nos précédents travaux que trois formes de la protéine de capsid ORF2 sont produites au cours du cycle infectieux du HEV (Montpellier et al. 2018) : (i) La forme ORF2i (i pour infectieuse) qui proviendrait de la forme intracellulaire de la protéine ORF2 que nous avons appelée ORF2intra (Ankavay et al. 2019). La forme ORF2i est une protéine d'environ 80 kDa qui est non glycosylée et est associée au génome viral. (ii) la forme ORF2g (g pour glycosylée) qui est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée. Elle serait clivée probablement par des protéases cellulaires pour donner la forme (iii) ORF2c (c pour clivée). Les formes ORF2g et ORF2c sont des protéines respectivement d'environ 90 et 75 kDa. Elles ne sont pas associées aux particules infectieuses et ne forment pas de matériel particulaire. Elles sont massivement sécrétées dans le surnageant des cellules produisant le HEV et dans le sérum des patients infectés par ce virus, elles joueraient un rôle de leurre immunologique (Montpellier et al. 2018; Yin et al. 2018). De plus, nous avons montré que les anticorps présents chez les patients infectés par le HEV reconnaissent les formes ORF2g et ORF2c et la N-glycosylation n'affecte pas la reconnaissance de ces deux protéines par différents anticorps monoclonaux et polyclonaux (Ankavay et al. 2019). La protéine ORF2 n'utilise donc pas la N-glycosylation pour masquer ses sites antigéniques comme c'est le cas pour la protéine HA du virus *Influenza* qui utilise les N-glycanes pour masquer ses sites antigéniques afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Abe et al. 2004).

Les séquences exactes des formes ORF2i et ORF2g ont été identifiées et débutent respectivement au niveau des aa L¹⁴ et S³⁴ (Montpellier et al. 2018). Tout récemment, Yin et collaborateurs ont confirmé que le HEV produit les formes ORF2i et ORF2g, mais celles-ci seraient traduites à partir de codons initiateurs différents (M¹ pour la forme ORF2g et M¹⁶ pour la forme ORF2i) (Yin et al. 2018). Cette équipe n'a pas pu identifier la forme ORF2c certainement à cause du niveau faible d'expression des protéines. Dans notre étude, nous avons identifié la séquence N-terminale de la forme ORF2c qui débute au niveau de la S¹⁰² (Ankavay et al. 2019). Cette forme est probablement le produit de clivage de la forme ORF2g car cette S¹⁰² (premier aa de la forme ORF2c) est située en aval d'un site potentiel de clivage par des proprotéines convertases (PC) de séquence consensus de clivage R-X-R/K-R (R : Arginine, K : Lysine et X tout autre aa) (**Figure 16A**).

Les PC sont des protéases dépendantes de la sérine, elles sont impliquées dans la maturation des protéines en clivant les formes inactives pour donner des protéines actives. Il existe 9 membres connus appartenant à la famille des PC : PC1/3, PC2, furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1 et PCSK9. Les 7 premiers ont un site consensus de clivage de type (R-X-R/K-R) (pour revue voir (Seidah 2011)). Il serait donc intéressant d'identifier spécifiquement la ou les PC impliquée(s) dans la maturation des protéines ORF2g/c en utilisant les cellules LoVo dépourvues d'activité PC (S. Takahashi et al. 1993), et en réalisant des expériences de complémentation avec différents plasmides exprimant chaque PC. Nous disposons au laboratoire des plasmides d'expression de la furine, PC5/6, PACE4 et PC7, qui sont les PC majeures de la voie constitutive de sécrétion, la voie empruntée par les protéines ORF2g/c. Des inhibiteurs de PC sont commercialisés et pourraient être utilisés pour identifier spécifiquement celle (s) impliquée (s) dans la maturation des protéines ORF2g/c. L'identification de la PC impliquée dans la maturation des formes ORF2g/c permettrait d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques contre le HEV.

Le premier aa de la forme ORF2i est la Leu¹⁴ en aval de la Phe¹³ (**Figure 16A**) suggérant que cette protéine est générée suite à un clivage au cœur du peptide signal (23 premiers aa), probablement par une protéase intra-membranaire de type SPP (Signal Peptide Peptidase). En effet, les SPP et leurs homologues SPP-like (SPPL) sont des protéases intra-membranaires proches des presénilines (qui forment l'unité active du complexe γ -sécrétase). Elles font partie de la famille des protéases GxGD (GxGD étant leur domaine actif). Il en existe 5 membres chez les cellules eucaryotes (SPP, SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c et SPPL3). Leur site de clivage se situe au niveau des régions hydrophobes (telles que les PS des protéines). Elles jouent diverses fonctions notamment dans le clivage et la dégradation des PS présents dans la membrane du RE (pour revue voir (Voss et al. 2013)). Nous pouvons citer la protéine core du HCV comme exemple de clivage par les SPP. La protéine core du HCV est libérée de la polyprotéine par clivage au niveau de la région hydrophobe de sa partie C-terminale par une SPP (McLauchlan et al. 2002). Ce clivage est important pour la propagation des particules virales suggérant que des inhibiteurs de SPP pourraient être utilisés comme antiviraux contre le HCV (Moriishi 2017). En plus, il a été décrit que les SPP sont impliquées dans la dissociation des protéines de la membrane du RE. C'est le cas de la protéine US2 du HCMV (human cytomegalovirus) qui est dissociée de la membrane du RE par une SPP (Loureiro et al. 2006). Il serait donc important de déterminer le rôle des protéases intra-membranaires dans la maturation de la protéine ORF2i du HEV en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces protéases et des ARN interférents. Cela permettra d'identifier des cibles thérapeutiques

potentielles. Cette partie sur l'étude de la maturation des formes ORF2g/c et ORF2i constitue un projet en cours de développement dans le laboratoire.

La protéine ORF2 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation très conservés parmi les différents génotypes du HEV (Zafrullah et al. 1999). Une étude de 293 séquences de différents génotypes du HEV appartenant à l'espèce *Orthohepevirus A* a montré que ces trois sites de N-glycosylation sont très bien conservés suggérant leur importance dans le cycle infectieux du HEV (S. Zhang et al. 2018). Les premières données sur la protéine ORF2 et la N-glycosylation ont été obtenues à partir d'études en système hétérologue en utilisant des vecteurs d'expression SV40 et des cellules de rein de singe (COS-1). Jameel et collègues en 1996 ont caractérisé la protéine ORF2 (souche Hyderabad) comme étant une protéine d'environ 88 kDa, avec une localisation subcellulaire cytoplasmique et à la membrane plasmique. Ils ont montré que la protéine ORF2 a la capacité d'être transloquée dans la lumière du RE par clivage de son PS pour être N-glycosylée. Cette équipe n'a pas identifié les sites de N-glycosylation occupés par des N-glycanes (Jameel et al. 1996). Ensuite en 1999, en utilisant le même système d'étude, Zafrullah et collègues ont montré que les trois sites de la protéine ORF2 étaient N-glycosylés, le site 2 étant le site majeur de N-glycosylation (Zafrullah et al. 1999). En 2007, Surjit et collaborateurs ont montré que la protéine ORF2 se localise au niveau de la membrane plasmique et du RE. En plus, ils ont démontré que la localisation cytoplasmique de l'ORF2 dépend de sa capacité à être rétro-transloquée du RE vers le cytoplasme de manière dépendante de la N-glycosylation (Surjit et al. 2007). En 2008, Graff et collaborateurs ont étudié l'impact de la N-glycosylation de la protéine ORF2 en système infectieux en utilisant la souche Sar-55 (HEV-1) et les cellules S10-3 sous clone de la lignée d'hépatome humain Huh-7. Leurs résultats ont montré que les mutations au niveau des deux premiers sites de N-glycosylation de la protéine ORF2 affectent significativement l'assemblage des particules virales et la mutation du troisième site inhibe l'infectiosité des particules virales indépendamment de la N-glycosylation (Graff et al. 2008). Les résultats sur le statut de la N-glycosylation de la protéine ORF2 obtenus dans ces études restent énigmatiques puisqu'ils ont utilisé des extraits cytoplasmiques pour caractériser le profil de la protéine ORF2. Or, notre équipe a démontré que la protéine ORF2 intracellulaire (ORF2_{intra}) n'est pas N-glycosylée, seules les formes sécrétées le sont (Montpellier et al. 2018). Ces mêmes observations ont été faites par Yin et collaborateurs en 2018 (Yin et al. 2018). Le rôle précis de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV restait donc à définir.

Afin de mieux comprendre le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV, nous avons généré des mutants des différents sites de N-glycosylation dans le contexte de la souche infectieuse HEV-p6 (HEV-3) (Montpellier et al. 2018). Nous avons montré que seuls les sites N1 et N3 de la protéine ORF2g et ORF2c sont N-glycosylés. Contrairement aux résultats publiés en systèmes hétérologues (Zafrullah et al. 1999), nous avons montré en combinant plusieurs approches expérimentales telles que les traitements avec PNGase F (glycosydase qui clive les N-glycanes présents sur les protéines) et la spectrométrie de masse, que le site N2 n'est pas N-glycosylé (Ankavay et al. 2019). En analysant la séquence de la souche Hyderabad (U22532) utilisée dans l'étude de Zafrullah et al. dans NetNGlyc (le site de référence de prédiction des séquons de N-glycosylation), nous avons trouvé une absence de N-glycosylation du site 2. De plus, un quatrième site potentiel de N-glycosylation a été identifié sur cette séquence en position N65 de la protéine ORF2 (séqun NVTa) qui n'avait pas été identifié en 1999 par les auteurs de ce travail. Ce site est unique à la souche Hyderabad car il n'apparaît pas dans l'analyse de 293 séquences du HEV sur la protéine ORF2 réalisée par Zhang et collaborateurs en 2018 (S. Zhang et al. 2018). L'absence de N-glycosylation sur le site N2 est probablement due à la présence d'une Proline en aval du séqun de N-glycosylation (³¹⁰NLTP). En effet, il a été démontré qu'une Proline à cette position est défavorable à la N-glycosylation (Bause 1983). De manière intéressante, cette proline est très conservée parmi les génotypes humains du HEV indiquant que l'absence de glycosylation du site N2 est probablement une caractéristique commune aux différents génotypes du HEV (S. Zhang et al. 2018).

De manière intéressante, nous avons montré que les formes ORF2g et ORF2c sont des protéines très stables lorsqu'elles sont conservées à 37°C indépendamment de la N-glycosylation. Ces résultats sont conformes aux données publiées *in vivo* montrant que les formes ORF2g/c sont très stables et circulent longtemps dans le sérum des patients infectés même après clairance du génome viral (Montpellier et al. 2018; Behrendt et al. 2016). Une étude récente sur la cinétique de détection des protéines ORF2g/c dans le plasma et les selles de souris au foie humanisé a montré que ces formes s'accumulaient dans le plasma des souris au cours du temps, et étaient moins excrétées dans les selles comparé à l'ARN viral (Sayed et al. 2019).

L'impact de la N-glycosylation de la protéine ORF2 sur l'assemblage et l'infectiosité des particules virales du HEV a également été étudié. Nos résultats ont montré que la N-glycosylation ne modifie pas l'assemblage des particules virales et leur infectiosité. Cependant, de manière indépendante de cette modification post-traductionnelle, nous avons

montré que les mutants du site N1 inhibaient l'infectiosité des particules virales, les mutants du site N2 affectaient drastiquement l'assemblage des particules virales et les mutants du site N3 avaient un effet moindre ou aucun effet sur l'assemblage et l'infectiosité des particules virales. Comme suggéré par Graff et collaborateurs (Graff et al. 2008), ces résultats indiquent que les phénotypes observés sont probablement dus à la modification de la séquence codante de la protéine ORF2 et plus particulièrement de la forme infectieuse ORF2i associée aux particules virales.

Il est important de noter que les résultats obtenus durant mon travail de thèse sur la N-glycosylation ainsi que d'autres résultats du laboratoire, nous ont permis d'établir un modèle de voies de production de la protéine ORF2. En effet, lors du cycle infectieux du HEV, la protéine ORF2 peut probablement suivre deux voies de production (**Figure 27**) (i) **une voie non-productive d'assemblage** pour laquelle la protéine ORF2 possédant un PS fonctionnel est transloquée dans le RE. Au cours de son passage dans les compartiments de la voie de sécrétion, elle est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée pour donner la forme ORF2g. La forme ORF2g est clivée pour donner la forme ORF2c. Les protéines ORF2g et ORF2c sont massivement sécrétées dans le milieu extracellulaire. (ii) **une voie productive d'assemblage** dans laquelle la protéine ORF2 reste du côté cytosolique des membranes. Cette forme intracellulaire de la protéine ORF2 rejoint le site d'assemblage viral pour encapsider le génome du HEV. La forme de la protéine ORF2 associée au génome viral est appelée ORF2i (i pour infectieuse). Cette forme ORF2i n'est pas N-glycosylée. Ce modèle permet d'expliquer pourquoi la N-glycosylation de la protéine ORF2g/c ne joue pas de rôle majeur dans l'assemblage et l'infectiosité des particules virales du HEV.

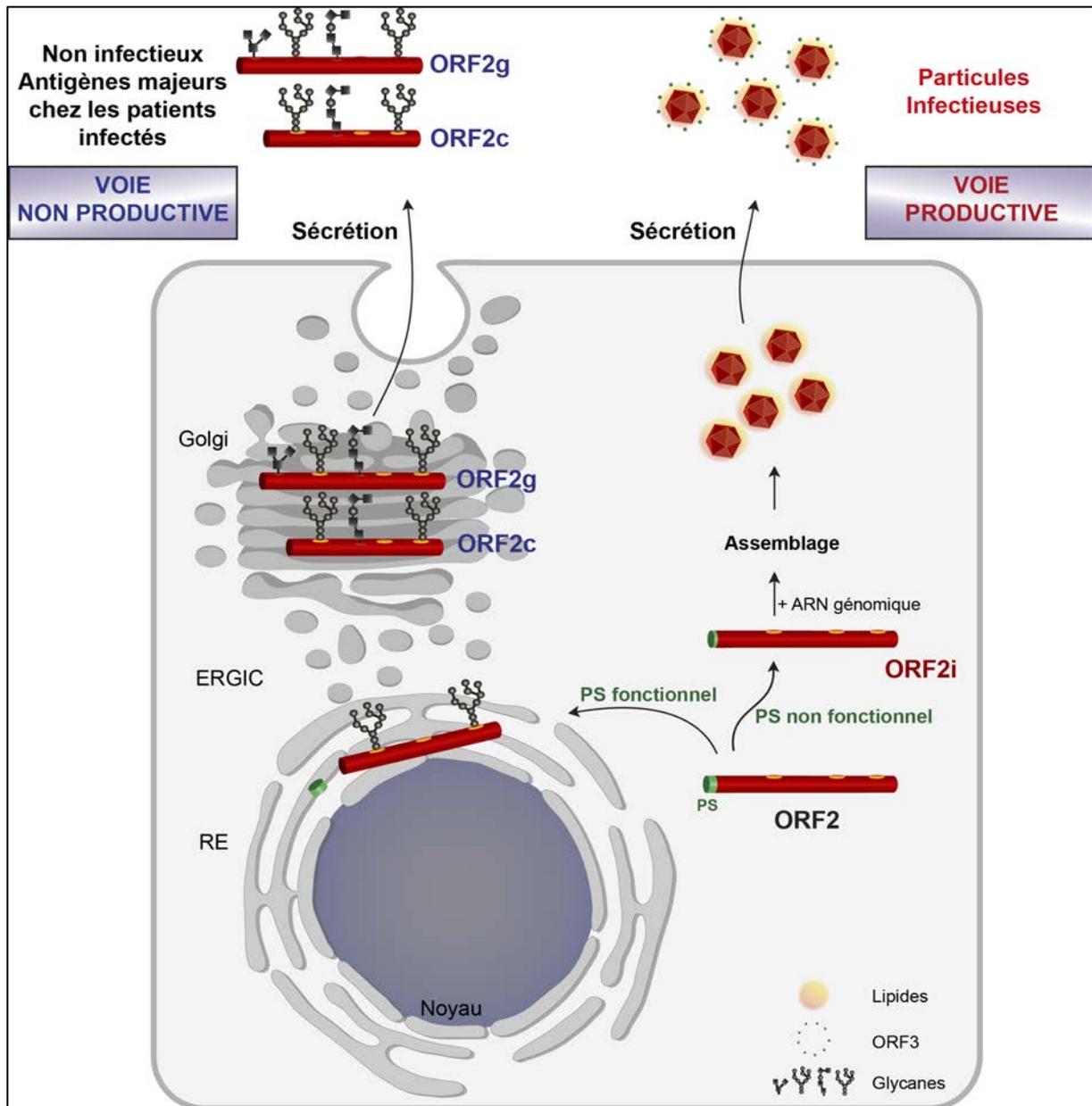


Figure 27: Différentes voies de production de la protéine ORF2.

La protéine ORF2 est produite selon deux voies : (i) la voie non productive dans laquelle la protéine ORF2 possède un peptide signal (PS) fonctionnel. Elle est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où elle est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée pour donner la forme ORF2g. La protéine ORF2g serait clivée par des protéases pour donner la forme ORF2c. Les protéines ORF2g et ORF2c sont ensuite sécrétées dans le milieu extracellulaire. (ii) La voie productive dans laquelle le peptide signal de la protéine ORF2 ne serait pas fonctionnel. La protéine ORF2i reste du côté cytosolique et encapside le génome viral pour former des virions qui sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. La forme ORF2i n'est pas glycosylée (Ankavay et al. 2018). ORF2g : ORF2 glycosylée ; ORF2c : ORF2 clivée ; ORF2i : ORF2 infectieuse/intracellulaire ; ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment.

Nous avons montré dans nos précédents travaux que les formes ORF2g et ORF2c ne forment pas de matériel particulaire (Montpellier et al. 2018). La raison pour laquelle les formes ORF2g et ORF2c ne sont pas impliquées dans la formation du matériel particulaire n'est pas connue. Cependant, Zhang et collaborateurs ont montré que le site 1 de N-glycosylation de la protéine ORF2 se situe au niveau de l'interface de la zone d'assemblage en capsid virale des VLP (Viral like particles) du HEV (Zhang, S. et al. 2018). La présence d'un N-glycane au niveau du site 1 et au niveau du site 3 abolirait probablement l'assemblage de ces formes ORF2g/c en particules virales (S. Zhang et al. 2018).

Surjit et collaborateurs ont publié en 2007 que la localisation cytoplasmique de la protéine ORF2_{intra} dépendait de sa capacité à être rétrotransloquée du RE vers le cytoplasme de manière dépendante de la N-glycosylation (Surjit et al. 2007). Cependant, nos résultats ont montré que la localisation cytoplasmique de la protéine ORF2 n'est pas dépendante de la N-glycosylation. En effet, le mutant non N-glycosylé Gly(-), généré au cours de ma thèse, conservait une localisation cytoplasmique comparable à la souche sauvage (Ankavay et al. 2019).

En conclusion, nous avons étudié pour la première fois le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le contexte de la souche infectieuse du HEV-3 qui est le génotype majoritaire dans les pays industrialisés. Nous avons montré que la N-glycosylation n'affecte pas l'oligomérisation, la stabilité, la sécrétion et la reconnaissance par des anticorps de la protéine ORF2 ainsi que l'assemblage et l'infectiosité des particules virales du HEV. Cependant, l'importance des protéines ORF2g et ORF2c N-glycosylées devrait être étudiée *in vivo* afin de tirer une conclusion définitive sur leur rôle au cours du cycle infectieux du HEV. De plus, la protéine ORF2 a été décrite comme étant O-glycosylée (Montpellier et al. 2018; Yin et al. 2018), il serait donc important d'étudier le rôle de cette O-glycosylation dans le cycle infectieux du HEV.

Mes résultats ont également révélé que la protéine ORF2_{intra} n'est pas N-glycosylée, comme décrit précédemment (Montpellier et al. 2018; Yin et al. 2018). Cependant, nous avons démontré que cette forme ORF2_{intra} est transloquée dans le noyau des cellules produisant le HEV. Le virus a probablement mis en place ce processus afin de modifier des voies de signalisation cellulaire nécessaires à son cycle répliatif ou lui permettant d'échapper aux défenses immunitaires. La localisation nucléaire de la protéine ORF2 avait été observée précédemment dans des biopsies de foie de patients infectés par le HEV (Lenggenhager et al. 2017).

Nous avons appelé cette forme nucléaire de la protéine ORF2intra, ORF2ni (n pour nucléaire et i pour intracellulaire). Nous également détecté une forme plus basse de la protéine ORF2ni dans les noyaux des cellules infectées par le HEV. Nous avons appelé cette forme ORF2nc (n pour nucléaire et c pour clivée) qui pourrait probablement être un produit de clivage de la forme ORF2ni. Ainsi, en plus des voies cytosolique et réticulaire, la protéine ORF2 emprunte également une voie nucléaire (**Figure 28**).

Il était donc important d'étudier les mécanismes impliqués dans le transport nucléocytoplasmique de la protéine ORF2 et de manière plus globale dans l'adressage des différentes formes ORF2g, ORF2c, ORF2intra, ORF2ni et ORF2nc ainsi que leur importance dans le cycle infectieux du HEV.

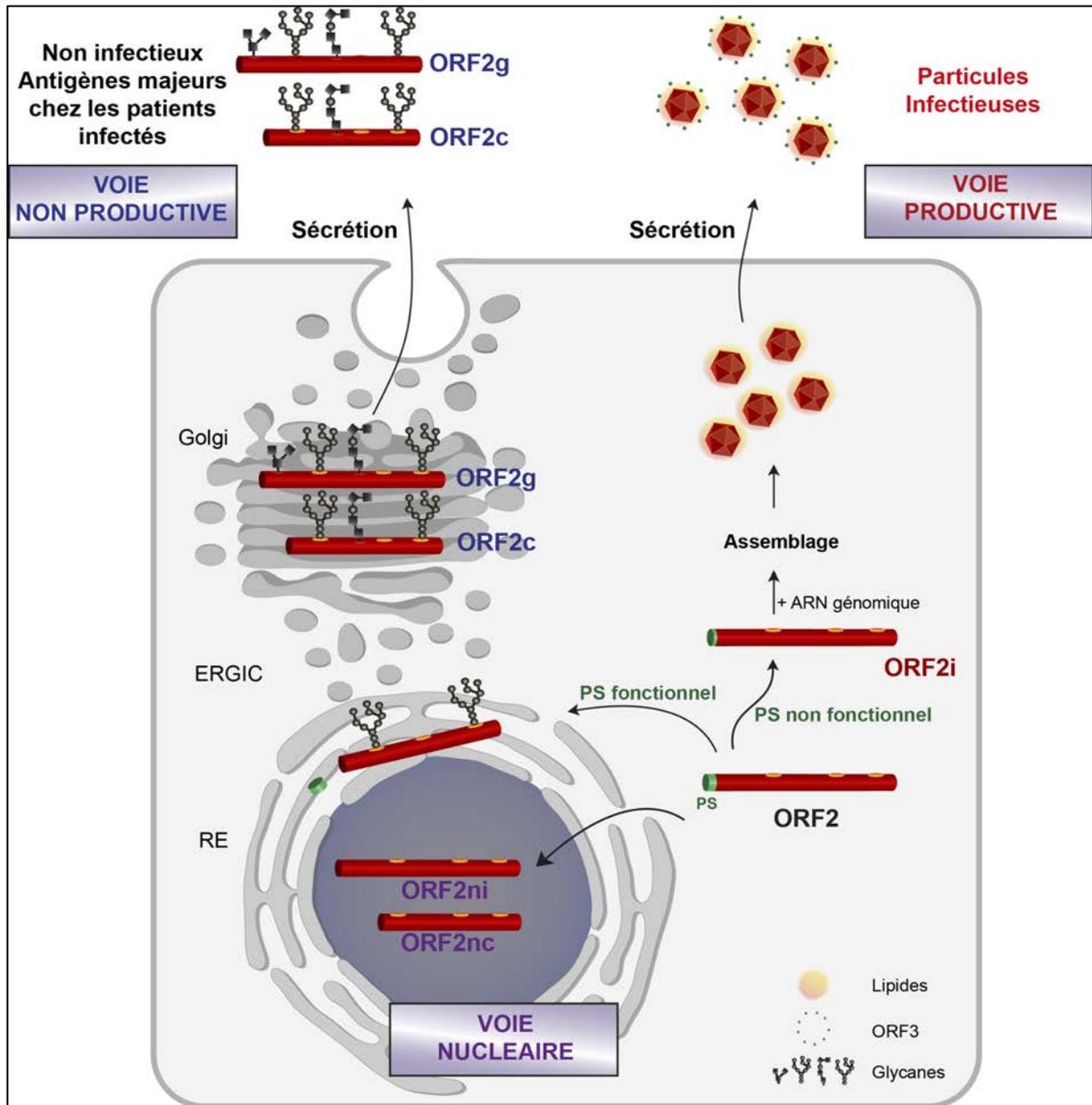


Figure 28: Voies non productive et productive de la protéine ORF2 et la voie nucléaire

La protéine ORF2 est produite selon deux voies : une voie non productive donnant les formes ORF2g et ORF2c qui sont glycosylées et sécrétées. Elles sont non associées au génome viral. Une voie productive qui fait intervenir la forme ORF2i associée aux particules virales (Ankavay et al. 2018). Une troisième voie de la protéine ORF2 a été identifiée : il s'agit de la voie nucléaire dans laquelle la forme ORF2intra est transloquée dans le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV par un mécanisme inconnu à ce stade. ORF2g : ORF2 glycosylée ; ORF2c : ORF2 clivée ; ORF2i : ORF2 infectieuse/intracellulaire ; ORF2ni : ORF2 nucléaire ; ORF2nc : ORF2 nucléaire clivée ; ERGIC : ER-Golgi Intermediate Compartment (Ankavay et al. 2019).

B : Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV

Nos résultats précédents ont révélé que l'adressage de la protéine de capsid ORF2 est probablement finement régulé au cours du cycle infectieux du HEV. En effet, au cours de son cycle infectieux, le HEV produit au moins 5 formes de sa protéine ORF2: (i) la forme ORF2i qui est associée aux particules virales, (ii) la forme ORF2intra retrouvée en intracellulaire, (iii) la forme ORF2g et (iv) la forme ORF2c, respectivement glycosylées et clivées, massivement sécrétées dans les surnageants des cellules productrices et dans le sérum des patients infectés par le HEV. Ces deux formes ORF2g et ORF2c ne forment pas de matériel particulaire et enfin (v) la forme ORF2ni qui est la forme transloquée dans le noyau des cellules hôtes (Montpellier et al. 2018; Ankavay et al. 2019). Nous avons également identifié une forme de poids moléculaire plus bas que la forme ORF2ni dans les noyaux des cellules infectées par le HEV. Cette forme serait probablement un produit de clivage de la forme ORF2ni que nous avons appelée ORF2nc (n pour nucléaire et c pour clivée). Le cycle infectieux du HEV fait probablement intervenir une stoechiométrie fine entre les différentes formes de la protéine ORF2.

Afin de comprendre les mécanismes d'adressage de la protéine ORF2, nous avons implémenté des approches de bio-informatique, de mutagenèse dirigée, d'immunofluorescence, de microscopie confocale, de fractionnement subcellulaire, et de biochimie. Nos résultats ont montré pour la première fois que la protéine ORF2 possède un NLS classique de type monopartite constitué d'une séquence riche en arginines (SeqR: ²⁸RRRGRR³³) en position N-terminale (**Données non publiées et confidentielles**). Cette SeqR se situe en aval du PS de la protéine ORF2 (**Figure 16A**). La mutation de ces 5 arginines en alanines induit une inhibition significative de la translocation nucléaire de la protéine ORF2. A l'inverse, l'ajout de 3 résidus arginines entre le PS et la SeqR conduit à une accumulation importante de la protéine ORF2 dans le noyau et à l'inhibition drastique de sa sécrétion dans le surnageant des cellules produisant le HEV, cette inhibition de la sécrétion de la protéine ORF2 est assez similaire à celle observée lorsque son PS est délété entièrement ou partiellement. Il est important de préciser que le niveau de sécrétion de la protéine ORF2 dans le surnageant reflète son degré de translocation réticulaire. Ces résultats montrent que la SeqR présente à l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2 contient un NLS fonctionnel qui régule sa translocation nucléaire.

De manière importante, il apparaît que cette SeqR (²⁸RRRGRR³³) régule également l'efficacité de la translocation réticulaire de la protéine ORF2, indiquant qu'elle régule probablement la fonctionnalité de son PS.

Afin de confirmer ces résultats obtenus et d'analyser plus finement les mécanismes moléculaires d'adressage de la protéine ORF2 vers les voies cytosolique, nucléaire et réticulaire, des protéines chimériques entre la protéine ORF2 et une protéine rapportrice ont été générées dans le cadre du projet de thèse de Kévin Hervouet. Ces chimères permettent de déterminer l'effet de la SeqR sur la fonctionnalité d'une protéine autre que ORF2 mais également d'étudier la fonctionnalité du PS de l'ORF2 dans le contexte d'une autre protéine. La glycoprotéine CD4 a été choisie comme protéine rapportrice car l'ensemble des outils dirigés contre cette protéine sont disponibles au laboratoire. La protéine CD4 possède un PS fort permettant d'envoyer la totalité des protéines CD4 dans la voie de sécrétion. Une forme tronquée de CD4 (CD4₁₋₃₇₁), qui correspond à l'ectodomaine de CD4 secrété dans le SN de cellules transfectées et caractérisée en immunofluorescence par un marquage réticulaire, a été utilisée.

Les résultats préliminaires de Kévin Hervouet montrent que la SeqR (²⁸RRRGRR³³) en position N-terminale de la protéine ORF2 est capable d'entraîner une translocation de l'ectodomaine de la protéine CD4 dans le noyau des cellules hôtes, confirmant que cette SeqR est un NLS fonctionnel. De manière surprenante, les résultats de Kévin montrent également que la SeqR de la protéine ORF2 inhibe la translocation réticulaire de la protéine CD4, indiquant que cette SeqR est également délétère pour la fonctionnalité du PS de la protéine CD4. Pris ensemble, ces résultats révèlent que la SeqR en aval du PS de la protéine ORF2 est une séquence capable de réguler la fonctionnalité de peptides signaux.

La régulation de la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2 serait donc finement régulée par cette SeqR. Le rôle de ces résidus R dans la régulation de la fonctionnalité du PS nous a amenés à émettre une hypothèse de double topologie de la protéine ORF2 (**Figure 29**). Après traduction de la protéine ORF2, une fraction de cette protéine aurait un PS signal fonctionnel. Elle serait transloquée et libérée dans la lumière du RE après clivage par la Signal Peptidase cellulaire. Néanmoins, cette translocation réticulaire serait régulée par la SeqR (²⁸RRRGRR³³) (**Figure 29**). Ainsi, une autre fraction de la protéine ORF2 serait orientée du côté cytosolique, ancrée à la membrane du RE. La protéine serait ensuite probablement clivée par des protéases de type Présénilines ou SPP pour donner la protéine ORF2i (**Figure 29**).

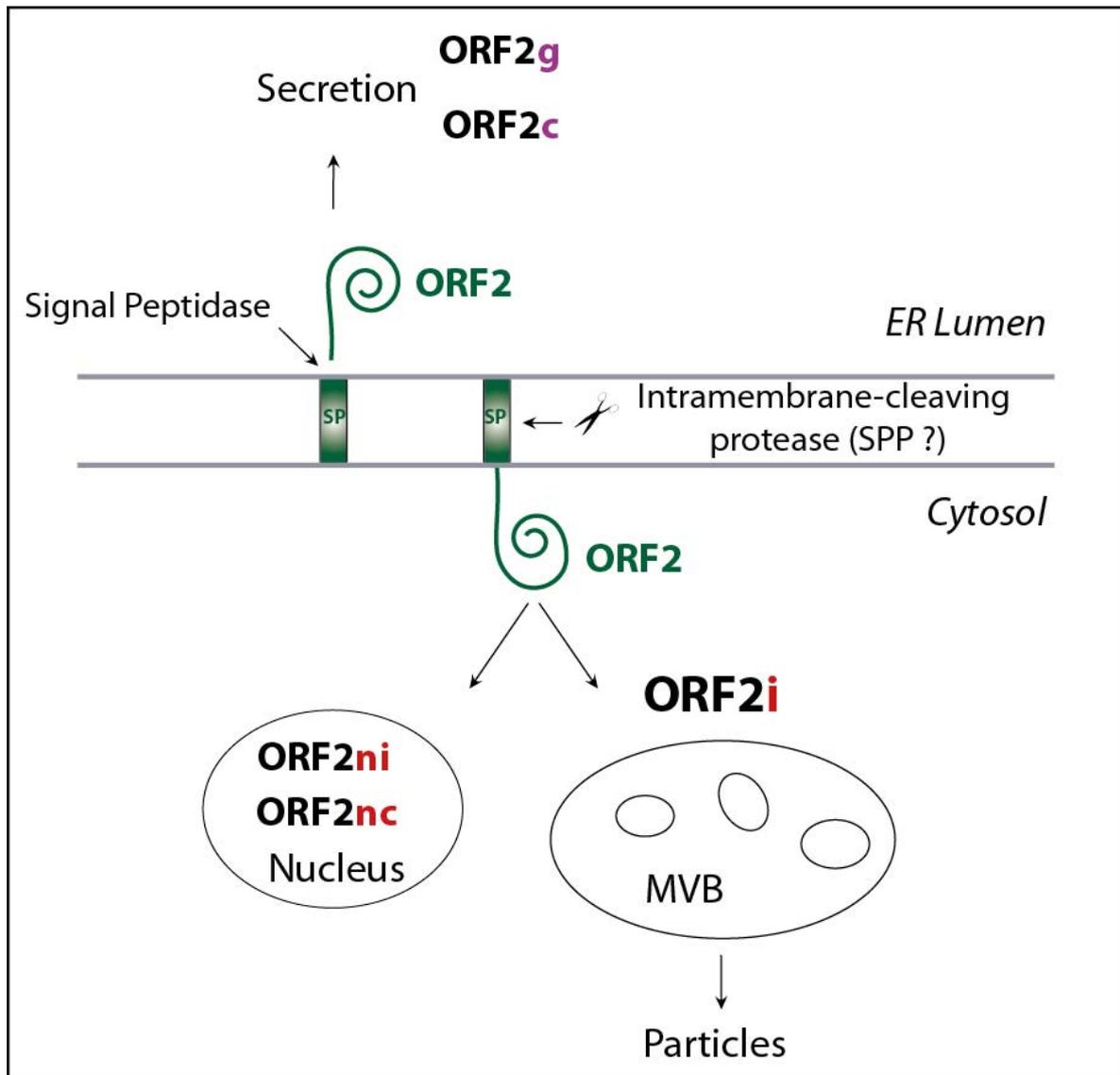


Figure 29: Double topologie de la protéine ORF2.

(1) Une fraction de la protéine ORF2 serait orientée dans le translocon puis clivée par des protéases de type signal peptidase afin d'être transloquée dans la lumière du RE et donner les formes ORF2g et ORF2c qui sont sécrétées massivement. (2) Une autre fraction de la protéine ORF2 serait orientée du côté cytosolique ancrée à la membrane du RE où elle serait probablement clivée par des protéases de type Présénilines ou Signal Peptide Peptidase (SPP) afin de générer les formes ORF2i (associées aux particules virales) qui sont sécrétées via les MVB (Multi Vesicular Bodies), (3) Les formes nucléaires ORF2ni (nucléaire) et ORF2nc (ORF2 nucléaire clivée).

Higy et collaborateurs ont montré que la fonctionnalité du PS des protéines était régulée par la charge des résidus situés en aval de celui-ci (Higy et al. 2004). Les résidus arginines (²⁸RRRGRR³³) chargés positivement ralentiraient la translocation réticulaire de la protéine ORF2 en s'opposant aux résidus hydrophobes de son PS.

Nos résultats révèlent la capacité unique du HEV à exploiter différents mécanismes d'adressage cellulaire de sa protéine de capsid pour lui permette d'être envoyée à la fois dans les voies réticulaire, cytosolique et nucléaire, tout cela grâce à la présence d'une courte séquence riche en arginines située en aval du PS. Il s'agit donc d'un cas extrême de

condensation d'information génétique permettant à ce virus d'explorer de façon élargie son environnement cellulaire.

Plusieurs protéines virales ont acquis des NLS au cours de l'évolution de leur interaction avec les cellules eucaryotes afin d'exploiter le transport nucléo-cytoplasmique cellulaire (Yarbrough et al. 2013). C'est le cas de la protéine Epstein-Barr nuclear antigen leader (EBNA-LP) du EBV qui possède un NLS riche en arginine (RRVRRR) (Nakada & Matsuura 2017) de séquence similaire à celle de la protéine ORF2 (RRRGRR). Cette protéine virale EBNA-LP interagit avec l'Importine $\alpha 1$ afin d'être transloquée dans le noyau des cellules (Nakada & Matsuura 2017). Nous avons montré que la protéine ORF2 colocalise avec l'Importine $\alpha 1$, indiquant que la protéine ORF2 exploite probablement des mécanismes de localisation nucléaire similaires à ceux de EBNA-LP. L'interaction de l'ORF2 avec l'Importine $\alpha 1$ reste néanmoins à confirmer avec d'autres approches plus robustes telle que la co-immunoprécipitation.

Il n'est pas nouveau que les protéines de capsid de virus à ARN simple brin de polarité positive en plus de leur rôle dans l'assemblage des particules virales exploitent le transport nucléo-cytoplasmique. Suzuki et collaborateurs en 2005 ont révélé que la protéine de capsid core du HCV a trois NLS fonctionnels qui lui permettent d'être transloquée dans le noyau des cellules hôtes en interagissant avec l'Importine α (Suzuki et al. 2005). Poenisch et collaborateurs ont montré que la translocation nucléaire de cette protéine core permettait de réguler la production des particules virales du HCV (Poenisch et al. 2015). De plus, Cerutti et collaborateurs ont identifié un NES sur la protéine core qui lui donnait la capacité d'être exportée du noyau vers le cytoplasme afin de rejoindre le site d'assemblage des particules virales (Cerutti et al. 2011). De la même manière, la nucléocapsid (NP) du virus de la rougeole, possède un NLS afin d'être importée dans le noyau des cellules dans le but d'échapper aux défenses immunitaires. Cette protéine joue un rôle d'antagoniste de la réponse immunitaire IFN- α/β and γ en bloquant la translocation nucléaire de STAT. Cette nucléocapsid a également un NES fonctionnel (Takayama et al. 2012). Aussi, plusieurs protéines (NS1, PB1, PB2, PA, NP, M1) du virus *Influenza* possèdent des NLS et des NES afin d'assurer la réplication nucléaire de son génome et l'assemblage cytosolique des particules virales (pour revue voir (Boulo et al. 2007)).

Concernant le HEV, le rôle de la localisation nucléaire de sa protéine ORF2 n'est pas connu à ce jour. Elle jouerait certainement un rôle dans l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte ou dans la régulation des facteurs cellulaires importants pour sa réplication. En effet, des analyses préliminaires de transcriptomique ont montré que la

localisation nucléaire de l'ORF2 modifie probablement l'expression de plusieurs gènes (données non montrées). Néanmoins, ces résultats nécessitent d'être consolidés. De plus, il n'est pas exclu que la réplication du génome du HEV se déroule dans le noyau des cellules hôtes car il a été démontré que la réplicase virale ORF1, présente une localisation nucléaire et nucléolaire (Kenney & Meng 2015; Scott P Kenney 2015).

Nos résultats ont montré que la protéine de capsid ORF2 du HEV est transloquée dans le noyau des cellules hôtes à des temps très précoces de son cycle infectieux, comme décrit pour la protéine core du HCV (Suzuki et al. 2005; Cerutti et al. 2011), ceci probablement afin de réguler les facteurs de transcription importants pour sa réplication. De manière intéressante, nous avons observé une réduction importante en fonction du temps de la localisation nucléaire de la protéine ORF2, allant de 100% à 24h post-électroporation à 30% à 72h, suggérant que cette protéine est activement exportée du noyau vers le cytoplasme, comme le font plusieurs protéines virales (Mathew & Ghildyal 2017). En utilisant la leptomycine B qui est un inhibiteur spécifique de l'Exportine1, nous avons confirmé que la protéine ORF2 est exportée du noyau des cellules hôtes de manière dépendante de l'exportine1 (**Données non publiées et confidentielles**). Nous avons montré que la protéine ORF2 colocalise partiellement ou transitoirement avec l'exportine1. L'interaction de ces deux protéines reste à confirmer par d'autres approches expérimentales. Nos résultats ont révélé également que la protéine ORF2 possède 3 NES fonctionnels en position 465, 540, 640 comme c'est le cas de la nucléoprotéine du virus *Influenza* (J. Li et al. 2015; Neumann et al. 1997). La présence de trois NES sur la protéine ORF2 lui permettrait d'être rapidement exportée du noyau vers le cytoplasme afin de remplir sa fonction de protéine structurale essentielle au cycle infectieux du HEV en rejoignant notamment le site d'assemblage viral cytoplasmique, comme c'est le cas de la protéine core du HCV (Cerutti et al. 2011). Ces 3 NES pourraient également exporter le génome viral vers le cytoplasme comme c'est le cas de la protéine HBc du HBV (Li, H.-C. et al. 2010). L'export nucléaire de la protéine ORF2 permettrait aussi d'éviter l'apoptose cellulaire car pour les mutants NES9 et NES10, une toxicité cellulaire a été observée (**résultats non montrés**).

La protéine NEP du virus *Influenza* possède deux NES qui fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. Lorsque le premier NES est muté, aucune accumulation nucléaire de la protéine NEP n'est observée, seule la mutation des deux NES permet d'observer une accumulation nucléaire de cette protéine (Huang, S. et al. 2013). A l'inverse, nous avons observé une accumulation nucléaire significative de la protéine ORF2 lorsque chaque NES est

muté individuellement, suggérant une fonction étroitement liée de ces trois NES indiquant qu'ils pourraient former un « NES tripartite ».

En résumé, nous avons montré pour la première fois en système infectieux que la protéine ORF2 du HEV possède un NLS et 3 NES lui permettant d'interagir avec les importines et les exportines cellulaires afin de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau des cellules hôtes. Cette nouvelle compréhension du cycle cellulaire de la protéine de capsid ORF2 ouvre des axes thérapeutiques importants contre le HEV. En effet, il existe des inhibiteurs de l'import nucléaire (Ivermectine) et de l'export nucléaire (Selinexore, Verdinexore) qui sont approuvés par la FDA et qui ont montré leur efficacité contre plusieurs virus comme le virus *Influenza* ou le VIH (Jans et al. 2019). L'effet de ces inhibiteurs sur le cycle infectieux du HEV est en cours de réalisation.

Pris ensemble, nos résultats révèlent que l'adressage de la protéine ORF2 est finement régulé au cours du cycle infectieux du HEV et génère différentes formes. La protéine ORF2 pourrait suivre trois voies (**Figure 30**) :

(i) La voie non productive dans laquelle une fraction de la protéine ORF2 possédant un PS fonctionnel serait transloquée dans la lumière du RE où elle est N-glycosylée (au niveau des sites N1 et N3), O-glycosylée et sialylée pour donner la forme ORF2g. La translocation réticulaire de l'ORF2 est régulée par la SeqR (²⁸RRRGRR³³) située en aval de son PS. La protéine ORF2g serait ensuite clivée probablement par des protéases de type furine au niveau de cette même SeqR (²⁸RRRGRR³³) pour donner une forme mature et fonctionnelle. La forme ORF2g serait clivée concomitamment par des protéases de même type au niveau d'une autre SeqR (⁹⁹RRR¹⁰¹) pour donner la forme ORF2c. Les protéines ORF2g et ORF2c sont ensuite massivement sécrétées dans le surnageant des cellules en culture cellulaire et sont les antigènes viraux majeurs chez les patients infectés par le HEV.

(ii) La voie productive dans laquelle une fraction de la protéine ORF2 possédant un PS non fonctionnel, restera du côté cytosolique des membranes des compartiments cellulaires par l'action de la SeqR (²⁸RRRGRR³³) située en aval du PS de l'ORF2. Ancrée du côté cytosolique des membranes, la protéine ORF2i rejoindrait le site d'assemblage des particules virales qui n'est pas connu à ce jour. La protéine ORF2i serait probablement clivée par des protéases de type Présénilines ou SPP lors de son transit le long de la voie de sécrétion. Les virions formés sont ensuite libérés de la cellule hôte (**Figure 30**).

(iii) La voie nucléaire dans laquelle la protéine ORF2intra interagirait avec les importines α/β via sa SeqR (²⁸RRRGRR³³), qui est un NLS fonctionnel, pour être transloquée dans le noyau des cellules hôtes et donner la forme ORF2ni. Ce processus a probablement lieu à des temps

très précoces du cycle infectieux du HEV afin d'assurer une fonction qui reste à définir. La forme ORF2ni serait clivée dans le noyau pour donner la forme ORF2nc. Elle serait ensuite très rapidement exportée du noyau vers le cytoplasme en interagissant avec l'Exportine1 au niveau de ses trois NES (en position 465, 540, 640), (**Figure 30**).

Ainsi, il ressort du cycle cellulaire de la protéine ORF2 que la SeqR (²⁸RRRGRR³³) située en aval de son PS est multifonctionnel : (1) Il régule la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2. (2) Il sert de site de maturation de la protéine ORF2g. (3) Il permet l'orientation cytosolique de la protéine ORF2 afin de donner les formes ORF2i et ORF2ni. (4) Il joue le rôle de NLS impliqué dans la translocation nucléaire de la protéine ORF2. (5) Cette SeqR serait également impliqué dans l'interaction avec l'ARN viral. Ce mécanisme de condensation de plusieurs informations génétiques illustre la faculté qu'a la protéine ORF2 à accumuler dans quelques acides aminés (²⁸RRVRRR³³) des informations lui procurant de nombreuses et importantes propriétés. Cela nous amène à comparer le HEV à « **Un maître de la condensation de l'information génétique** ».

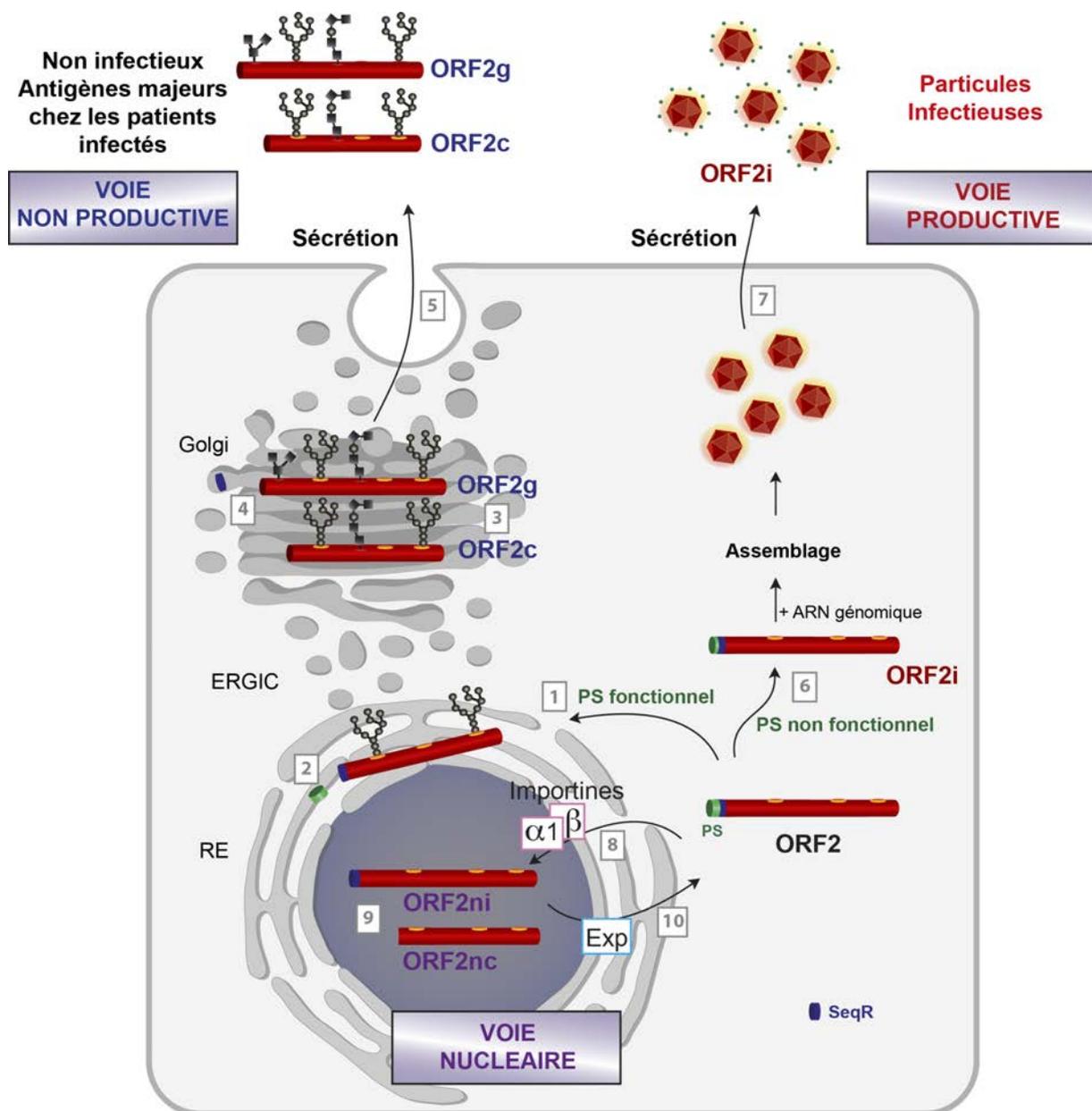


Figure 30: Modèle du cycle cellulaire de la protéine ORF2 du HEV.

La protéine ORF2 (en rouge) est constituée de 660 aa et d'un PS (en vert) en position N-terminale. La protéine ORF2 peut suivre plusieurs voies : **(i) La voie non productive** dans laquelle, une fraction de cette protéine possédant un PS fonctionnel est (1) transloquée dans la lumière du RE suite au clivage de son PS par la signal peptidase (2). (3) Dans la voie de sécrétion, elle est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée pour donner la forme ORF2g. La forme ORF2g est clivée probablement par des furines pour donner la forme ORF2c. (4) L'ORF2g est maturée à son extrémité N-terminale par clivage au niveau de la SeqR (²⁸RRRGR³³, en violet) par une PC de type Furine. (5) Les protéines ORF2g et ORF2c sont ensuite sécrétées dans le milieu extracellulaire. **(ii) La voie productive** dans laquelle la protéine ORF2 possède un PS non fonctionnel, (6) reste du côté cytosolique des membranes pour encapsider le génome viral. (7) Les virions formés sont ensuite libérés de la cellule. La forme associée au génome viral est appelée ORF2i. **(iii) La voie nucléaire** dans laquelle la SeqR (²⁸RRRGR³³) joue le rôle de NLS permettant à la protéine ORF2 d'interagir avec les Importines $\alpha 1/\beta$ afin d'être transloquée dans le noyau des cellules pour donner la forme ORF2ni (8). La forme ORF2ni est clivée pour donner la forme ORF2nc (9). (10) La protéine ORF2ni est ensuite exportée du noyau vers le cytoplasme en interagissant avec l'Exportine 1 (Exp) grâce à ses trois NES situés en position 465, 540 et 640. ORF2g : ORF2 glycosylée ; ORF2c : ORF2 clivée ; ORF2i : ORF2 infectieuse/intracellulaire ; ORF2ni : ORF2 nucléaire; ORF2nc (ORF2 nucléaire clivée); ERGIC : Compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi.

ANNEXES

Annexe 1: The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself

Résumé

La première cause d'hépatite aiguë dans le monde est due au virus de l'hépatite E (HEV). Cette infection virale a longtemps été considérée comme un problème touchant les pays en développement. Cependant, depuis l'identification de formes zoonotiques à la fin du siècle dernier, il est apparu que cette infection touche également les pays industrialisés. Le récent regain d'intérêt pour le HEV révèle des particularités de ce virus. Bien que considéré comme un virus non enveloppé, la particule virale du HEV est entourée d'une membrane lipidique dans la circulation sanguine où le virus produit en abondance des formes de sa protéine de capsid qui ne sont pas associées à du matériel infectieux et qui pourraient servir de leurre immunologique. Cette revue résume les avancées récentes sur ce virus, dont le nombre de cas d'infection diagnostiqués augmente chaque année

Cette revue fait l'objet d'une publication dans *Médecine&Sciences* (IF 2017 : 0,685) dans laquelle je suis premier auteur (**Ankavay et al. 2018**).

Annexe 2: Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid protein

Résumé

Contexte

Le virus de l'hépatite E (HEV) est actuellement la première cause d'hépatite aiguë dans le monde. Il est à l'origine d'environ 20 millions d'infections et d'approximativement 70 000 décès par an dans le monde. Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae*. Il possède un génome à ARN, linéaire et de polarité positive qui code trois protéines: la réplicase virale (ORF1), la protéine de capsid virale (ORF2) et une phosphoprotéine impliquée dans la sécrétion des particules virales (ORF3). Jusqu'à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin universel n'est disponible contre ce virus. L'étude des aspects fondamentaux du cycle infectieux du HEV a été longtemps limitée du fait de la difficulté à le cultiver *in vitro*.

Objectif

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre le cycle infectieux du HEV en utilisant un système de culture cellulaire du HEV, un modèle animal permissif à ce virus et des échantillons humains provenant des patients infectés par le HEV.

Méthode

Dans cette étude, nous avons utilisé le plasmide d'expression de la souche Kernow-C1/p6, HEV-3 (HEV-p6) qui est une souche adaptée en culture cellulaire, d'un système de réplicon exprimant le gène de la *Gaussia luciferase* (HEV-p6Gluc) et de la lignée cellulaire hépatique PLC/PRF/5 et de ses sous-clones PLC1 et PLC3 générés au laboratoire dans le cadre d'un projet sur le HCV. En plus de la caractérisation du HEV *in vitro*, nous avons également réalisé des expérimentations *in vivo* sur des souris au foie humanisé (Homozygous urokinase plasminogen activator (uPA)-SCID mice). Nous avons aussi utilisé les sérums et les selles de patients infectés par le HEV. Afin de mieux caractériser les particules virales du HEV et ses protéines, nous avons combiné plusieurs approches expérimentales à savoir: la production des particules virales *in vitro*, la purification des particules virales en utilisation des gradients de densité d'iodixanol, la microscopie électronique, la microscopie à épifluorescence, les techniques d'immunofluorescence, de western blot, de spectrométrie de masse, de GNA pull-down, de titre viral et de RT-qPCR. Nous avons également utilisé des glycosidases dans le cadre de la caractérisation des protéines virales *in vitro*.

Résultats

Nous avons développé un système efficace de production du HEV *in vitro* en utilisant le plasmide d'expression de la souche Kernow-C1/p6, HEV-3 (HEV-p6) et des cellules PLC3, sous-clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5. Dans ce système, la réplication du HEV est assez précoce avec une production de particules virales et une expression des protéines ORF2 et ORF3 à partir de 4 jours après transfection. Nous avons montré pour la première fois que le HEV produit trois formes de sa protéine de capsid au cours de son cycle infectieux *in vitro* et chez les patients infectés : (i) la forme ORF2i (i pour infectieuse) qui est la forme associée aux particules infectieuses et au génome viral. Cette forme est non glycosylée. (ii) La forme ORF2g (g pour glycosylée) qui est une forme N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée. (iii) La forme ORF2c (c pour clivée) qui est probablement un produit de clivage de la forme ORF2g. Les formes ORF2g et ORF2c sont massivement sécrétées dans le surnageant des cellules infectées et dans le sérum de patients infectés par le HEV. Nous avons identifié les séquences des protéines ORF2i et ORF2g qui débutent respectivement au niveau des acides aminés L14 et S34. Nous avons également montré que les formes ORF2g et ORF2c inhibent probablement l'infectiosité des particules virales du HEV. Nous avons également caractérisé en microscopie électronique les particules virales du HEV produites en culture cellulaire (HEVcc) et isolées à partir d'échantillons provenant de patients infectés par le HEV.

Ma participation dans ce projet

Dans ce projet, j'ai participé à la production de stocks viraux. Pour cela, j'ai transcrit *in vitro* les ARN cappés du HEV en utilisant le plasmide d'expression de la souche Kernow C-1 p6, HEV-3 (HEV-p6) et j'ai réalisé des électroporations de ces ARN dans les cellules PLC3. Ces grosses productions virales ont permis de caractériser les particules virales du HEV en microscopie électronique, en spectrométrie de masse et de déterminer le statut de glycosylation de la protéine de capsid ORF2. J'ai également participé à la conception et à la réalisation des tests d'inhibition de l'infectiosité du HEV par ses protéines ORF2g et ORF2c non associées aux particules infectieuses.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Gastroenterology* (IF 2017: 20,877) dans laquelle je suis sixième auteur (**Montpellier et al. 2018**).

Annexe 3: Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication

Résumé

Le virus de l'hépatite E (HEV) appartient à la famille des *Hepeviridae*. C'est un virus qui possède un génome à ARN, simple brin, de polarité positive (+) qui code trois protéines dont la replicase virale ORF1. Les mécanismes précis de réplication du HEV restent inconnus à ce jour du fait de l'absence de modèle d'étude efficace jusqu'à très récemment. La réplication des virus à ARN (+) a lieu en étroite association avec les membranes cytoplasmiques de la cellule hôte. En effet, dans les cellules infectées, les facteurs cellulaires et viraux génèrent de manière coopérative des structures particulières ressemblant à des organelles qui sont des usines de réplication virale. Cette compartimentalisation permet la coordination des différentes étapes du cycle infectieux, une réplication hautement efficace du génome viral et protège l'ARN viral des mécanismes de défense cellulaire. Deux types de structure peuvent être induits : des vésicules invaginées ou sphérules dans le cas des *Alphavirus* ou des *Flavivirus* par exemple et des vésicules à double membrane dans le cas des *Enterovirus*, des *Coronavirus* ou du virus de l'hépatite C (HCV) par exemple. Ces structures membranaires peuvent dériver de la membrane plasmique, des endosomes, de la membrane mitochondriale externe, de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. Il est à noter que pour un certain nombre de virus le site de bourgeonnement viral se situe à proximité des usines de réplication indiquant une coordination spatiale des étapes de réplication et d'assemblage viral. Pour induire ces remaniements membranaires massifs, les virus utilisent des facteurs cellulaires actifs sur les membranes et exploitent les voies cellulaires impliquées dans l'homéostasie membranaire. Certains virus détournent des composants de la voie de sécrétion cellulaire. En effet, il a été montré dans le laboratoire que GBF1 (Guanine nucleotide-exchange factor 1), un facteur d'échange nucléotidique (GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor) des protéines G de la famille des Arf (ADP Ribosylation Factor) est un facteur nécessaire à la réplication du HCV (Goueslain et al. 2010). GBF1, BIG1 et BIG2 sont des facteurs d'échange nucléotidique importants dans la régulation des Arf de classe I (Arf1, Arf2 et Arf3) et de classe II (Arf4 et Arf5). Ces Arf sont impliqués dans le trafic vésiculaire antérograde dans les cellules. L'inhibition de GBF1 par la bréfeldine A (BFA) inhibe la voie de sécrétion des protéines cellulaires néosynthétisées et inhibe aussi la réplication du HCV. L'utilisation de mutants de GBF1 a ensuite permis de montrer une implication des protéines Arf, qui sont des régulateurs centraux de la dynamique membranaire et du bourgeonnement vésiculaire dans la voie de sécrétion.

Il a été notamment montré que les protéines Arf4 et Arf5 jouent un rôle essentiel dans l'infection HCV probablement en activant des facteurs cellulaires nécessaires à l'étape de réplication (Farhat et al. 2016). Concernant le HEV, aucune étude montrant le rôle des GEF dans la réplication de ce virus n'a été réalisée. C'est pourquoi, nous nous sommes donc intéressés à ces facteurs dans le cycle infectieux du HEV. Pour cela, nous avons utilisé la BFA, un inhibiteur pharmacologique qui bloque l'activité de GBF1, BIG1 et BIG2, qui jouent un rôle majeur dans le remaniement des membranes cellulaires. De manière intéressante, nous avons montré que la BFA inhibe la réplication du HEV d'une manière dose-dépendante. L'utilisation de siRNA et de Golgicide A, un inhibiteur spécifique de GBF1, a identifié GBF1 en tant que facteur hôte impliqué dans la réplication du HEV. Des expériences utilisant des cellules exprimant une mutation dans le domaine catalytique de GBF1 (Farhat et al. 2013) ont confirmé l'implication de GBF1 dans la réplication du HEV. De plus, la surexpression de GBF1 sauvage ou d'un mutant de GBF1 résistant à la BFA a restauré la réplication du HEV dans les cellules traitées à la BFA, indiquant que GBF1 est le facteur sensible à la BFA requis pour la réplication du HEV. Enfin, nous avons démontré que GBF1 est nécessaire pour l'activité des complexes de réplication du HEV, mais sa distribution subcellulaire est non modifiée lors de l'infection ou la surexpression de la réplicase ORF1. Ensemble, nos résultats suggèrent que GBF1 est impliqué dans la réplication du HEV. Le HEV pourrait donc induire un remaniement des membranes cellulaires à travers des mécanismes régulés par GBF1 au cours de sa réplication dans les cellules hôtes.

Ma contribution dans ce projet

Afin de déterminer le rôle de GBF1, BIG1 et de BIG2 dans la réplication du HEV en système réplicon, j'ai réalisé des électroporations du plasmide p6^{SP}Gluc dans les cellules Huh-7.5. Le plasmide p6^{SP}Gluc est un réplicon qui exprime la *Gaussia luciferase* déléetée de son peptide signal (SP) située à la place des ORFs codant les protéines structurales ORF2 et ORF3 dans le génome de la souche infectieuse p6 Kernow-C1, HEV-3. J'ai ensuite traité les cellules Huh-7.5/p6^{SP}Gluc avec la BFA qui inhibe l'activité de GBF1, BIG1 et BIG2, et mesuré les activités luciférase (**Figure 1b: Huh-7.5/p6^{SP}Gluc, Farhat et al. 2018**).

J'ai également réalisé la même expérience en système infectieux en électroporant les cellules Huh-7.5 avec les ARNs cappés pleine longueur transcrits *in vitro* de la souche infectieuse p6 Kernow-C1. Les cellules ont été traitées avec la BFA et fixées. La protéine ORF2 a été détectée par immunofluorescence et microscopie épifluorescence.

Le pourcentage de cellules positives exprimant l'ORF2 a été déterminé afin d'évaluer l'effet de la BFA sur l'expression de cette protéine virale (**Figure 1g, Farhat et al. 2018**). Les résultats de cette analyse montrent que la BFA inhibe la réplication du HEV en système réplicon et infectieux.

Afin de confirmer que GBF1 est le seul facteur d'échange nucléotidique impliqué dans la réplication du HEV, j'ai réalisé une expérience de complémentation. Pour cela, nous disposons au laboratoire de plasmides exprimant différentes formes de GBF1 : (i) GBF1 fusionné à la YFP (Yellow Fluorescence Protein) (GBF1wt-YFP), (ii) une forme GBF1 résistante à la BFA (mutant M832L, GBF1ML-YFP), et (iii) une forme inactive de GBF1 (mutant E794K, GBF1EK-YFP). Nous disposons également d'un plasmide exprimant la YFP seule comme contrôle. Ces plasmides ont été transfectés dans les cellules Huh-7.5. Deux jours après transfection, j'ai déterminé le niveau d'expression de la YFP par western blot et par immunofluorescence. Ensuite les cellules ont été électroporées avec les ARNs cappés pleine longueur transcripts *in vitro* de la souche infectieuse p6 Kernow-C1, HEV-3 puis traitées avec la BFA (75ng/ml, coconcentration inhibant environ 60% de la réplication du HEV). Quatre jours après électroporation, les cellules ont été fixées puis la protéine ORF2 a été détectée par immunofluorescence et microscopie épifluorescence. Le pourcentage de cellules exprimant l'ORF2 a été quantifié afin de déterminer l'effet des différentes formes de GBF1 sur la réplication du HEV (**Figure 4, Farhat et al. 2018**). Les résultats de ces analyses ont montré une réduction d'environ 50% des cellules positives pour l'ORF2 dans les cellules exprimant la YFP seule et GBF1EK (forme inactive de GBF1). A l'inverse, le pourcentage de cellules exprimant l'ORF2 était augmenté respectivement d'environ 20% et de 35% dans les cellules exprimant les formes GBF1 sauvage et GBF1ML (mutant de GBF1 résistant à la BFA). Ces résultats montrent que la surexpression de GBF1 dans les cellules Huh-7.5 augmente la réplication du HEV (**Farhat et al. 2018**).

Dans le but d'identifier l'étape du cycle infectieux du HEV dans laquelle intervient GBF1, j'ai réalisé une cinétique dans laquelle les cellules Huh-7.5/p6^{SP}Gluc ont été traitées à différents temps après transfection avec la BFA (0, 24 ou 48 heures après électroporation) et l'activité de la *Gaussia luciferase* a été quantifiée à 24, 48 ou 72 heures après électroporation. Les résultats de cette analyse ont montré que la BFA inhibe la réplication du HEV quel qu'en soit le temps de traitement des cellules Huh-7.5/p6^{SP}Gluc par la BFA (précoce ou tardif) suggérant que GBF1 est impliqué dans l'étape de réplication et non dans l'étape d'assemblage du HEV (**Figure 5, Farhat et al. 2018**). Il est à noter que la quantification de l'activité de la *Gaussia luciferase* a été réalisée par Nadjat Lebsir (3^{ème} auteur de ce travail).

Enfin, dans le but de déterminer l'effet de la réplication du HEV sur la localisation subcellulaire de GBF1, j'ai électroporé les cellules PLC3 avec les ARNs HEV-p6. Les cellules ont ensuite été fixées trois jours après-électroporation puis les protéines ORF2 et GBF1 ont été co-détectées par immunofluorescence et microscopie confocale. Les cellules PLC3 non électroporées ont servi de contrôle. Les résultats de cette analyse ont montré que dans les cellules PLC3 non électroporées, la protéine GBF1 a une localisation golgienne, périnucléaire avec une accumulation cytoplasmique ponctiforme. La localisation subcellulaire de GBF1 reste identique dans les cellules PLC3/HEV-p6 suggérant que la réplication du HEV ne modifie pas la localisation subcellulaire de ce facteur cellulaire ((**Figure 6, Farhat et al. 2018**)).

Dans ce travail, nous avons montré pour la première fois que GBF1 est un facteur d'échange nucléotidique impliqué dans la réplication du HEV. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Cellular Microbiology* (IF 2017: 4.41) dans laquelle je suis le deuxième auteur (**Farhat et al. 2018**)

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, Y. et al., 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *Journal of virology*, 78(18), pp.9605–9611.
- Abid, S. & Khan, A.H., 2002. Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *The American journal of gastroenterology*, 97(6), pp.1544–1547.
- Abravanel, F. et al., 2017. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerging Infectious Diseases*, 23(7), pp.1191–1193.
- Aggarwal, R., 2011. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus research*, 161(1), pp.15–22.
- Aggarwal, R. & Goel, A., 2018. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 2 Infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, pii: a032136.
- Aggarwal, R. & Krawczynski, K., 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15(1), pp.9–20.
- Agrawal, S., Gupta, D. & Panda, S.K., 2001. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology*, 282(1), pp.87–101.
- Ahmad, I. et al., 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Research*, 1(1), pp.47–58.
- Allweiss, L. et al., 2016. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *Journal of hepatology*, 64(5), pp.1033–1040.
- Anang, S. et al., 2016. Identification of critical residues in Hepatitis E virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and ORF3 proteins. *Scientific reports*, 6, p.25133.
- Anang, S., Kaushik, N. & Surjit, M., 2018. Recent Advances Towards the Development of a Potent Antiviral Against the Hepatitis E Virus. *Journal of clinical and translational hepatology*, 6(3), pp.310–316.
- Ankavay, M. et al., 2019. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Scientific reports*, 9(1), p.6243.
- Ankavay, M., Dubuisson, J. & Cocquerel, L., 2018. [The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself]. *Medecine sciences*, 34(12), pp.1071–1078.
- Anon, 2017. Correction for Ding et al., Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), p.E4897.

- Arankalle, V.A. et al., 1988. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *The Lancet*, 1(8585), pp.550–554.
- Arankalle, V.A. et al., 1993. Hepatitis E virus infection in pregnant rhesus monkeys. *The Indian journal of medical research*, 97, pp.4–8.
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S. & Chobe, L.P., 1999. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *Journal of hepatology*, 30(2), pp.199–204.
- Baechlein, C. & Becher, P., 2017. No evidence for zoonotic hepatitis E virus infection through dairy milk in Germany. *Hepatology*, 65(1), pp.394–395.
- Bagdassarian, E. et al., 2018. 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. *Viruses*, 10(12), pii: E726.
- Baigent, S.J. & McCauley, J.W., 2001. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus research*, 79(1-2), pp.177–185.
- Balayan, M.S. et al., 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 20(1), pp.23–31.
- Barnaud, E. et al., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), pp.5153–5159.
- Bause, E., 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochemical Journal*, 209(2), pp.331–336.
- Behrendt, P. et al., 2017. Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNF α treatment. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, 84(2), pp.217–219.
- Behrendt, P. et al., 2016. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. *The Journal of infectious diseases*, 214(3), pp.361–368.
- Bhatia, V. et al., 2008. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology*, 48(5), pp.1577–1585.
- Biliotti, E. et al., 2018. Autochthonous acute hepatitis E: treatment with sofosbuvir and ribavirin. *Infection*, 46(5), pp.725–727.
- Block, T.M. et al., 1994. Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxyynojirimycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp.2235–2239.
- Blondot, M.-L., Bruss, V. & Kann, M., 2016. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*, 64(1 Suppl), pp.S49–S59.
- Bose, P.D. et al., 2014. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *Journal of General Virology*, 95(Pt 6), pp.1266–1271.

- Boulo, S. et al., 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus research*, 124(1-2), pp.12–21.
- Brown, A. et al., 2016. Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. *Hepatology*, 64(6), pp.1934–1950.
- Cao, D. et al., 2017. Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), pp.6914–6923.
- Cao, D., Huang, Y.-W. & Meng, X.-J., 2010. The nucleotides on the stem-loop RNA structure in the junction region of the hepatitis E virus genome are critical for virus replication. *Journal of virology*, 84(24), pp.13040–13044.
- Cao, Y.-F. et al., 2017. A phase 1 randomized open-label clinical study to evaluate the safety and tolerability of a novel recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*, 35(37), pp.5073–5080.
- Cerutti, A. et al., 2011. Identification of a functional, CRM-1-dependent nuclear export signal in hepatitis C virus core protein. *Plos one*, 6(10), p.e25854.
- Chaudhry, S.A., Verma, N. & Koren, G., 2015. Hepatitis E infection during pregnancy. *Canadian family physician*, 61(7), pp.607–608.
- Choudhary, M.C. et al., 2019. Guillain-Barré syndrome in a patient of acute Hepatitis E virus infection associated with genotype 1: Case report and literature review. *Intractable & rare diseases research*, 8(1), pp.43–47.
- Clemente-Casares, P. et al., 2016. Hepatitis E Virus in Industrialized Countries: The Silent Threat. *BioMed research international*, 2016, p.9838041.
- Colson, P. et al., 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *The Journal of infectious diseases*, 202(6), pp.825–834.
- Colson, P., Borentain, P. & Gerolami, R., 2019. Full-length title: Hepatitis E virus as agent of hepatocellular carcinoma (for the): Hepatitis E virus and hepatocellular carcinoma. *International journal of infectious diseases*, 80, pp.62-63.
- Comont, T. et al., 2014. [Acute hepatitis E infection associated with Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient]. *La Revue de medecine interne*, 35(5), pp.333–336.
- Cossaboom, C.M. et al., 2012. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *Journal of General Virology*, 93(Pt 8), pp.1687–1695.
- Dalton, H.R. & Izopet, J., 2018. Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(11), pii: a032144

- Dalton, H.R. et al., 2009. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *The New England journal of medicine*, 361(10), pp.1025–1027.
- Dao Thi, V.L. et al., 2016. Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology*, 150(1), pp.82–85.e4.
- Debing, Y., Emerson, S.U., et al., 2014. Ribavirin inhibits in vitro hepatitis E virus replication through depletion of cellular GTP pools and is moderately synergistic with alpha interferon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(1), pp.267–273.
- Debing, Y., Gisa, A., et al., 2014. A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology*, 147(5), pp.1008–11.e7.
- Debing, Y., Mishra, Niraj, et al., 2016. A rat model for hepatitis E virus. *Disease models & mechanisms*, 9(10), pp.1203–1210.
- Debing, Y., Moradpour, D., et al., 2016. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of hepatology*, pp.1–13.
- Delmas, O. et al., 2010. The structure of the nucleoprotein binding domain of lyssavirus phosphoprotein reveals a structural relationship between the N-RNA binding domains of Rhabdoviridae and Paramyxoviridae. *RNA biology*, 7(3), pp.322–327.
- Doceul, V. et al., 2016. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*, 8(10), p.270.
- Drinane, M., Jing Wang, X. & Watt, K., 2019. Sofosbuvir and Ribavirin Eradication of Refractory Hepatitis E in an Immunosuppressed Kidney Transplant Recipient. *Hepatology*, 69(5), pp.2297–2299.
- Drobeniuc, J. et al., 2010. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clinical infectious diseases*, 51(3), pp.e24–7.
- Emerson, S.U. & Purcell, R.H., 2001. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends in molecular medicine*, 7(10), pp.462–466.
- Farci, P. et al., 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, 288(5464), pp.339–344.
- Farhat, R. et al., 2018. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cellular microbiology*, 20(1), e12804.
- Farhat, R. et al., 2016. Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cellular Microbiology*, 18(8), pp.1121–33.
- Farhat, R. et al., 2013. Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin a-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS One*, 8(9), pp.e74491.

- Fenouillet, E., Gluckman, J.C. & Bahraoui, E., 1990. Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 64(6), pp.2841–2848.
- Feng, Z. et al., 2014. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annual reviews*, 1(1) pp.539-560
- Fischer, P.B. et al., 1996. N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus entry correlates with changes in antibody recognition of the V1/V2 region of gp120. *Journal of virology*, 70(10), pp.7143–7152.
- Fischer, P.B. et al., 1995. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *Journal of virology*, 69(9), pp.5791–5797.
- Forni, D. et al., 2018. Origin and dispersal of Hepatitis E virus. *Emerging microbes & infections*, 7(1), p.11.
- Freeze, H.H., 2006. Genetic defects in the human glycome. *Nature reviews. Genetics*, 7(7), pp.537–551.
- Fung, H.Y.J. & Chook, Y.M., 2014. Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. *Seminars in cancer biology*, 27, pp.52–61.
- Fung, H.Y.J. et al., 2015. Structural determinants of nuclear export signal orientation in binding to exportin CRM1. *eLife*, 4, e10034.
- Geng, Y. et al., 2016. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *Journal of hepatology*, 64(1), pp.37–43.
- Geng, Y. et al., 2019. Hepatitis E virus was not detected in feces and milk of cows in Hebei province of China: No evidence for HEV prevalence in cows. *International Journal of Food Microbiology*, 291, pp.5–9.
- Gerolami, R. et al., 2011. Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *Journal of clinical virology*, 52(1), pp.60–62.
- González Canga, A. et al., 2008. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans-a mini-review. *The American Association of Pharmaceutical Scientists journal*, 10(1), pp.42–46.
- Gouilly, J. et al., 2018. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nature communications*, 9(1), p.4748.
- Goueslain, L. et al., 2010. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*, 82(2), pp.773-787.
- Gouttenoire, J. et al., 2018. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLOS Pathogens*, 14(12), p.e1007471.

- Götz, V. et al., 2016. Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import. *Scientific reports*, 6, p.23138.
- Graff, J. et al., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *Journal of virology*, 80(12), pp.5919–5926.
- Graff, J. et al., 2008. Mutations within Potential Glycosylation Sites in the Capsid Protein of Hepatitis E Virus Prevent the Formation of Infectious Virus Particles. *Journal of virology*, 82(3), pp.1185–1194.
- Gu, J. et al., 2012. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconjugate journal*, 29(8-9), pp.599–607.
- Guerra, J.A. de A.A. et al., 2017. Hepatitis E: A Literature Review. *Journal of clinical and translational hepatology*, 5(4), pp.376–383.
- Guinault, D. et al., 2016. Hepatitis E Virus-Induced Cryoglobulinemic Glomerulonephritis in a Nonimmunocompromised Person. *American journal of kidney diseases*, 67(4), pp.660–663.
- Guu, T.S.Y. et al., 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp.12992–12997.
- Haagsma, E.B. et al., 2008. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver transplantation*, 14(4), pp.547–553.
- Hakim, M.S. et al., 2018. Immunity against hepatitis E virus infection: Implications for therapy and vaccine development. *Reviews in medical virology*, 28(2), e1964.
- Hamid, S.S. et al., 2002. Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology*, 36(2), pp.474–478.
- Hanna, S.L. et al., 2005. N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *Journal of virology*, 79(21), pp.13262–13274.
- He, M. et al., 2016. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF- κ B Signaling via TRADD and RIP1. *Scientific reports*, 6, p.27597.
- Helenius, A. & Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291(5512), pp.2364–2369.
- Helsen, N. et al., 2015. Stem cell-derived hepatocytes: a novel model for hepatitis E virus replication. Accepted Manuscript. *Journal of hepatology*, pp.1–38.
- Higy, M., Junne, T. & Spiess, M., 2004. Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 43(40), pp.12716–12722.
- Himmelsbach, K., Bender, D. & Hildt, E., 2018. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. *Emerging microbes & infections*, 7(196), pp.1–12.

- Holla, P. et al., 2015. Hepatitis E Virus Enters Liver Cells Through a Dynamin-2, Clathrin and Membrane Cholesterol-Dependent Pathway. *Traffic*, 16(4), pp.398–416.
- Holla, R. et al., 2013. Molecular Virology of Hepatitis E Virus. *Seminars in Liver Disease*, 33(01), pp.003–014.
- Hoofnagle, J.H., Nelson, K.E. & Purcell, R.H., 2012. Hepatitis E. *The New England journal of medicine*, 367(13), pp.1237–1244.
- Hsieh, T.Y. et al., 1998. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *The Journal of biological chemistry*, 273(28), pp.17651–17659.
- Huang, F., Li, Y., et al., 2016. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*, 64(2), pp.350–359.
- Huang, F., Yang, C., et al., 2016. Hepatitis E virus infection activates signal regulator protein α to down-regulate type I interferon. *Immunologic research*, 64(1), pp.115–122.
- Huang, F.F. et al., 2005. Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV. *The Journal of general virology*, 86(Pt 9), pp.2585–2593.
- Huang, R. et al., 1999. Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 6(5), pp.729–733.
- Huang, S. et al., 2013. A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Journal of virology*, 87(2), pp.767–778.
- Husain, M.M. et al., 2011. Effector T cells immune reactivity among patients with acute hepatitis E. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(10), pp.e603–8.
- Hyams, C. et al., 2014. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *Journal of Medical Virology*, 86(3), pp.478–483.
- Ibarra, A. & Hetzer, M.W., 2015. Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes & development*, 29(4), pp.337–349.
- Inoue, J. et al., 2006. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *Journal of Medical Virology*, 78(4), pp.476–484.
- Irshad, M., 1999. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology*, 42(4), pp.252–262.
- Izopet, J. et al., 2012. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), pp.1274–1281.
- Jameel, S. et al., 1996. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *Journal of virology*, 70(1), pp.207–216.

- Jans, D.A., Martin, A.J. & Wagstaff, K.M., 2019. Inhibitors of nuclear transport. *Current opinion in cell biology*, 58, pp.50–60.
- Jilani, N. et al., 2007. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(5), pp.676–682.
- Jirintai, S. et al., 2012. 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 research*, 170(1-2), pp.126–137.
- Jirintai, S. et al., 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus research*, 185, pp.92–102.
- Juillard, F. et al., 2009. Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *Journal of virology*, 83(24), pp.12759–12768.
- Kalia, M. et al., 2009. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *Journal of virology*, 83(24), pp.12714–12724.
- Kamar, N. & Pischke, S., 2018. Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, pii: a031872.
- Kamar, N. et al., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *The New England journal of medicine*, 358(8), pp.811–817.
- Kamar, N et al., 2010. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *American Journal of Transplantation*, (10), pp. 1321–1324.
- Kamar, N., Bendall, R.P., et al., 2011. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), pp.173–179.
- Kamar, N., Garrouste, C., et al., 2011. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*, 140(5), pp.1481–1489.
- Kanade, G.D., Pingale, K.D. & Karpe, Y.A., 2018. Activities of Thrombin and Factor Xa Are Essential for Replication of Hepatitis E Virus and Are Possibly Implicated in ORF1 Polyprotein Processing. *Journal of virology*, 92(6), pii: e01853-17.
- Kannan, H. et al., 2009. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *Journal of virology*, 83(13), pp.6375–6382.
- Kapur, N. et al., 2012. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Viral Hepatitis*, 19(6), pp.436–448.
- Karayiannis, P., 2017. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology international*, 11(6), pp.500–508.

- Kawai, T. & Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), pp.637–650.
- Kenfak-Foguena, A. et al., 2011. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), pp.1074–1078.
- Kenney, S.P. & Meng, X.-J., 2015. 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. H. J. Ou, ed. *Journal of virology*, 89(7), pp.3793–3803.
- Kenney, S.P. et al., 2015. Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101. *Virology*, 486, pp.198–208.
- Khaskheli, M.-N. et al., 2015. Acute Hepatitis E Viral Infection in Pregnancy and Maternal Morbidity. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan*, 25(10), pp.734–737.
- Khuroo, M.S. & Kamili, S., 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *Journal of Viral Hepatitis*, 10(1), pp.61–69.
- Korber, B. et al., 2001. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British medical bulletin*, 58, pp.19–42.
- Kooning, E. V. et al., 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 (17), pp.8259-8263.
- Krzowska-Firych, J.M. et al., 2018. Hepatitis E - A new era in understanding. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 25(2), pp.250–254.
- Kulkarni, S.P. et al., 2016. Specific memory B cell response and participation of CD4+ central and effector memory T cells in mice immunized with liposome encapsulated recombinant NE protein based Hepatitis E vaccine candidate. *Vaccine*, 34(48), pp.5895–5902.
- Kumar, A. et al., 2014. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine*, 65(1), pp.95–104.
- Kumar, R.M. et al., 2001. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 100(1), pp.9–15.
- Kundra, R. & Kornfeld, S., 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry*, 274(43), pp.31039–31046.
- Lapa, D. et al., 2016. Diagnostic performance of hepatitis E virus antigen assay in hepatitis E virus acute infection. *The new microbiologica*, 40(4), pp.246–250.

- Larkin, A. & Imperiali, B., 2011. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry*, 50(21), pp.4411–4426.
- Lavie, M., Hanouille, X. & Dubuisson, J., 2018. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Frontiers in immunology*, 9 (910), pp.1–9.
- Lee, G.-H. et al., 2016. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150(2), pp.355–7.e3.
- Lei, E.P. & Silver, P.A., 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Developmental cell*, 2(3), pp.261–272.
- Lei, Q. et al., 2016. 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 immunology*, 29(2), pp.105–111.
- Lenggenhager, D. et al., 2017. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. Accepted Manuscript. *Journal of hepatology*, pp.1–32.
- Lhomme, S. et al., 2016. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 8(8), pii: E212.
- Lhomme, S. et al., 2012. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *Journal of virology*, 86(18), pp.10006–10014.
- Lhomme, S. et al., 2015. Mutation in the Hepatitis E Virus Polymerase and Outcome of Ribavirin Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), pp.1608–1614.
- Lhomme, S. et al., 2018. Virus de l'hépatite E : de l'organisme infecté à la réponse cellulaire. *Virologie*, 22 (5), pp.239-50.
- Li, C. et al., 2016. Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation. *Journal of virology*, 90(19), pp.8478–8486.
- Li, H.-C. et al., 2010. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLOS Pathogens*, 6(10), p.e1001162.
- Li, J. et al., 2015. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. *Viruses*, 7(5), pp.2668–2682.
- Li, S.W. et al., 2005. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*, 23(22), pp.2893–2901.
- Li, T.C. et al., 2015. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology*, 96(Pt 6), pp.1320–1327.
- Li, T.C., Yoshizaki, S., et al., 2016. Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5. *Virus research*, 213, pp.283–288.
- Li, T.C., Zhou, X., et al., 2016. Production of infectious dromedary camel hepatitis E virus by a reverse genetic system: Potential for zoonotic infection. *Journal of hepatology*, 65(6), pp.1104–1111.

- Liu, P. et al., 2013. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), pp.559–565.
- Loureiro, J. et al., 2006. Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 441(7095), pp.894–897.
- Magden, J. et al., 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *Journal of virology*, 75(14), pp.6249–6255.
- Maila, H.T., Bowyer, S.M. & Swanepoel, R., 2004. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *The Journal of general virology*, 85(Pt 1), pp.89–95.
- Mallet, V. et al., 2010. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Annals of internal medicine*, 153(2), pp.85–89.
- Marion, O. et al., 2018. Hepatitis E virus-associated cryoglobulinemia in solid-organ-transplant recipients. *Liver International*, 38(12), pp.2178–2189.
- Mathew, C. & Ghildyal, R., 2017. CRM1 Inhibitors for Antiviral Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8, p.1171.
- McLauchlan, J. et al., 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO journal*, 21(15), pp.3980–3988.
- Meister, T.L. et al., 2019. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral research*, 163, pp.34–49.
- Meng, X.J. et al., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), pp.9860–9865.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Haynes, J.S., et al., 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Archives of virology*, 143(7), pp.1405–1415.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., et al., 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *Journal of virology*, 72(12), pp.9714–9721.
- Mishra, Nischay, Walimbe, A.M. & Arankalle, V.A., 2013. Hepatitis E virus from India exhibits significant amino acid mutations in fulminant hepatic failure patients. *Virus genes*, 46(1), pp.47–53.
- Miyashita, K. et al., 2012. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatology research*, 42(9), pp.870–878.
- Moal, V. et al., 2013. Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *The Journal of infectious diseases*, 207(1), pp.125–132.

- Montefiori, D.C., Robinson, W.E. & Mitchell, W.M., 1988. Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), pp.9248–9252.
- Montpellier, C. et al., 2018. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology*, 154(1), pp.211–223.e8.
- Moriishi, K., 2017. The potential of signal peptide peptidase as a therapeutic target for hepatitis C. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(9), pp.827–836.
- Munier, S. et al., 2010. [Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses]. *Pathologie-biologie*, 58(2), pp.e59–68.
- Mykytczuk, O. et al., 2017. Prevalence and Molecular Characterization of the Hepatitis E Virus in Retail Pork Products Marketed in Canada. *Food and environmental virology*, 9(2), pp.208–218.
- Naik, A. et al., 2015. Changes in gene expression in liver tissue from patients with fulminant hepatitis E. *World journal of gastroenterology*, 21(26), pp.8032–8042.
- Nair, V.P. et al., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus X.-J. Meng, ed. *PLOS Pathogens*, 12(4), p.e1005521.
- Nakada, R. & Matsuura, Y., 2017. Crystal structure of importin- α bound to the nuclear localization signal of Epstein-Barr virus EBNA-LP protein. *Protein science*, 26(6), pp.1231–1235.
- Nan, Y. & Zhang, Y.-J., 2016. Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1419), pp.1–21.
- Nan, Y. et al., 2014. Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *Journal of virology*, 88(20), pp.11924–11932.
- Navaneethan, U., Mohajer, A.I. M. & Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver International*, 28(9), pp.1190–1199.
- Nelson, K.E., Labrique, A.B. & Kmush, B.L., 2018. Epidemiology of Genotype 1 and 2 Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(6), pii: a031732.
- Neumann, G., Castrucci, M.R. & Kawaoka, Y., 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *Journal of virology*, 71(12), pp.9690–9700.
- Nguema-Ona, E. et al., 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science*, 5 (499), pp1–12.
- Nguyen Ba, A.N. et al., 2009. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, 10(1), pp.202–12.

- Nguyen, H.T. et al., 2012. 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. *Journal of General Virology*, 93(Pt 3), pp.526–530.
- Nimgaonkar, I. et al., 2018. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(2), pp.96–110.
- Ojha, N.K. & Lole, K.S., 2016. Hepatitis E virus ORF1 encoded macro domain protein interacts with light chain subunit of human ferritin and inhibits its secretion. *Molecular and cellular biochemistry*, 417(1-2), pp.75–85.
- Okamoto, H., 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *Journal of gastroenterology*, 48(2), pp.147–158.
- Oshiro, Y. et al., 2014. Mode of swine hepatitis E virus infection and replication in primary human hepatocytes. *Journal of General Virology*, 95(Pt 12), pp.2677–2682.
- Paliwal, D. et al., 2014. Hepatitis E virus (HEV) protease: a chymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein. *Journal of General Virology*, 95(Pt 8), pp.1689–1700.
- Panda, S.K. et al., 1989. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: recovery of virus-like particles from an epidemic in south Delhi and transmission studies in rhesus monkeys. *Hepatology*, 10(4), pp.466–472.
- Panda, S.K. et al., 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *Journal of virology*, 74(5), pp.2430–2437.
- Park, S.B., 2012. Hepatitis E vaccine debuts. *Nature*, 491(7422), pp.21–22.
- Parvez, M.K., 2017. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “Y-domain”: Effects on RNA replication and virion infectivity. *World journal of gastroenterology*, 23(4), pp.590–602.
- Patra, S. et al., 2007. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Annals of internal medicine*, 147(1), pp.28–33.
- Pavio, N., Merbah, T. & Thébault, A., 2014. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), pp.1925–1927.
- Perwitasari, O. et al., 2016. Antiviral Efficacy of Verdinexor In Vivo in Two Animal Models of Influenza A Virus Infection. *Plos one*, 11(11), p.e0167221.
- Pérez-Gracia, M.T., Suay-García, B. & Mateos-Lindemann, M.L., 2017. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Reviews in medical virology*, 27(3), e1929.
- Péron, J.M. et al., 2007. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(5), pp.298–303.
- Pischke, S. et al., 2017. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *Journal of hepatology*, 66(5), pp.1082–1095.

- Pischke, S. et al., 2013. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. *Liver International*, 33(5), pp.722–726.
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology*, 5(5), pp.375–386.
- Poenisch, M. et al., 2015. Identification of HNRNPK as regulator of hepatitis C virus particle production. *PLOS Pathogens*, 11(1), p.e1004573.
- Pourbaix, A. et al., 2017. Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transplant infectious disease*, 19(1), e12624.
- Prabhu, S.B. et al., 2011. Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *Journal of Viral Hepatitis*, 18(8), pp.587–594.
- Protzer, U. et al., 2015. Molecular detection of hepatitis E virus (HEV) in liver biopsies after liver transplantation. *Modern pathology, Inc*, 28(4), pp.523–532.
- Proudfoot, A. et al., 2019. First Crystal Structure of a Non-Structural Hepatitis E Viral Protein Identifies a Putative Novel Zinc-Binding Protein. *Journal of virology*. 93(13), pii: e00170-19.
- Prusty, B.K. et al., 2007. Selective suppression of NF-kBp65 in hepatitis virus-infected pregnant women manifesting severe liver damage and high mortality. *Molecular medicine*, 13(9-10), pp.518–526.
- Pujhari, S.K. et al., 2010. Phylogenetic analysis and subtyping of acute and fulminant strains of hepatitis E virus isolates of North India with reference to disease severity. *Archives of virology*, 155(9), pp.1483–1486.
- Purcell, R.H. et al., 2003. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*, 21(19-20), pp.2607–2615.
- Purdy, M.A. et al., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *Journal of General Virology*, 98(11), pp.2645–2646.
- Ramachandran, J. et al., 2004. Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 19(2), pp.134–138.
- Rasche, A. et al., 2016. Hepatitis E Virus Infection in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), pp.1249–1252.
- Reid, A.H. & Taubenberger, J.K., 2003. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *The Journal of general virology*, 84(Pt 9), pp.2285–2292.
- Rein, D.B. et al., 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, 55(4), pp.988–997.
- Renou, C. et al., 2014. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), pp.1945–1947.

- Reszka, N. et al., 2010. Effect of tunicamycin on the biogenesis of hepatitis C virus glycoproteins. *Acta biochimica Polonica*, 57(4), pp.541–546.
- Reyes, G.R. et al., 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 247(4948), pp.1335–1339.
- Rivero-Juarez, A. et al., 2016. Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. *Clinical infectious diseases*, 62(11), p.1464.
- Robinson, R.A. et al., 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein expression and purification*, 12(1), pp.75–84.
- Rogée, S. et al., 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *The Journal of general virology*, 94(Pt 3), pp.549–558.
- Romanelli, F., Smith, K.M. & Hoven, A.D., 2004. Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. *Current pharmaceutical design*, 10(21), pp.2643–2648.
- Rose, N. et al., 2011. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 34(5), pp.419–427.
- Rowe, C.L. et al., 2016. Nuclear Trafficking of the Rabies Virus Interferon Antagonist P-Protein Is Regulated by an Importin-Binding Nuclear Localization Sequence in the C-Terminal Domain. *PLOS ONE*, 11(3), p.e0150477.
- Sahli, R. et al., 2019. Rabbit HEV in immunosuppressed patients with hepatitis E acquired in Switzerland. *Journal of hepatology*, 70(5), pp.1023–1025.
- Saravanabalaji, S. et al., 2009. Viral load, antibody titers and recombinant open reading frame 2 protein-induced TH1/TH2 cytokines and cellular immune responses in self-limiting and fulminant hepatitis e. *Intervirolgy*, 52(2), pp.78–85.
- Sato, H. et al., 2006. Morbillivirus nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. *Virology*, 352(1), pp.121–130.
- Savarino, A. et al., 2006. New insights into the antiviral effects of chloroquine. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(2), pp.67–69.
- Sayed, I.M. & Meuleman, P., 2017. Murine Tissues of Human Liver Chimeric Mice Are Not Susceptible to Hepatitis E Virus Genotypes 1 and 3. *The Journal of infectious diseases*, 216(7), pp.919–920.
- Sayed, I.M. et al., 2019. Study of hepatitis E virus ORF2 antigen kinetics in human-liver chimeric mice and its impact on HEV diagnosis. *The Journal of infectious diseases*, pii: jiz171.
- Sayed, I.M., Foquet, L., et al., 2017. Transmission of hepatitis E virus infection to human-liver chimeric FRG mice using patient plasma. *Antiviral research*, 141, pp.150–154.

- Sayed, I.M., Verhoye, L., et al., 2017. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut*, 66(5), pp.920–929.
- Schlesinger, S., Malfer, C. & Schlesinger, M.J., 1984. The formation of vesicular stomatitis virus (San Juan strain) becomes temperature-sensitive when glucose residues are retained on the oligosaccharides of the glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 259(12), pp.7597–7601.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D. & Rice, C.M., 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*, 32, pp.513–545.
- Scott P Kenney, X.-J.M., 2015. Identification and Fine Mapping of Nuclear and Nucleolar Localization Signals within the Human Ribosomal Protein S17. *Plos one*, 10 (4) pp.1–17.
- Scott, H. & Panin, V.M., 2014. The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology*, 24(5), pp.407–417.
- Seidah, N.G., 2011. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods in molecular biology*, 768, pp.23–57.
- Shimata, K. et al., 2018. A Case Report of Living Donor Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Related to Hepatitis E Virus Infection. *Progress in transplantation*, 28(1), pp.91–92.
- Shrestha, M.P. et al., 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *The New England journal of medicine*, 356(9), pp.895–903.
- Shukla, P. et al., 2011. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), pp.2438–2443.
- Shukla, P. et al., 2012. 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(10), pp.5697–5707.
- Singh, N.K. & Gangappa, M., 2007. Acute immune thrombocytopenia associated with hepatitis E in an adult. *American journal of hematology*, 82(10), pp.942–943.
- Skehel, J.J. & Wiley, D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69, pp.531–569.
- Smith, D.B. & Simmonds, P., 2015. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis--a virus or host-specific pathology? *Liver International*, 35(4), pp.1334–1340.
- Smith, D.B. et al., 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology*, 95(Pt_10), pp.2223–2232.
- Sood, A., Midha, V. & Sood, N., 2000. Guillain-Barré syndrome with acute hepatitis E. *The American journal of gastroenterology*, 95(12), pp.3667–3668.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R. & Ovchinnikov, L.P., 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 72(13), pp.1439–1457.

- Sridhar, S. et al., 2018. Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), pp.2241–2250.
- Srivastava, R. et al., 2011. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 26(2), pp.306–311.
- Srivastava, R. et al., 2008. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(12), pp.910–916.
- Su, Y.-Y. et al., 2017. Persistence of antibodies acquired by natural hepatitis E virus infection and effects of vaccination. *Clinical microbiology and infection*, 23(5), pp.336.e1–336.e4.
- Sun, Q. et al., 2016. Inhibiting cancer cell hallmark features through nuclear export inhibition. *Signal transduction and targeted therapy*, 1, 6010, pp.1–10.
- Suneetha, P.V. et al., 2012. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*, 55(3), pp.695–708.
- Surjit, M. et al., 2006. Enhanced alpha1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *The Journal of biological chemistry*, 281(12), pp.8135–8142.
- Surjit, M., Jameel, S. & Lal, S.K., 2007. Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Journal of virology*, 81(7), pp.3339–3345.
- Surjit, M., Jameel, S. & Lal, S.K., 2004. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *Journal of virology*, 78(1), pp.320–328.
- Surjit, M., Varshney, B. & Lal, S.K., 2012. 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 Biochemistry*, 13(7), pp.1–10.
- Suzuki, R. et al., 2005. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*, 79(2), pp.1271–1281.
- Syedbasha, M. & Egli, A., 2017. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Frontiers in immunology*, 8 (119), pp.1-13.
- Szabo, K. et al., 2015. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *International Journal of Food Microbiology*, 215, pp.149–156.
- Takahashi, K. et al., 2009. Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), pp.704–709.
- Takahashi, M. et al., 2014. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus research*, 180, pp.59–69.

- Takahashi, S. et al., 1993. A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(2), pp.1019–1026.
- Takayama, I. et al., 2012. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424(1), pp.45–55.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews*, 227(1), pp.75–86.
- Tam, A.W. et al., 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology*, 238(1), pp.94–102.
- Tamura, A. et al., 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology research*, 37(2), pp.113–120.
- Tanaka, T. et al., 2009. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp.1906–1910.
- Tanaka, T. et al., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *The Journal of general virology*, 88(Pt 3), pp.903–911.
- Tang, X. et al., 2011. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp.10266–10271.
- Tei, S. et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362(9381), pp.371–373.
- Tian, Y. et al., 2017. Systematic identification of hepatitis E virus ORF2 interactome reveals that TMEM134 engages in ORF2-mediated NF- κ B pathway. *Virus research*, 228, pp.102–108.
- Ticehurst, J. et al., 1992. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 165(5), pp.835–845.
- Todesco, E. et al., 2018. Chronic hepatitis E in a heart transplant patient: sofosbuvir and ribavirin regimen not fully effective. *Antiviral therapy*, 23(5), pp.463–465.
- Todt, D. et al., 2016. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut*, 65(10), pp.1733–1743.
- Todt, D. et al., 2018. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral research*, 157, pp.151–158.
- Tsarev, S.A. et al., 1995. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *The Journal of infectious diseases*, 172(1), pp.31–37.

- Tsarev, S.A. et al., 1994. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), pp.10198–10202.
- Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y. & Nakamura, K., 2002. Role of overlapping glycosylation sequons in antigenic properties, intracellular transport and biological activities of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin. *The Journal of general virology*, 83(Pt 12), pp.3067–3074.
- Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Li, Z.-N., et al., 2002. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *The Journal of general virology*, 83(Pt 5), pp.1137–1146.
- Turner, J.G., Dawson, J. & Sullivan, D.M., 2012. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(8), pp.1021–1032.
- Tyagi, S. et al., 2002. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *The Journal of biological chemistry*, 277(25), pp.22759–22767.
- van de Garde, M.D.B. et al., 2016. Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. *Journal of virology*, 90(9), pp.4394–4401.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Hart, G.W., et al., 2017. N-Glycans. 2017. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 9. doi: 10.1101/glycobiology.3e.009.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., et al., 2017. Bacterial and Viral Infections. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 42. DOI: 10.1101/glycobiology.3e.042.
- Vercouter, A.-S. et al., 2018. Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *International Journal of Food Microbiology*, 281, pp.54–59.
- Vigerust, D.J. & Shepherd, V.L., 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*, 15(5), pp.211–218.
- Vogl, D.T. et al., 2018. Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology*, 36(9), pp.859–866.
- Voss, M., Schröder, B. & Fluhrer, R., 2013. Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(12), pp.2828–39.
- Wagner, R. et al., 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *Journal of virology*, 74(14), pp.6316–6323.

- Wagstaff, K.M. et al., 2011. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *Journal of biomolecular screening*, 16(2), pp.192–200.
- Wagstaff, K.M. et al., 2012. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*, 443(3), pp.851–856.
- Wang, L. et al., 2017. Experimental infection of rabbits with genotype 3 hepatitis E virus produced both chronicity and kidney injury. *Gut*, 66(3), pp.561–562.
- Wang, S. et al., 2013. Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. *Virus research*, 176(1-2), pp.101–106.
- Wang, W., Hakim, M.S., et al., 2016. Distinct Antiviral Potency of Sofosbuvir Against Hepatitis C and E Viruses. *Gastroenterology*, 151(6), pp.1251–1253.
- Wang, W., Xu, L., et al., 2016. Convergent Transcription of Interferon-stimulated Genes by TNF- α and IFN- α Augments Antiviral Activity against HCV and HEV. *Scientific reports*, 6, p.25482.
- Wawrzynowicz-Syczewska, M., 2002. [Ribavirin--pharmacological features, antiviral effects against hepatitis C virus (HCV) and other viruses and side effects during treatment]. *Przegląd epidemiologiczny*, 56 Suppl 5, pp.35–40.
- Wei, X. et al., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), pp.307–312.
- Wen, J. et al., 2016. Immunogenicity difference between two hepatitis E vaccines derived from genotype 1 and 4. *Antiviral research*, 128, pp.36–42.
- Wente, S.R. & Rout, M.P., 2010. The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), pp.a000562–a000562.
- Wijdicks, E.F.M. & Klein, C.J., 2017. Guillain-Barré Syndrome. *Mayo Clinic proceedings*, 92(3), pp.467–479.
- Williams, T.P. et al., 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), pp.3040–3046.
- Woo, P.C.Y. et al., 2016. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), pp.2219–2221.
- Woo, P.C.Y. et al., 2014. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), pp.1044–1048.
- Wu, J. & Chen, Z.J., 2014. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual review of immunology*, 32, pp.461–488.
- Wulan, W.N. et al., 2015. Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. *Frontiers in Microbiology*, 6 (553), pp.1–10.

- Wyss, D.F. & Wagner, G., 1996. The structural role of sugars in glycoproteins. *Current opinion in biotechnology*, 7(4), pp.409–416.
- Xia, J. et al., 2015. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *Journal of Viral Hepatitis*, 22(10), pp.850–857.
- Xia, M. et al., 2016. Development and evaluation of two subunit vaccine candidates containing antigens of hepatitis E virus, rotavirus, and astrovirus. *Scientific reports*, pp.1–12.
- Xing, L. et al., 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), pp.33175–33183.
- Yamada, K. et al., 2009. Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *The Journal of general virology*, 90(Pt 2), pp.457–462.
- Yamashita, T. et al., 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp.12986–12991.
- Yarborough, M.L. et al., 2013. Viral Subversion of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Traffic*, 15(2), pp.127–140.
- Yazaki, Y. et al., 2003. 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. *The Journal of general virology*, 84(Pt 9), pp.2351–2357.
- Yin, X. et al., 2016. Distinct entry mechanisms for non-enveloped and quasi-enveloped hepatitis E virus. *Journal of virology*, pp.JVI.02804–15.
- Yin, X. et al., 2018. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), pp.4773–4778.
- Yu, C. et al., 2010. Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *Journal of virology*, 84(21), pp.11264–11278.
- Yu, W. et al., 2018. Successful infection of BALB/c mice by a swine hepatitis E virus clone constructed with reverse genetics. *BMC infectious diseases*, 18(687), pp.1-10.
- Yugo, D.M. et al., 2019. Evidence for an unknown agent antigenically related to the hepatitis E virus in dairy cows in the United States. *Journal of Medical Virology*, 91(4), pp.677–686.
- Zafrullah, M. et al., 1999. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *Journal of virology*, 73(5), pp.4074–4082.
- Zafrullah, M. et al., 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of virology*, 71(12), pp.9045–9053.

- Zhang, H.-Y. et al., 2011. Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Virus research*, 158(1-2), pp.289–293.
- Zhang, J. et al., 2014. Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity. *Clinical microbiology and infection*, 20(6), pp.O397–405.
- Zhang, L. et al., 2016. Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2. *Journal of Medical Virology*, 88(12), pp.2186–2195.
- Zhang, M. et al., 2002. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *Vaccine*, 20(27-28), pp.3285–3291.
- Zhang, S. et al., 2018. Conservation and variation of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein. *Gene*, 675, pp.157–164.
- Zhou, X. et al., 2016. Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(4), pp.294–304.
- Zhou, X. et al., 2017. Hepatitis E Virus Infects Neurons and Brains. *The Journal of infectious diseases*, 215(8), pp.1197–1206.
- Zhu, F.-C. et al., 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*; 376, pp.895–902.