



**HAL**  
open science

# Le virus de l'hépatite E, caractérisation de ses usines virales et de sa réplicase

Cyrine Bentaleb

► **To cite this version:**

Cyrine Bentaleb. Le virus de l'hépatite E, caractérisation de ses usines virales et de sa réplicase. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS010 . tel-03923067

**HAL Id: tel-03923067**

**<https://theses.hal.science/tel-03923067>**

Submitted on 4 Jan 2023

**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'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de :

**Docteur de l'université de Lille**

## **Le virus de l'hépatite E : caractérisation de ses usines virales et de sa réplicase**

Sous la supervision de  
**Dr. Laurence Cocquerel**

Et sous la codirection de  
**Dr. Cécile-Marie Aliouat-Denis**

Rédigée et soutenue par  
**Cyrine Bentaleb**  
Le 24 Janvier 2022

### **Composition du jury :**

Pr. Anne Murh-Tailleux  
Pr. Emmanuelle Blanchard  
Dr. Stéphane Bressanelli  
Dr. Annette Martin  
Dr. Laurence Cocquerel  
Dr. Cécile-Marie Aliouat-Denis

Présidente  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examinateur  
Dir. de thèse  
Co-dir de thèse



## Dédicace

Je dédie ma thèse à ma mère en signe de reconnaissance.

« On n'est jamais si bien servi que par sa mère »

Jacques Pater

## **Remerciements**

Jean, je te remercie de m'avoir acceptée dans ton laboratoire. Tes idées et conseils m'ont permis d'améliorer mon projet de thèse. Merci de m'avoir permis d'effectuer mes travaux de thèse dans les meilleures conditions possibles.

Laurence, merci d'avoir été ma directrice de thèse. Tu es toujours rassurante, confiante, disponible et surtout à l'écoute de mes innombrables demandes. Tu as cru en moi, tu m'as permis d'atteindre mes objectifs, tu m'as toujours encouragée et tu m'as toujours poussée pour le meilleur. Je t'en serai toujours reconnaissante. Merci de m'avoir transmis tes connaissances, ta rigueur et surtout tes astuces. Tu m'as fait l'honneur de m'accueillir dans ton équipe.

Cécile-Marie, merci d'avoir été ma co-encadrante. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour ta grande chaleur humaine. Tu as été à l'écoute de mes nombreuses questions et tu t'es intéressée à l'avancée de mes travaux. Notre contact a d'ailleurs été très enrichissant à la fois au niveau humain ainsi qu'au niveau de mon projet de thèse.

Je remercie Anne Murh-Tailleux et Annette Martin qui ont fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils scientifiques et vos critiques constructives ont contribué fortement à améliorer mon projet.

J'exprime ma gratitude à tous les autres membres de mon jury de thèse : Emmanuelle Blanchard et Stéphane Bressanelli d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Philippe, merci de m'avoir acceptée plusieurs fois dans ta plateforme de microscopie électronique, de ta disponibilité, de ton accueil chaleureux et tes conseils qui m'ont permis de me poser beaucoup de questions et ainsi d'avancer dans mon projet de thèse.

Julien, merci pour tout ton travail et tes expertises en microscopie électronique. Merci pour tous les moments partagés ensemble. Je tiens à te remercier pour toutes les remarques et discussions constructives.

Karoline, merci de m'avoir accompagnée dans ce projet plus complexe que prévu, toujours avec sourire et bonne humeur. Tu es ma confidente. J'ai partagé avec toi toutes mes pensées. Merci pour tout Kari.

Kévin, merci pour ta participation aux discussions de fond et tes nombreuses suggestions éclairées.

Claire, merci de m'avoir appris plusieurs techniques quand j'ai commencé mon stage avec toi. Merci pour tes conseils, tes critiques constructives, ta sympathie et ta bonne humeur. Merci de m'avoir invitée chez toi plusieurs fois pour ne pas être seule pendant les fêtes.

Virginie, merci pour ta bienveillance et ta sympathie. Grâce à toi, j'ai découvert la gastronomie et la culture française. Tu as passé beaucoup de temps à m'expliquer plein de trucs avec patience et délicatesse. Tu as également participé dans l'ensemble de mon projet de thèse.

Charline, merci à toi d'être une amie avec qui j'ai partagé beaucoup de moments. Tu m'avais accompagnée dans toutes les visites d'appartement. Une amie de grande qualité sur qui compter. Je te souhaite une bonne continuation dans ta vie professionnelle ainsi que dans ta vie personnelle.

Martin, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse pendant ces trois années de thèse.

Sur un plan plus personnel, je n'oublie pas Esther et Imelda qui ont rendu l'ambiance de travail au quotidien si agréable. Je vous remercie toutes les deux pour votre support, votre aide et pour vos messages d'encouragement durant les périodes difficiles de ma thèse.

Yves, tes conseils scientifiques et tes conseils m'ont permis d'avancer. Merci également pour ta sympathie et ta bonne humeur.

Coline, merci pour tes corrections enrichissantes de ma thèse. Je te souhaite un bon déroulement dans ton projet de recherche et beaucoup de bonheur dans ta vie.

Sophana, merci pour ta sympathie et tes conseils.

Nathalie, Peggy, Anne, Muriel, Lowiese, Adeline, Dylan, Thomas, Malak, Sandrine et Karin, merci de votre bonne humeur, votre sympathie et votre collaboration dans le laboratoire.

Rehab, Maliki et Thibaut, merci pour votre bonne collaboration et pour votre sympathie. Je vous souhaite plein de bonheur dans vos vies.

Jamil, mon ami, mon chéri et mon mari. Tu as appris à connaître mes défauts et mes qualités au fil des années. Malgré les obstacles que la vie a mis sur mon chemin et sur le tien, tu es toujours resté à mes côtés pour me soutenir et me pousser vers le meilleur. Même quand tout va mal, tu arrives toujours à me faire rire. Tu es le seul à pouvoir le faire et je t'en remercie mille fois. Tu es ma stabilité et mon éternité. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et pour toute ma famille.

Ma mère Zénab, mon amour pour toi peut être difficilement exprimé avec des mots. J'ai un énorme respect pour toi et pour tout ce que tu as fait pour nous. Tu m'as toujours supportée, poussée à progresser et tu m'as aimée telle que je suis. Ta présence, tes encouragements et ton soutien constituent pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis.

Mon père Néji, tu as toujours fait en sorte que je m'épanouisse dans ma vie. Tu as toujours été là pour me guider dans la bonne direction.

Mon frère Hamdi, mon ami, mon confident et mon complice. Tu représentes beaucoup pour moi.

Mon frère Monem, mon petit frère, si gentil et si marrant. Tu comptes beaucoup pour moi, je ne te le montre peut-être pas assez, mais je le pense tout au fond de mon cœur.

A toute ma grande famille, merci d'être là, et de ne jamais m'avoir lâchée et de croire toujours en moi.

Ma belle-famille, merci pour toutes les petites intentions à mon égard et envers ma famille.

## Résumé

Le virus de l'hépatite E (HEV) représente la première cause d'hépatite aiguë dans le monde. Certains aspects fondamentaux de son cycle infectieux ont été dévoilés ces dernières années grâce au développement d'outils d'étude. Notamment, au laboratoire, nous avons mis en place un système efficace de culture cellulaire du HEV.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser les usines virales du HEV en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid ORF2, générés par notre laboratoire. La caractérisation de ces anticorps a montré leur fonctionnalité dans différentes approches expérimentales. De manière importante, ces anticorps anti-ORF2 ont permis de visualiser pour la première fois en microscopie électronique et confocale des structures induites spécifiquement par le HEV. C'est ainsi que nous avons pu identifier un site cellulaire enrichi en membranes cellulaires et en protéines virales, qui est probablement impliqué dans l'acquisition de l'enveloppe autour des particules virales HEV néosynthétisées. Ces résultats ont été validés par des études fonctionnelles en utilisant l'interférence par l'ARN. Nos analyses ont ainsi montré qu'une infection par le HEV s'accompagne d'un détournement du compartiment endosomal de recyclage (ERC) de la cellule hôte. L'ERC servirait d'usine virale pour le HEV.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons caractérisé la réplicase ORF1 du HEV par différentes approches, et cherché à définir si celle-ci subissait une maturation dans la cellule hôte. Pour cela, du fait de l'absence d'anticorps permettant de détecter la réplicase dans les systèmes réplicatifs, nous avons inséré différents épitopes dans l'ORF1. L'impact de l'insertion d'épitopes sur l'efficacité de réplication a été mesuré et les constructions pour lesquelles la réplication n'était pas affectée ont été sélectionnées. C'est ainsi que nous avons pu détecter l'ORF1, suivre son expression au cours du temps, sa maturation et ceci dans trois systèmes d'expression différents : un système infectieux, un système de réplicon (unité autonome de réplication) et un système d'expression hétérologue. De même, la localisation subcellulaire de l'ORF1 a été caractérisée en détails en utilisant différentes approches expérimentales. Au cours de ce projet, une nouvelle technologie appelée RNAscope permettant d'étudier la distribution des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV a été mise en place. En utilisant des approches de microscopie électronique, nous avons également cherché à définir si, comme d'autres virus à ARN, le HEV induisait des remaniements membranaires dans la cellule infectée.

En conclusion, mes travaux de thèse ont apporté de nombreuses connaissances nouvelles sur la réplicase virale et les interactions du HEV avec la cellule hôte.

**Mots clés :** virus de l'hépatite E, protéines ORF1 et ORF2, usines virales, compartiment endosomal de recyclage

## **Abstract**

Hepatitis E virus (HEV) is the leading cause of acute hepatitis in the world. Some fundamental aspects of its lifecycle have been revealed in recent years thanks to the development of study tools. In particular, in the laboratory, we have set up an efficient cell culture system for HEV.

The first part of my thesis work consisted in characterizing the HEV viral factories using monoclonal antibodies directed against the ORF2 capsid protein, generated by our laboratory. The characterization of these antibodies showed their functionality in different experimental approaches. Importantly, these anti-ORF2 antibodies allowed to visualize, for the first time, in electron and confocal microscopy, structures specifically induced by HEV. Thus, we were able to identify a cellular site enriched in cell membranes and viral proteins, which is probably involved in the acquisition of the envelope around the neosynthesized HEV viral particles. These results were validated by functional studies using RNA interference. Our analyses showed that HEV infection is accompanied by a hijacking of the endosomal recycling compartment (ERC) of the host cell. The ERC would serve as a viral factory for HEV.

In the second part of my thesis, we characterized the HEV ORF1 replicase by different approaches, and tried to define whether it underwent maturation in the host cell. For this purpose, due to the absence of antibodies allowing the detection of the replicase in replicative systems, we inserted different epitopes in the ORF1. The impact of epitope insertion on replication efficiency was measured and the constructs for which replication was not affected were selected. Thus, we were able to detect ORF1, follow its expression over time, and its maturation in three different expression systems: an infectious system, a replicon system (autonomous replication unit) and a heterologous expression system. Also, the subcellular localization of ORF1 was characterized in detail using different experimental approaches. During this project, a new technology called RNAscope to study the distribution of HEV genomic and subgenomic RNAs was developed. Using electron microscopy approaches, we also sought to define whether, like other RNA viruses, HEV induced membrane remodeling in the infected cell.

In conclusion, my thesis work has provided many new insights into viral replicase and HEV interactions with the host cell.

**Key words:** Hepatitis E virus, ORF1 and ORF2 proteins, viral factories, endosomal recycling compartment

## Liste des abréviations

<b>aa</b>	Acide aminé
<b>ARM</b>	Motif de 5 aa riche en arginine
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARN sb (+)</b>	Virus à ARN simple brin de polarité positive
<b>COPI</b>	Protéine coatomère de type I
<b>COPII</b>	Protéine coatomère de type II
<b>CPVs</b>	Vacuoles cytopathiques
<b>CV</b>	Vésicules contiguës
<b>CVB3</b>	Virus coxsackie B3
<b>DENV</b>	Virus de la Dengue
<b>DMVs</b>	Vésicules à double membrane
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ERC</b>	Compartiment endosomal de recyclage
<b>ERGIC</b>	Compartiment intermédiaire ER-Golgi
<b>FAPP2</b>	Protéine adaptatrice à quatre phosphate
<b>FHV</b>	Flock House Virus
<b>GTP</b>	Groupement guanosine triphosphate
<b>HCV</b>	Virus de l'hépatite C
<b>Hel</b>	Hélicase
<b>HepG2</b>	Lignée cellulaire issue d'hépatome humain
<b>HEV</b>	Virus de l'hépatite E
<b>HEV-1</b>	HEV de génotype 1
<b>HEV-2</b>	HEV de génotype 2
<b>HEV-3</b>	HEV de génotype 3
<b>HEV-4</b>	HEV de génotype 4
<b>HEV-5</b>	HEV de génotype 5
<b>HIV</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>HVR</b>	Région hypervariable de l'ORF1
<b>IFIT1</b>	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IgA</b>	Immunoglobulines de type A
<b>IgG</b>	Immunoglobulines de type G
<b>IgM</b>	Immunoglobulines de type M
<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factor
<b>LAMP</b>	Amplification Isotherme Médiée par les Boucles
<b>MDA5</b>	Melanoma Differentiation Associated Gene 5
<b>Met</b>	Domaine méthyl-transférase
<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>MVB</b>	Multivesicular bodies
<b>NA</b>	Névralgie amyotrophiante
<b>NCR</b>	Régions non codantes
<b>NF-kB</b>	Nuclear Factor-kappa B
<b>NLS</b>	Signal de localisation nucléaire
<b>NS</b>	Protéine virale non structurale
<b>NS5A</b>	Protéine non structurale 5A du HCV

<b>NS5B</b>	Protéine non structurale 5B du HCV
<b>ORF1</b>	Open-Reading Frame
<b>ORF1</b>	Polyprotéine non structurale de HEV
<b>ORF2</b>	Protéine de capsid de HEV
<b>ORF3</b>	Phosphoprotéine de HEV
<b>ORF4</b>	Protéine virale codée par un quatrième cadre ouvert de lecture du génome de HEV
<b>PCP</b>	Domaine papaine-like cystéine protéase
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>PS</b>	Peptide signal
<b>PV</b>	Poliovirus
<b>RdRp</b>	ARN polymérase ARN-dépendante
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RIG-I</b>	Retinoic acid-Inducible Gene I
<b>RUBV</b>	Virus de la rubéole
<b>SARS-CoV</b>	Virus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère
<b>SARS-CoV2</b>	Virus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère 2
<b>SMV</b>	Vésicules à simple membrane
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>TSG101</b>	Gène de sensibilité aux tumeurs 101
<b>VF</b>	Viral factories

## Liste des figures

<i>Figure 1: Arbre phylogénétique basé sur les séquences de génomes complets disponibles du HEV.</i>	19
<i>Figure 2: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV dans la population humaine.</i>	20
<i>Figure 3: Transmission des différents génotypes du HEV et leurs hôtes naturels.</i>	21
<i>Figure 4 : Modulation du système immunitaire chez la femme enceinte.</i>	25
<i>Figure 5 : Représentation schématique des différents candidats vaccins dirigés contre le HEV et étudiés dans le cadre d'essais cliniques.</i>	35
<i>Figure 6 : Réponse IFN lors de l'infection par le HEV.</i>	38
<i>Figure 7 : Médiateurs de la réponse humorale au cours d'une infection par le HEV.</i>	40
<i>Figure 8 : Illustration schématique des différents modèles animaux les plus couramment utilisés dans l'étude du HEV.</i>	44
<i>Figure 9 : Organisation génomique du HEV.</i>	46
<i>Figure 10 : Les différents domaines de la protéine ORF1.</i>	47
<i>Figure 11 : Transcription de l'ARN du HEV par RdRp.</i>	54
<i>Figure 12: Représentation schématique des différents domaines de la protéine de capsid du HEV.</i>	60
<i>Figure 13 : Représentation schématique des différentes formes d'ORF2 produites au cours du cycle infectieux du HEV.</i>	60
<i>Figure 14 : Modèle de régulation d'adressage de la protéine ORF2 par l'ARM.</i>	62
<i>Figure 15 : Représentation schématique de la protéine ORF3.</i>	63
<i>Figure 16 : Les éléments cis-régulateurs du HEV et leurs fonctions associées.</i>	66
<i>Figure 17: Cycle infectieux du HEV.</i>	67
<i>Figure 18 : Reconstruction tridimensionnelle des usines virales induites par différents virus à ARN sb (+).</i>	70
<i>Figure 19 : Mécanismes et topologies des courbures membranaires impliqués dans la biogenèse des usines virales.</i>	76
<i>Figure 20 : Mécanisme de l'induction de l'autophagie.</i>	79
<i>Figure 21 : Représentation schématique des rôles de COPI, COPII et de la clathrine dans la voie de sécrétion vésiculaire.</i>	81
<i>Figure 22 : Modification de la composition membranaire des sites de réplication du HCV suite à l'action des protéines de transfert de lipides.</i>	84
<i>Figure 23 : Principe de la technique d'immunomarquage selon Tokuyasu.</i>	86
<i>Figure 24 : Séquence de la protéine ORF2 montrant les différents épitopes cibles des anticorps monoclonaux générés par le laboratoire.</i>	92
<i>Figure 25: Caractérisation des anticorps monoclonaux générés par WB.</i>	100
<i>Figure 26 : Etude de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV en système infectieux par IF.</i>	103
<i>Figure 27: Immunomarquage des cellules PLC3/HEV à l'aide des anticorps anti-ORF2.</i>	105
<i>Figure 28 : Identification de structures tubulaires et vésiculaires viro-induites dans les cellules Huh-7.5/HEV.</i>	106
<i>Figure 29 : Caractérisation de la distribution subcellulaire des protéines virales du HEV.</i>	107
<i>Figure 30 : Détermination de l'implication des protéines virales dans la formation des structures viro-induites par le HEV.</i>	108
<i>Figure 31 : Représentation des différents marqueurs cellulaires utilisés lors de l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i.</i>	110
<i>Figure 32 : Etude de la localisation subcellulaire de la protéine virale ORF2 du HEV par microscopie confocale.</i>	111
<i>Figure 33 : Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec l'anticorps dirigé contre Rab11 (A), CD71 (B) ou MICAL-L1 (C).</i>	113
<i>Figure 34 : Cinétique d'internalisation de la transferrine.</i>	114
<i>Figure 35 : Co-immunomarquage des protéines virales ORF2 et ORF3 avec les marqueurs cellulaires Rab11, CD71 et CD81.</i>	115
<i>Figure 36 : Visualisation des particules du HEV dans les cellules PLC3/HEV.</i>	117

<i>Figure 37: Etude de l'effet du silencing du gène codant pour la GTPase Rab11 sur l'expression des protéines virales et sur la sécrétion des particules virales.</i>	118
<i>Figure 38: Vue globale des voies classiques de recyclage.</i>	127
<i>Figure 39 : Schéma de l'organisation des génomes de la souche p6 Kernow C-1 du HEV génotype 3 (A), du réplicon p6-Gluc (B) et de la polyprotéine ORF1 (C).</i>	131
<i>Figure 40 : Principe de la technique RNAscope®.</i>	138
<i>Figure 41 : Etude de l'efficacité de réplication des réplicons HEV p6-Gluc dans les cellules PLC3 (A) et Huh-7.5 (B) électroporées.</i>	142
<i>Figure 42: Inhibition de l'efficacité de réplication des réplicons p6-GLuc et de la souche p6 infectieuse par le sofosbuvir dans les cellules PLC3 et Huh-7.5.</i>	143
<i>Figure 43: Quantification des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV p6 exprimant l'ORF1 étiquetée ou non avec l'épitope V5.</i>	144
<i>Figure 44: Etude de l'infectivité des HEV étiquetés avec les épitopes V5.</i>	146
<i>Figure 45: Cinétique de l'expression de la protéine ORF1 étiquetée V5 dans différents systèmes d'expression cellulaires.</i>	148
<i>Figure 46: Traitement des cellules exprimant l'ORF1 du HEV par la lactacystine.</i>	149
<i>Figure 47: Analyse par spectrométrie de masse de la réplicase virale du HEV immunoprécipitée avec l'anticorps anti-V5.</i>	151
<i>Figure 48 : Détection de la protéine ORF1 portant l'épitope V5 dans les différentes fractions subcellulaires des différents systèmes de culture.</i>	153
<i>Figure 49: Immunolocalisation de l'ORF1 dans la cellule hôte.</i>	154
<i>Figure 50: Co-immunolocalisation de la réplicase virale avec les protéines virales ORF2 et ORF3 dans la cellule hôte dans le système infectieux et dans le système hétérologue.</i>	156
<i>Figure 51: Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/p6-V1 marquées avec les anticorps anti-V5 et anti-ORF2 (A) ou anti-ORF3 (B).</i>	157
<i>Figure 52: Marquage in situ de l'ARN et des protéines du HEV.</i>	159
<i>Figure 53: Etude de la localisation subcellulaire de la protéine virale ORF1 du HEV avec les marqueurs cellulaires de l'ERC par microscopie confocale.</i>	160
<i>Figure 54: Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec les anticorps dirigés contre l'épitope V5 et CD71 (A) ou Rab11 (B).</i>	161
<i>Figure 55: Schéma des différentes constructions p6-V1/V2/H2-puro-2A-ORF2S.</i>	162
<i>Figure 56: Etude de la localisation subcellulaire en microscopie confocale de l'ORF1 et de l'ORF2 du HEV dans les cellules PLC3 exprimant les réplicons de façon stable.</i>	164
<i>Figure 57 : Vue globale sur le cycle de réplication du HEV.</i>	173

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Données bibliographiques concernant la maturation de l'ORF1. ....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents anticorps utilisés en IF et en EM. ....</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 3: Différents couples d'amorces utilisés pour l'insertion des épitopes dans l'ORF1. ....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau 4: Liste des anticorps primaires utilisés en IF, WB et IP dans le cadre de la caractérisation de la réplicase virale du HEV. ....</i>	<i>136</i>
<i>Tableau 5: Tableau récapitulatif des différentes amorces et sondes utilisées pour la quantification des ARN viraux du HEV. ....</i>	<i>137</i>
<i>Tableau 6: Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse de la réplicase virale de HEV immunoprécipitée avec l'anticorps anti-V5 dans les différents systèmes de culture cellulaire. ....</i>	<i>152</i>

## Table des matières

Dédicace .....	1
Remerciements .....	2
Résumé .....	5
Abstract .....	6
Liste des abréviations.....	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Table des matières .....	12
<b>Introduction générale</b> .....	<b>17</b>
<b>P a r t i e I . L e v i r . u . s . . . . d e . . . l ' h é p a t i t e . . . E . . . ( . H . E . V . ) . .</b>	<b>18</b>
I. Approche historique de l'hépatite E .....	18
II. Classification de virus de l'hépatite E.....	19
III. Epidémiologie descriptive de l'hépatite E chez l'Homme .....	19
1. Répartition géographique des différents géotypes du HEV dans le monde .....	19
2. Situation épidémiologique en France .....	20
3. Modes de transmission .....	21
IV. Manifestations cliniques de l'hépatite E .....	22
1. L'hépatite aiguë.....	23
2. L'hépatite fulminante .....	23
2.1. Dans la population générale.....	23
2.2. Chez la femme enceinte .....	24
3. Forme chronique .....	25
3.1. Manifestations extra-hépatiques .....	26
3.2. Manifestations neurologiques .....	26
3.3. Manifestations rénales.....	27
3.4. Autres manifestations extra-hépatiques.....	28
V. Diagnostic de l'hépatite E.....	29
VI. Traitement.....	30
1. Traitement de l'hépatite E chronique .....	31
2. Traitement de l'hépatite E aiguë.....	31
3. Résistance à la ribavirine.....	32
VII. Prévention générale et vaccination.....	34
1. Prévention générale .....	34
2. Vaccination .....	34
VIII. Réponse immunitaire et échappement par le HEV.....	36

1.	La réponse immunitaire innée .....	36
1.1.	Déroulement de la réponse immunitaire innée.....	37
1.2.	Les stratégies d'échappement du HEV vis-à-vis de la réponse immunitaire innée .....	39
2.	La réponse immunitaire adaptative .....	40
2.1.	Réponse adaptative à médiation humorale .....	40
2.2.	Réponse immunitaire à médiation cellulaire .....	41
IX.	Modèles d'étude du HEV.....	41
1.	Lignées cellulaires.....	41
2.	Les modèles animaux du HEV.....	42
X.	Caractéristiques virologiques du HEV .....	45
1.	Le génome du HEV .....	45
2.	Les protéines virales.....	46
2.1.	La protéine ORF1.....	46
2.1.1.	Organisation génomique de l'ORF1.....	46
2.1.2.	Fonctions des différents domaines de la polyprotéine ORF1 .....	47
2.1.3.	Données sur la maturation de l'ORF1 .....	56
2.2.	La protéine ORF2 .....	59
2.3.	La protéine ORF3 .....	63
2.4.	La protéine ORF4.....	64
2.5.	Les éléments cis-régulateurs .....	64
3.	Cycle de réplication du HEV .....	66
<b>Partie 2 : Remaniements membranaires induits par les virus à ARN simple brin de polarité positive</b>		
.....		<b>69</b>
I.	Description des remaniements membranaires induits par les virus à ARN simple brin de polarité positive.....	69
1.	Les compartiments ciblés par les différentes familles de virus à ARN simple brin de polarité positive .....	69
1.1.	Virus à ARN sb (+) enveloppés.....	71
1.1.1.	La famille des <i>Flaviviridae</i> .....	71
1.1.2.	La famille des <i>Coronaviridae</i> .....	71
1.1.3.	La famille des <i>Togaviridae</i> .....	72
1.2.	Virus à ARN sb (+) non enveloppés : la famille des <i>Picornaviridae</i> .....	73
1.2.1.	Généralités .....	73
1.2.2.	Le PV comme modèle d'étude de la biogenèse des usines virales induites par les différents virus de la famille des <i>Picornaviridae</i> .....	73
2.	Mécanismes de biogenèse des usines virales induites par les virus à ARN sb (+) .....	74
II.	Facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des usines virales.....	77

1.	L'autophagie .....	78	
1.1.	Généralités .....	78	
1.2.	Les autophagosomes comme site de réplication virale des virus à ARN sb (+) .....	80	
1.3.	Implication de l'autophagie lors de l'assemblage des virus à ARN sb (+) .....	80	
2.	Voie de sécrétion.....	80	
2.1.	Généralités .....	80	
2.2.	Implication de GBF1 dans le cycle infectieux des virus à ARN sb (+) .....	81	
3.	Les lipides cellulaires .....	82	
3.1.	Généralités .....	82	
3.2.	Le HCV comme modèle d'étude pour l'implication des lipides cellulaires au cours de la réplication des virus à ARN sb (+) .....	83	
IV.	Techniques d'étude des usines virales .....	85	
	<b>Contexte et objectifs de recherche .....</b>	<b>88</b>	
	<b>Partie I : C a r a c t é r i s a t i o n d e s u s i n e s . . . . . v i r a l e s . . . . .</b>	<b>89</b>	<b>u v i r u s</b>
	<b>Partie II : Caractérisation de la maturation de la réplicase virale.....</b>	<b>90</b>	
	<b>Résultats.....</b>	<b>91</b>	
	<b>Partie I : C a r a c t é r i s a t i o n d e s u s i n e s . . . . . v i r a l e s . . . . .</b>	<b>92</b>	<b>u v i r u s</b>
I.	Contexte scientifique : .....	92	
II.	Matériel et méthodes.....	94	
1.	Culture cellulaire .....	94	
2.	Plasmides et électroporation .....	94	
4.	Immunofluorescence.....	95	
5.	Immunoprécipitation .....	96	
6.	Western blot.....	96	
7.	Analyses en microscopie électronique.....	97	
7.1.	Préparation des cellules pour la microscopie électronique .....	97	
7.2.	L'Immunomarquage selon la technique de Tokuyasu.....	97	
8.	Endocytose de la transferrine .....	97	
9.	Interférence de Rab11.....	98	
10.	Quantification de l'ARN viral .....	98	
11.	Quantification des titres infectieux .....	98	
III.	Résultats obtenus .....	99	
1.	Génération d'anticorps monoclonaux anti-ORF2.....	99	
2.	Caractérisation des anticorps monoclonaux anti-ORF2 .....	99	
2.1.	Caractérisation des anticorps par WB .....	99	
2.2.	Caractérisation des anticorps par immunoprécipitation .....	99	

2.4.	Etude de la capacité des anticorps anti-ORF2 à capturer les particules infectieuses .	101
3.	Etude par IF de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV en système infectieux.....	102
4.	Caractérisation des usines virales induites par le HEV .....	104
4.1.	Identification des usines virales induites par le HEV.....	104
4.2.	Validation des résultats dans un autre système de culture cellulaire .....	106
4.3.	Analyse de la codistribution des deux protéines dans les usines virales .....	107
4.4.	Analyse de l'implication de chacune des protéines virales dans la formation des structures viro-induites .....	108
5.	Etude de la nature des structures membranaires induites par le HEV .....	110
5.1.	Etude par IF des co-marquages de l'ORF2i avec des marqueurs cellulaires .....	110
5.2.	Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution de colocalisation de l'ORF2i avec les marqueurs de l'ERC .....	113
5.3.	Etude de la cinétique d'internalisation de la transferrine .....	113
5.4.	Analyse de la distribution des facteurs cellulaires dans les usines virales.....	115
6.	Visualisation des particules du HEV dans les cellules PLC3/HEV par la microscopie électronique .....	116
7.	Etude de l'implication de la GTPase Rab11 dans le cycle viral de HEV par la technique de l'interférence par l'ARN.....	118
IV.	Conclusion .....	120
V.	Discussion .....	122
	<b>Partie II : Caractérisation de la maturation de la réplicase virale .....</b>	<b>130</b>
I.	Contexte scientifique :.....	130
II.	Matériel et Méthodes .....	133
1.	Lignées cellulaires.....	133
2.	Choix des épitopes et des sites d'insertion dans l'ORF1 .....	133
3.	Mutagenèse dirigée.....	133
4.	Quantification de l'activité luciférase .....	134
5.	Transfection.....	135
6.	Immunofluorescence.....	135
7.	Quantification de l'ARN viral .....	136
8.	Quantification des titres infectieux .....	137
9.	Hybridation <i>in situ</i> pour détecter les ARN viraux.....	137
10.	Western blot.....	138
11.	Immunoprécipitation et analyse par spectrométrie de masse des différentes formes de clivage	139
12.	Génération des cellules exprimant la protéine ORF1 de façon stable .....	140

III.	Résultats .....	141
1.	Etude de l'impact de l'insertion d'épitopes dans la réplicase ORF1 .....	141
1.1.	Choix des épitopes et des sites d'insertion dans l'ORF1 .....	141
1.2.	Etude de l'impact de l'insertion d'épitopes dans l'ORF1 sur la réplication et l'infectivité du HEV141	
1.2.1.	Efficacité de réplication des constructions étiquetées en système réplicon et infectieux .....	141
1.2.2.	Quantification des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV .....	144
1.2.3.	Etude de l'infectivité du HEV exprimant l'ORF1 étiquetée .....	145
2.	Etude de la maturation de la réplicase virale dans différents systèmes d'expression .....	147
2.1.	Cinétique de l'expression de la protéine ORF1 étiquetée V5 dans différents systèmes d'expression cellulaires .....	147
2.2.	Etude de l'effet de l'inhibition du protéasome sur la maturation de la réplicase virale	149
2.3.	Analyse par spectrométrie de masse de la réplicase virale du HEV.....	150
3.	Localisation subcellulaire de la réplicase virale.....	152
3.1.	Détection de la réplicase virale dans les fractions subcellulaires .....	152
3.2.	Immunolocalisation de la réplicase virale dans la cellule hôte .....	154
3.2.1.	Localisation nucléaire et cytoplasmique de la réplicase virale .....	154
3.2.2.	Etude de la co-distribution de l'ORF1 avec les autres protéines virales, ORF2 et ORF3, dans la cellule hôte .....	155
4.	ORF1 et remaniements membranaires .....	162
4.2.	Analyse de l'ultrastructure des cellules électroporées avec le réplicon par microscopie électronique classique.....	165
IV.	Conclusion .....	166
V.	Discussion .....	167
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>172</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>174</b>
	<b>Publication 1: The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for Hepatitis E Virus .....</b>	<b>175</b>
	<b>Publication 2 : Characterization of the hepatitis E virus replicase.....</b>	<b>216</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>262</b>

# **Introduction générale**

# Partie I . L e v i r u s d e l ' h é p a t i t e E ( H E V )

## I. Approche historique de l'hépatite E

En 1978, une épidémie frappait deux cents villages dans la région du Cachemire (Inde) : 52 000 patients ont été atteints de cette maladie ictérique et 1 700 sont morts. Durant cette épidémie, les femmes enceintes ont été les plus touchées (Khuroo et *al.*, 2011). Les analyses sérologiques des échantillons provenant de ces patients n'ayant pas mis en évidence les virus de l'hépatite A ou B, cette nouvelle infection a été nommée : hépatite non-A non-B. D'ailleurs, entre 1955 et 1990, plusieurs épidémies d'hépatites non-A non-B ont été enregistrées dans plusieurs parties du monde. L'eau potable contaminée était considérée comme étant la source de l'infection durant ces épidémies (Kumar et *al.*, 2014).

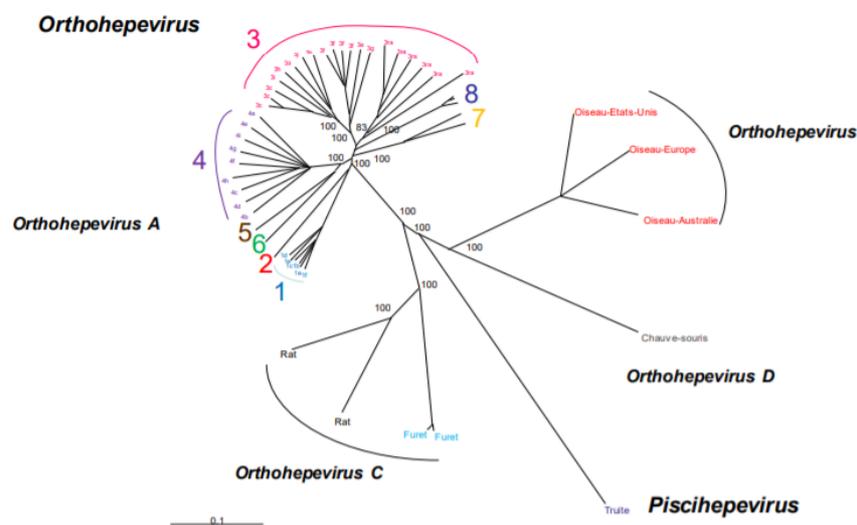
Une dizaine d'années plus tard, le virus responsable des épidémies est décrit pour la première fois par le Dr Balayan (Balayan, 1983). En effet, en 1981, ce dernier a mené une expérience dans laquelle il a ingéré un filtrat de selles provenant de 9 patients ayant présenté des symptômes d'une hépatite non-A non-B sévissant sur un mode épidémique en Afghanistan. Trente-six jours suivant l'ingestion, le Dr Balayan développa une hépatite aiguë et l'analyse de ses propres selles en microscopie électronique révéla la présence de particules mesurant de 27 à 32 nm de diamètre (Balayan, 1983). Le Dr Balayan décrit par la suite l'agent responsable comme étant un virus filtrable et transmissible. Suite à sa découverte, le HEV a été classé dans la famille des *Picornaviridae*. Par la suite, et en se basant sur la morphologie des virions, il a été classé dans la famille des *Calciviridae*. Des analyses phylogénétiques ont permis de rejeter cette classification. Six ans plus tard, Krawczynski et Bradley publient la découverte de l'agent responsable des hépatites non A- non B- de type entérique (Krawczynski & Bradley, 1989). Au début des années 1990, le génome du HEV a été séquencé et le nom de virus de l'hépatite E (E pour Entérique ou Epidémique) lui a été attribué (Reyes et *al.*, 1990). En 2002 et en se basant sur sa structure et son organisation génomique, l'équipe d'Emerson classe le HEV dans la famille des *Hepeviridae* (Panda et *al.*, 2007).

Dans ce premier chapitre, nous présentons en détails les caractéristiques moléculaires et virologiques du HEV.

## II. Classification de virus de l'hépatite E

Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae* qui se compose de trois genres : le genre des *Orthohepevirus*, le genre *Piscihepevirus* (**Fig. 1**) et le genre *Insecthepevirus*. Le virus infectant la truite fardée est le seul représentant du genre *Piscihepevirus* (Smith et al., 2014). Le virus SfHev (*Sogatella furcifera* hepe-like virus), qui infecte la *Sogatella furcifera* (Cicательle à dos blanc), est également le seul représentant du genre *Insecthepevirus* (Wu et al., 2018).

On distingue quatre espèces dans le genre des *Orthohepevirus* : les *Orthohepevirus A* infectent l'Homme et de nombreux animaux (le porc, le cerf, la mangouste, le lapin, le chameau, etc.); les *Orthohepevirus B* infectent uniquement les poulets ; les *Orthohepevirus C* comprennent les souches qui infectent les rongeurs et les furets ; les *Orthohepevirus D* comprennent les souches isolées chez les chauves-souris (Smith et al., 2014).



**Figure 1: Arbre phylogénétique basé sur les séquences de génomes complets disponibles du HEV.**

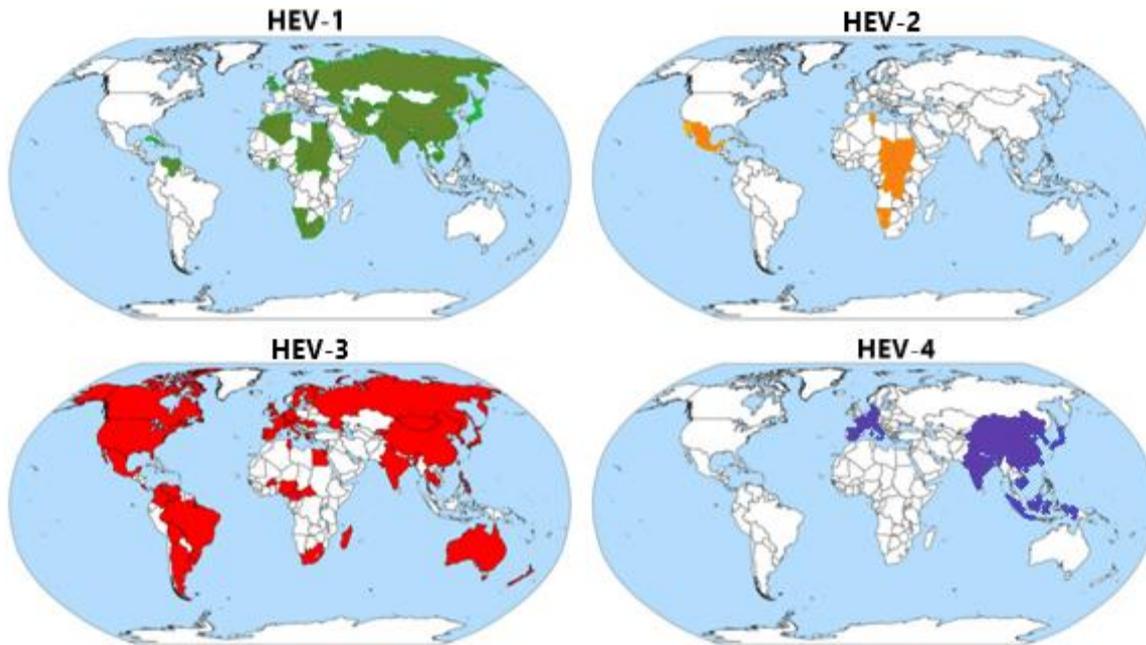
Les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel ClustalW. L'arbre phylogénétique a été obtenu avec la méthode de Neighbor-Joining (Correction de Kimura ou 2 paramètres). L'espèce *Orthohepevirus A* est divisée en 8 génotypes : les génotypes 1 et 2 sont strictement humains tandis que les génotypes 3 à 8 possèdent un réservoir animal. Plusieurs sous-génotypes (désignés par une lettre) ont été décrits pour les génotypes 1 à 4. Adaptée à partir de (Lhomme et al., 2020).

## III. Épidémiologie descriptive de l'hépatite E chez l'Homme

### 1. Répartition géographique des différents génotypes du HEV dans le monde

Le HEV présente une répartition géographique ubiquitaire (**Fig. 2**). Quatre génotypes principaux infectent l'Homme mais on en connaît qu'un seul sérotype. Le génotype 1 (HEV-1) est retrouvé dans de nombreux pays d'Afrique du Nord, d'Afrique du Sud et d'Asie. Ce génotype a été également retrouvé en Russie et en Amérique du Sud. Le génotype 2 (HEV-2) est présent dans certains pays d'Afrique centrale ainsi qu'au Mexique. Le génotype 3 (HEV-3) présente une répartition cosmopolite

et est retrouvé en Australie, dans de nombreux pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique. Le génotype 4 (HEV-4) est quant à lui retrouvé dans certains pays d'Europe et d'Asie (Kumar et *al.*, 2019).



**Figure 2: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV dans la population humaine.** HEV-1 (vert), HEV-2 (orange), HEV-3 (rouge), HEV-4 (violet). Figure adaptée de (Forni et *al.*, 2018).

## 2. Situation épidémiologique en France

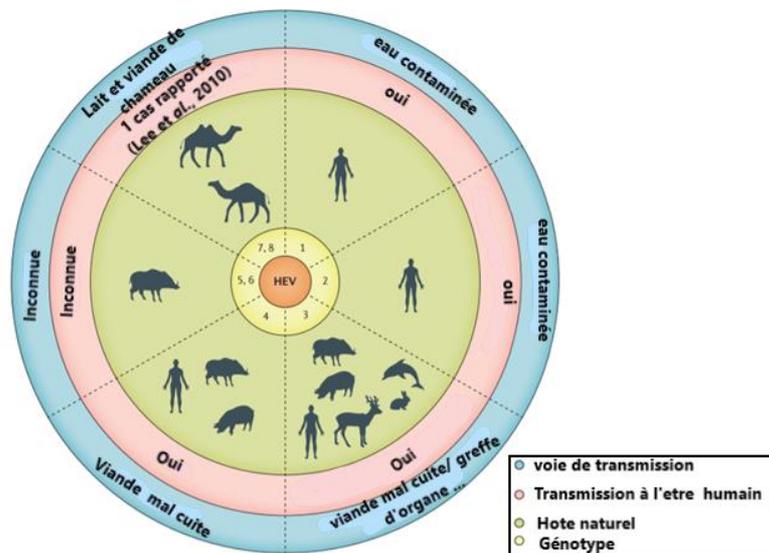
L'analyse phylogénique des isolats de HEV, provenant de patients infectés et retrouvés en Europe/France, a révélé une prédominance du HEV-3f qui représente plus de 59% des cas d'infection (Izopet et *al.*, 2019). C'est la raison pour laquelle nous nous sommes focalisés dans notre projet actuel sur le HEV-3. En France, la région du Sud-Ouest et la Corse représentent les deux régions les plus hyper-endémiques (Mansuy et *al.*, 2016). Lors d'une étude réalisée chez des donneurs de sang de France métropolitaine et d'îles françaises (Guadeloupe, Réunion et Martinique), la séroprévalence du HEV a récemment été estimée à 22,4% (Mansuy et *al.*, 2016). En outre, la séroprévalence chez les donneurs de sang est comprise entre 34 et 52,2% dans les régions du Sud-Ouest du pays (Mansuy et *al.*, 2011 ; Izopet et *al.*, 2015). En revanche, la séroprévalence est moins importante, à savoir de l'ordre de 3,2% dans les Pays de Loire et la région Ile-de-France (Boutrouille et *al.*, 2007). La présence d'acide ribonucléique (ARN) viral a été détectée chez un donneur de sang sur 2218 dans une étude réalisée en 2014 (Gallian et *al.*, 2014) et un donneur sur 744 en 2017 (Abravanel et *al.*, 2018).

En 2017, le nombre de cas rapportés par le Centre National de Référence (CNR) des hépatites à transmission entérique s'élève à 2245 dont 2219 cas d'hépatites E autochtones. D'ailleurs, le nombre total de cas rapportés par le CNR a montré une très forte augmentation durant la période comprise entre 2012 et 2016. En parallèle, le nombre de personnes ayant contracté l'hépatite E et nécessitant

une hospitalisation a augmenté d'une façon remarquable de 57 cas en 2002 à 653 cas en 2016. L'augmentation du taux d'incidence a été attribuée à l'augmentation du nombre de tests diagnostiques réalisés. Le taux d'incidence annuelle d'hospitalisation est de 0,5 par 100 000 habitants en France métropolitaine (Abravanel *et al.*, 2018).

### 3. Modes de transmission

Les différents géotypes du HEV sont transmis par des modes de contamination bien distincts. Les HEV-1 et -2 sont généralement transmis par voie féco-orale en consommant de l'eau contaminée par les fèces des personnes infectées par l'un de ces deux géotypes (**Fig. 3**).



**Figure 3: Transmission des différents géotypes du HEV et leurs hôtes naturels.**

Les HEV-1 et -2 n'infectent que les êtres humains et se transmettent généralement par voie féco-orale suite à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par les fèces des personnes infectées par le HEV. En revanche, les HEV-3 et -4 infectent à la fois les êtres humains et les animaux. Ces deux géotypes présentent plusieurs réservoirs naturels et ont un mode de transmission zoonotique. Ils sont transmis essentiellement à l'être humain par ingestion de viande peu ou mal cuite d'animaux infectés (porc, gibier, lapin, etc.). Les HEV-5 et -6 infectent seulement les sangliers et aucune étude n'a mis en évidence leur transmission à l'être humain. Les dromadaires et les chameaux constituent les réservoirs naturels des HEV-7 et -8. Un seul cas de transmission humaine du HEV-7 a été rapporté chez un patient après ingestion de viande et de lait d'un dromadaire infecté. Adaptée de (Nimgaonkar *et al.*, 2018).

L'eau potable constitue la principale voie de transmission interhumaine des HEV-1 et -2 (Aggarwal & Naik, 2009). Il a été démontré que le HEV pouvait contaminer les eaux de surface entrant ainsi dans la chaîne de consommation alimentaire *via* la contamination des eaux d'irrigation (Vander Poel *et al.*, 2014). Dans les pays en développement, de nombreuses épidémies d'hépatite E ont pu être expliquées par la contamination des eaux comme ce fut le cas lors de l'épidémie ayant eu lieu au Cachemire (Inde) en 1978 (Khuroo *et al.*, 2016). Faute d'un accès limité aux infrastructures d'hygiène et d'eau potable, des épidémies dues aux HEV-1 et -2 ont également été rapportées dans des camps de réfugiés (Akanbi *et al.*, 2019).

Les HEV-3 et -4 sont capables d'infecter à la fois l'être humain et les animaux. Ces deux génotypes se transmettent à l'Homme suite à la consommation de la viande pas ou peu cuite et sont plutôt à l'origine de cas sporadiques ou affectant un petit nombre d'individus (Colson et *al.*, 2010 ; Renou et *al.*, 2014 ; Riveiro-Barciela et *al.*, 2015). Une séroprévalence très élevée du HEV a été décrite dans certains élevages de porc en Europe et en Chine (Meng et *al.*, 1997 ; Salines et *al.*, 2017). D'autres animaux tels que le sanglier, le cerf ou le lapin sont à l'origine de transmissions zoonotiques ; les ovins, les bovins et certains animaux domestiques pourraient aussi être des réservoirs potentiels du virus mais aucun cas d'infection humaine à partir de ces animaux n'a été montré jusqu'à l'heure actuelle (Doceul et *al.*, 2016).

Le HEV a été détecté dans plusieurs produits alimentaires. En 2018, une étude menée en Italie a révélé la présence de l'ARN viral du HEV dans 0,89% des échantillons de mollusques comestibles commercialisés (La Bella et *al.*, 2021). De même, une deuxième étude menée en Italie a suggéré que la consommation de crustacés crus, des saucisses de foie et de viande de sanglier était considérée comme un facteur de risque d'infection à HEV (La Rosa et *al.*, 2018). Ces données mettent en évidence le rôle potentiel des produits alimentaires dans la transmission du HEV, point d'attention d'ailleurs relevé par l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA, BIOHAZ Pnael et *al.*, 2017). Cependant, aucun cas d'infection humaine à partir de fruits de mer n'a été jusqu'alors rapporté. Le HEV a été également détecté dans les Figatelli, qui est une spécialité culinaire du Sud de la France composée principalement de viande et de foie de porc et consommée peu cuite. Cela souligne que la consommation de produits alimentaires contenant du foie de porc cru engendre un risque élevé de transmission alimentaire du HEV (Berto et *al.*, 2013). De même, Doceul et collaborateurs ont révélé la présence de HEV sur des fruits rouges tels que les fraises et les framboises (Doceul et *al.*, 2016).

L'ensemble des études réalisées mettent en évidence que le HEV peut être transmis (i) d'Homme à Homme en consommant de l'eau contaminée par les particules virales excrétées par les patients infectés (**transmission féco-orale**) mais aussi (ii) par ingestion de viande peu cuite ou crue contaminée (**transmission zoonotique**). Cependant, la contribution de l'une ou de l'autre de ces voies de transmission de propagation du HEV lors des épidémies d'hépatite E varie selon les génotypes, la souche virale et les conditions environnementales ne sont pas très bien identifiées (Vander Poel et *al.*, 2014).

#### IV. Manifestations cliniques de l'hépatite E

Dans la plupart des cas, l'infection par le HEV est asymptomatique et spontanément résolutive mais, dans certains cas, l'infection peut évoluer vers un tableau clinique sévère. De plus, il semble que la gravité de l'infection dépende du génotype en cause (Donnelly et *al.*, 2017a).

## **1. L' hépatite aiguë**

La majorité des cas d'hépatite E aiguë est asymptomatique. Néanmoins, certains patients peuvent ressentir des symptômes non spécifiques comme une anorexie, des nausées, une fatigue, des myalgies et une jaunisse (Donnelly et *al.*, 2017a). L'hépatite E aiguë se développe chez 20% des personnes infectées par le HEV-1 et le HEV-2 (Rein et *al.*, 2012). Cependant, elle passe très souvent inaperçue chez les patients infectés par le HEV-3 et le HEV-4 (Haffar et *al.*, 2018). La période d'incubation moyenne de la maladie est de 40 jours (variant de 15 à 60 jours). Lors d'une hépatite aiguë, les examens biologiques révèlent des taux élevés de bilirubine sérique et une augmentation marquée des enzymes hépatiques (Donnelly et *al.*, 2017a).

## **2. L' hépatite fulminante**

### 2.1. Dans la population générale

L'hépatite E fulminante (encore appelée hépatite aiguë grave) débute très souvent comme une hépatite aiguë classique suivie d'une détérioration rapide du patient. En effet, une nécrose massive du parenchyme hépatique empêche le foie d'assurer ses fonctions de synthèse et de détoxification. Cette insuffisance hépatique sévère peut être associée à une dysfonction de la coagulation, des signes neurologiques (encéphalopathie hépatique, coma) et rénaux (insuffisance rénale) (Smith & Simmonds, 2015). Sur le plan biologique, des niveaux élevés de transaminases hépatiques et de prothrombine sont révélateurs de l'hépatite fulminante (Jebblaoui et *al.*, 2013).

Les raisons qui expliquent l'évolution vers l'hépatite fulminante restent encore obscures. Certaines études ont révélé une association particulière de l'hépatite E fulminante avec des géotypes bien spécifiques tels que le HEV-3 (Takahashi et *al.*, 2009), le HEV-1 (Pujhari et *al.*, 2010) et le HEV-4 (Sugawara et *al.*, 2009). En France, l'hépatite E fulminante se trouve généralement associée au HEV-4 (Jebblaoui et *al.*, 2013). Également, une étude menée au Japon a démontré une évolution vers une forme fulminante chez 8,1% des personnes infectées par le HEV-4 et chez 0,8% des personnes infectées par le HEV-3 (Smith & Simmonds, 2015). De même, une autre étude a montré que l'évolution de l'hépatite E vers une forme fulminante chez seulement 0,5% des patients infectés par le HEV-2 (Maila et *al.*, 2003). La synthèse de ces études montre qu'une hépatite E aiguë peut évoluer vers une forme fulminante indépendamment du géotype qui infecte le patient et que les associations rapportées dans ces différentes études peuvent avoir été influencées par la restriction de l'échantillonnage des isolats dans une zone géographique donnée sur une période donnée (Smith & Simmonds, 2015).

Plusieurs équipes ont également suggéré un lien entre le développement d'une hépatite fulminante et certaines mutations particulières dans le génome viral du HEV. D'ailleurs, des substitutions dans les séquences des génomes viraux du HEV-1 (Mishra et *al.*, 2013) et du HEV-4 (Inoue et *al.*, 2009 ; Bu et *al.*, 2012) ont été rapportées en association avec des cas d'hépatite fulminante.

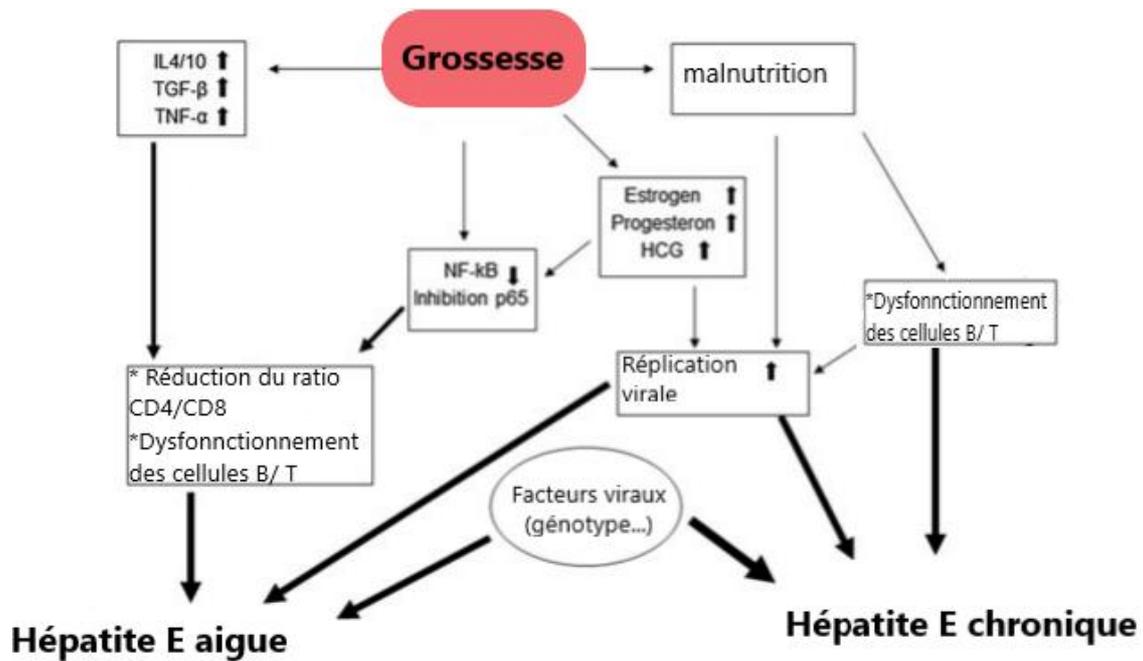
La cause de l'évolution vers une hépatite fulminante reste méconnue mais semble liée à des facteurs intrinsèques de l'hôte tels que la grossesse ou des atteintes hépatiques préexistantes (Smith & Simmonds, 2015).

### 2.2 Chez la femme enceinte

La plupart des cas d'hépatite grave chez la femme enceinte ont été décrits dans des pays en développement, notamment en Asie, où les HEV-1 et -2 prédominent. Néanmoins, quelques cas de contamination par les HEV-3 (Anty et *al.*, 2012) et -4 (Tabatabai et *al.*, 2014) ont été rapportés dans les pays industrialisés. La moitié des cas d'hépatites fulminantes ont lieu au cours du troisième trimestre de grossesse (Chilaka & Konje, 2021). La grande sévérité du HEV-1 sur le plan clinique chez la femme enceinte a été récemment corroborée par l'étude de Gouilly et collaborateurs qui ont montré que le HEV-1 possède une meilleure capacité à se répliquer dans le placenta que le HEV-3 et conduit à une production plus importante de cytokines inflammatoires (Gouilly et *al.*, 2018). Au départ, la présentation de l'hépatite E chez la femme enceinte est similaire à celle d'un patient de la population générale mais la maladie évolue fréquemment vers une hépatite fulminante accompagnée d'éclampsie et d'hémorragie. Ainsi, le taux de létalité chez les femmes enceintes varie entre 15 et 25% (Aggarwal et *al.*, 2000). En outre, l'hépatite E peut induire une rupture de la membrane placentaire, des avortements spontanés et la naissance d'enfants mort-nés observés dans 25% à 56% des cas (Pérez-Gracia et *al.*, 2017).

Durant la grossesse, le système immunitaire maternel est modifié afin que la mère puisse développer une « tolérance » vis-à-vis du fœtus. Cependant, ces changements transitoires, en particulier la diminution de l'immunité cellulaire, affectent la manière dont le système immunitaire maternel réagit face aux agents infectieux (Pérez-Gracia et *al.*, 2017).

La grossesse s'accompagne d'une diminution du ratio de lymphocytes CD4/CD8 (**Fig. 4**) qui se traduit par la diminution des lymphocytes CD4 et une augmentation des lymphocytes CD8 suite à des variations importantes des taux d'hormones notamment la progestérone, les œstrogènes et l'hormone gonadotrope chorionique humaine (Navaneethan et *al.*, 2008). De nombreuses études ont suggéré que l'augmentation de la synthèse de ces hormones avait un effet suppresseur de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. D'autres études ont montré que la grossesse agissait sur la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) en inhibant le facteur de transcription p65 et aussi sur les hormones stéroïdiennes en induisant une dérégulation du système immunitaire (Pérez-Gracia et *al.*, 2017).



**Figure 4 : Modulation du système immunitaire chez la femme enceinte.**

Adaptée à partir de (Pérez-Gracia et al., 2017).

Des facteurs extérieurs, tels que l'état nutritionnel (carences en micronutriments) ou d'autres infections concomitantes peuvent également affecter la réponse immunitaire d'une femme enceinte atteinte par le HEV (Krush et al., 2016 ; Meeusen et al., 2001 ; Jiang et al., 2005). Les facteurs génétiques peuvent également jouer un rôle dans la modulation du système immunitaire maternel pendant la grossesse ce qui pourrait expliquer les différences des taux d'incidence de l'hépatite E et la gravité de l'infection observée (Pérez-Gracia et al., 2017).

### 3. Forme chronique

A partir de 2008, plusieurs cas d'infection par le HEV-3 évoluant vers une hépatite chronique ont été rapportés chez des patients immunodéprimés tels que les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (HIV), de leucémie et les patients sous immunothérapie, corticothérapie ou devant bénéficier d'une greffe d'organe (Ollier et al., 2009 ; Dalton et al., 2009 ; Hoofnagle et al., 2012). Chez les patients greffés, les traitements immunosuppresseurs jouent un rôle important dans l'augmentation de la gravité de l'hépatite E chronique (Donnelly et al., 2017). En 2017, un premier cas d'évolution vers la chronicité suite à une infection par le HEV-4 a également été décrit (Wu et al., 2017). Jusqu'à ce jour, le HEV-1 et le HEV-2 ne semblent pas être associés à la survenue d'hépatite chronique (Donnelly et al., 2017).

L'hépatite E chronique se traduit généralement par une persistance de la réplication du génome viral et des signes d'inflammation hépatique (taux élevés des transaminases) six mois après la fin de la phase aiguë. Le seuil de trois mois est généralement utilisé pour déclarer une chronicité de l'infection :

elle se traduit par une fibrose puis une cirrhose hépatique, qui conduit à une insuffisance hépatique majeure et provoque, par la suite, le décès du patient infecté (Kamar et *al.*, 2013 ; Kamar et *al.*, 2017).

### 3.1. Manifestations extra-hépatiques

De nombreuses études cliniques ont rapporté des manifestations extra-hépatiques (rénales, intestinales, cardiaques, hématologiques, pancréatiques, *etc.*) concomitantes d'une infection par le HEV (Rawla et *al.*, 2020 ; Parvez et Kazim, 2021). Des données reposant sur la description de cas cliniques, des données sérologiques mais aussi des résultats obtenus *in vitro* ou dans des modèles animaux suggèrent que l'infection par le HEV pourrait être à l'origine des symptômes neurologiques, rénaux et pancréatiques (Pischke et *al.*, 2017). Dans une revue récente et systématique de la littérature, Rawla et collaborateurs (2020) ont conclu que les symptômes neurologiques représentaient la forme la plus courante des manifestations extra-hépatiques associées à l'hépatite E (observées chez 54,94% des patients infectés par le HEV) suivies par les manifestations cardiovasculaires et hématologiques (observées chez 34,88% des patients infectés par le HEV). Des troubles gastro-intestinaux et pancréatiques ont également été rapportés dans 7,41% des cas (Rawla et *al.*, 2020 ; Parvez et Kazim, 2021). La physiopathologie de ces manifestations est loin d'être comprise mais des hypothèses sont avancées pour les expliquer : le tropisme et la capacité répliquative de certains variants du HEV dans certains organes (neurotropisme par exemple) ou la sécrétion d'antigènes viraux qui causeraient la formation de complexes immuns et une immunopathologie (Pischke et *al.*, 2017 ; Rawla et *al.*, 2020). De plus, il faut noter que le HEV est capable d'atteindre la circulation sanguine sous forme enveloppée ce qui pourrait faciliter sa dissémination à d'autres organes (Takahashi et *al.*, 2010 ; Nagashima et *al.*, 2014).

### 3.2. Manifestations neurologiques

Les signes neurologiques les plus fréquemment développés par les patients infectés par le HEV sont des troubles périphériques tels que le syndrome de Guillain-Barré, le syndrome de Parsonage-Turner (ou névralgie amyotrophiante) (McClean et *al.*, 2017). Plus rarement, des symptômes affectant le système nerveux central comme la méningoencéphalite ont aussi été décrits lors d'une hépatite E. D'ailleurs, l'ARN viral du HEV a été détecté dans le liquide céphalorachidien de patients infectés souffrant de méningite, de névralgie amyotrophiante et de neuropathie (Fritz et *al.*, 2018 ; Abravanel et *al.*, 2021). En France et en Suisse, des études ont rapporté la présence de troubles neurologiques chez 16,5% et 31% des patients souffrant d'hépatite E (Abravanel et *al.*, 2018 ; Ripellino et *al.*, 2020). En revanche, une étude menée en Chine n'a pas révélé d'association entre l'hépatite E et des troubles neurologiques chez des patients atteints du HEV-4 (Wang et *al.*, 2018a). Ces données suggèrent une association entre le HEV-3 (fréquemment retrouvé en France et en Suisse) et la survenue de manifestations neurologiques contrairement au HEV-4 (fréquemment retrouvé en Chine) (Horvatits &

Pischke, 2018 ; Jha et *al.*, 2021). De même, Dalton et collaborateurs ont illustré la présence de manifestations neurologiques dans le cas d'infection avec le HEV-1 (Dalton et *al.*, 2016).

De nombreuses équipes ont rapporté l'association entre le syndrome de Guillain-Barré SGB et l'infection par le HEV (Fousekis et *al.*, 2020). Le syndrome de Guillain-Barré est une atteinte des nerfs périphériques qui se caractérise par une faiblesse musculaire progressive et un déficit sensoriel . Plusieurs études réalisées aux Pays-Bas, en Belgique et au Japon ont montré des prévalences de ce syndrome de 5 et 8% chez des patients atteints d'hépatite E (Berg et *al.*, 2014 ; Fousekis et *al.*, 2020 ; Stevens et *al.*, 2017).

La névralgie amyotrophiante est un syndrome neurologique causé par une inflammation du plexus brachial et qui se traduit par des crises sévères de neuropathie au niveau des bras et des épaules (Fousekis et *al.*, 2019 ; Dalton et *al.*, 2016). Une étude conduite chez des patients hollandais et anglais a mis en évidence que 11% des patients atteints de névralgie amyotrophiante souffraient d'hépatite E aiguë (Eijk et *al.*, 2017). Dans la majorité des cas de névralgie amyotrophiante associés à l'hépatite E publiés jusqu'alors, on note des atteintes bilatérales du plexus brachial, une association avec une infection par le HEV-3 et une atteinte qui concerne des hommes Européens immunocompétents d'âge moyen (46 ans) (Jha et *al.*, 2021).

Enfin, le HEV est capable d'infecter des lignées neuronales humaines, de se répliquer dans le cerveau des souris et des primates non humains et de franchir la barrière hémato-encéphalique (Drave et *al.*, 2016 ; Abravanel et *al.*, 2021 ; Fritz et *al.*, 2018).

### 3.3. Manifestations rénales

Des troubles rénaux ont été également rapportés lors d'une infection par le HEV tels que la glomérulonéphrite membrano-proliférative et la cryoglobulinémie (Fousekis et *al.*, 2019). La pathogenèse des affections rénales dues au HEV est encore peu connue ; il semble que des dépôts de complexes immuns au niveau glomérulaire en soit la cause, de façon similaire à ce qui est observé pour l'hépatite C (HCV). De plus, la présence de l'ARN viral et d'antigènes du HEV ont été identifiés dans les urines des patients atteints d'hépatite E aiguë et chronique (Geng et *al.*, 2016 ; Marion et *al.*, 2019) mais aussi dans des biopsies rénales de primates ou de lapins infectés par HEV, indiquant que le virus est capable de se répliquer au niveau rénal et peut être potentiellement directement néphrotoxique (Pischke et *al.*, 2017). Ces troubles rénaux sont souvent associés à une infection par le HEV-3 et peu de cas d'atteintes rénales sont observés lors d'infections par le HEV-1 ou le HEV-4 (Nayak et *al.*, 2018; Wang et *al.*, 2018). En France, deux cas de transmission du HEV *via* des greffes de reins provenant du même donneur ont été rapportés posant la question de la recherche systématique du HEV chez les donneurs d'organes (Pourbaix et *al.*, 2017).

### 3.4 Autres manifestations extra-hépatiques

La pancréatite aiguë est une complication bien connue survenant dans le contexte d'une hépatite fulminante due aux virus des hépatites A, B ou C. Le premier cas rapporté de pancréatite non fulminante associée au HEV a été publié en 1999 (Mishra et *al.*, 1999). La pancréatite aiguë a été rapportée chez des patients jeunes (âge moyen 25 ans) infectés par le HEV en Inde, au Népal ou au Pakistan (Deniel et *al.*, 2011). Cette présentation clinique reste rare chez des patients infectés par le HEV-3 ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le HEV-1 présente un tropisme pour le pancréas (Bazerbachi et *al.*, 2016). Bien que rare, cette pancréatite aiguë doit faire l'objet d'une prise en charge attentive puisque des complications telles que la pancréatite nécrosante aiguë peut survenir et mettre en jeu le pronostic vital du patient (Makharia et *al.*, 2003).

D'autres symptômes extra-hépatiques tels que des manifestations cardio-vasculaires ont été observées dans le cas d'une infection par le HEV : la myocardite (Premkumar et *al.*, 2015) et l'arythmie cardiaque (Woolson et *al.*, 2014). Certains troubles hématologiques ont aussi été observés lors d'une hépatite E : l'anémie, la thrombopénie, la gammopathie monoclonale de signification indéterminée et le syndrome hémato-phagocytaire (Parvez et *al.*, 2021 ; Gallian et *al.*, 2019 ; Hewitt et *al.*, 2014). Une étude a montré l'existence d'une anémie hémolytique chez 23% des cas d'hépatite E aiguë (Fousekis et *al.*, 2020). Notons que l'anémie hémolytique est associée à de nombreux virus hépatotropes tels que les cytomégalo virus, le virus de l'hépatite A et le virus de l'hépatite B (Tibble et *al.*, 1997 ; Fousekis et *al.*, 2020). Dans le cas de l'hépatite E aiguë, l'anémie apparaît 2 à 3 semaines après infection (Fousekis et *al.*, 2020). D'autres troubles hématologiques ont été associés à l'hépatite E tels que le syndrome hémato-phagocytaire qui montre une activation incontrôlée du système immunitaire (Kamihira et *al.*, 2008). Il est cependant difficile d'établir un lien de cause à effet entre ces symptômes extra-hépatiques et le HEV puisque peu de cas ont été décrits jusqu'alors.

Une étude a montré l'association de l'infection par le HEV-4 avec une altération de la qualité des spermatozoïdes, une diminution de leur motilité, une augmentation des formes anormales ainsi que d'une diminution du taux de testostérone (Huang et *al.*, 2018). Ces données restent controversées puisqu'une étude récente suggère qu'il n'y a aucune corrélation entre l'hépatite E et l'infertilité masculine (Horvatits et *al.*, 2019).

## V. Diagnostic de l'hépatite E

Dans la majorité des cas, l'infection par le HEV est souvent asymptomatique, ce qui explique le faible nombre de tests diagnostiques effectués. Cependant, dans certains cas, tels que chez les personnes immunodéprimées ou les femmes enceintes, l'infection par le HEV peut évoluer et causer une forme chronique d'où l'utilité de développer différentes techniques de diagnostic. D'ailleurs, plusieurs études ont montré la possibilité de détecter le HEV dans le sang (Singh et *al.*, 2013), la salive (Rivero-Juarez et *al.*, 2018), les selles et également dans les biopsies hépatiques (Ratho et *al.*, 2019) chez les patients infectés facilitant ainsi le développement d'outils diagnostiques. Le diagnostic de l'hépatite E peut être direct (détection du génome ou des antigènes viraux) ou indirect (détection d'anticorps anti-HEV) (Gupta et *al.*, 2020). Le choix de la technique utilisée pour le diagnostic doit être basé sur la cinétique d'excrétion du virus et le moment de la prise en charge du patient (Gupta et *al.*, 2020).

En utilisant la microscopie électronique, les particules du HEV ont été retrouvées dans les prélèvements fécaux des patients et également dans des modèles animaux infectés par le HEV (Balayan et *al.*, 1983 ; Bradley et *al.*, 1987 ; Arankalle et *al.*, 1988). Cette technique a fourni la première preuve de l'existence du HEV (Balayan et *al.*, 1983). Cependant, cette technique très peu sensible, nécessite de concentrer les particules virales et/ou de les purifier ainsi qu'un équipement spécialisé pour l'analyse d'où la difficulté de l'utiliser comme technique de choix pour diagnostiquer l'hépatite E (Aggarwal et *al.*, 2013).

La recherche de l'ARN HEV fournit une approche très sensible et spécifique dans le diagnostic du HEV. Deux techniques de détection du génome viral sont souvent utilisées : la RT-PCR quantitative (Transcription Reverse et Réaction de Polymérisation en Chaîne) et la LAMP (Amplification Isotherme Médiée par les Boucles) (Aggarwal et *al.*, 2013). Ces deux techniques ciblent les régions les plus conservées de HEV telles que la région de la protéine de capsid ORF2 qui chevauche la phosphoprotéine ORF3 des quatre génotypes infectant l'homme (Jothikumar et *al.*, 2006). De nombreux kits commerciaux de RT-PCR en temps réel sont commercialisés dont les kits RealStar HEV RT-PCR 1.0, AmpliCube HEV2.0 et Ceeram kit qui sont les plus utilisés. Cependant, ils présentent une grande variabilité en termes de sensibilité et de spécificité (Al-Sadeq et *al.*, 2018). La LAMP permet une amplification isotherme en une seule étape de l'ARN viral à l'aide d'un ensemble de six amorces qui reconnaissent huit régions distinctes ce qui confère à ce test une spécificité élevée. Une étude a montré une sensibilité 100 fois plus élevée de cette technique par rapport à la RT-PCR quantitative (Lan et *al.*, 2009).

Une autre approche de diagnostic direct est l'utilisation du kit Wantai HEV-Ag ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ou dosage d'immuno-absorption enzymatique) permettant de détecter la protéine de capsid du virus. Lapa et collaborateurs ont rapporté une spécificité de 100% (Lapa et *al.*,

2016). Néanmoins, deux études ont affirmé que ce kit donnait des résultats positifs alors que la recherche du génome viral par RT-PCR quantitative était négative ; ces résultats impliquent une grande prudence lors de l'interprétation de ce test et exigent l'utilisation d'un test complémentaire (Lapa et al., 2016 ; Behrendt et al., 2016). De plus, il a été démontré par notre équipe que lors de son cycle viral, le HEV produit différentes formes de sa protéine de capsid, dont l'ORF2g et l'ORF2c, qui sont des formes produites en grandes quantités dans le sérum des patients infectés mais ne sont pas associées au génome viral. Notre équipe a également montré que le Kit Wantai HEV-Ag ELISA détectait majoritairement ces deux formes non infectieuses (Montpellier et al., 2018). Ceci peut être expliqué par la stabilité de la protéine de la capsid en culture cellulaire et éventuellement par sa persistance dans le sérum de patients même après clairance du génome viral (Behrendt et al., 2016). Ces données montrent les limites de l'utilisation de ce kit afin d'objectiver une infection active par le HEV.

Les techniques de diagnostic indirect se basent sur la détection des anticorps anti-HEV présents dans le sérum (Aslan & Balaban, 2020). Chez l'homme, l'infection par le HEV induit une production d'anticorps spécifiques (**Fig. 7**) appartenant à différents isotypes y compris des IgM (Immunoglobulines de type M), des IgG (Immunoglobulines de type G) et des IgA (Immunoglobulines de type A) (Aggarwal et al., 2013). Plusieurs études ont montré la faisabilité d'utiliser les anticorps IgG (Bendall et al., 2010 ; Wenzel et al., 2013) et IgM (Drobeniuc et al., 2010 ; Legrand et al., 2009) spécifiques du HEV comme des marqueurs efficaces de l'infection par ce virus (Aslan & Balaban, 2020). Les IgM anti-HEV apparaissent rapidement après l'infection : dans les trois à quatre jours suivant la jaunisse et peuvent persister durant 5 mois en moyenne après infection ; c'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes ont développé des kits permettant de détecter de façon quantitative les IgM anti-HEV. En effet, de nombreux kits ELISA commerciaux existent, tant pour la détection des IgM ou des IgG anti-HEV ; le plus couramment utilisé étant le test Wantai IgM/IgG ELISA.

Récemment, un test permettant la détection des ARN viraux dans la salive des patients infectés a également montré des résultats prometteurs (Rivero-Juarez et al., 2018). Enfin, le développement de ces nombreux outils diagnostiques du HEV révèle que le diagnostic d'une infection n'est pas toujours facile à établir. Jusqu'à ce jour, le développement de tests standards de détection du HEV pose encore une problématique notamment lors du criblage des poches de sang.

## VI. Traitement

A ce jour, aucun traitement spécifique n'a été approuvé dans le traitement des infections par le HEV. Dans la grande majorité des cas d'hépatite E aiguë, l'infection par le HEV est éliminée spontanément par le patient et celui-ci ne nécessite aucun traitement spécifique. Cependant, dans certains contextes, l'hépatite E aiguë peut évoluer vers une hépatite chronique (ex : patients immunodéprimés), une

insuffisance hépatique (ex : pathologie hépatique préexistante) ou vers des formes sévères, (ex : femmes enceintes) (Aslan & Balaban, 2020).

### **1. Traitement de l'hépatite E**

L'hépatite E peut devenir persistante chez deux-tiers des patients immunodéprimés receveurs de greffes d'organe solide. Dix pour cents de ces patients pourront évoluer vers une cirrhose du foie (Kupke & Werner, 2021 ; Kamar *et al.*, 2011). La première ligne de traitement chez ces patients consiste à réduire les doses d'immunosuppresseurs, ce qui permet d'éradiquer le HEV dans 30% des cas. Pour les autres patients, une cure de ribavirine, un analogue nucléosidique qui a été notamment utilisé dans le traitement de l'hépatite C mais aussi pour d'autres infections virales, est le traitement de choix. Cette cure menée pendant 3 mois conduit à une réponse virologique soutenue dans 78% des cas. Si le traitement est poursuivi durant 6 mois, ce chiffre s'élève à 85% (Kamar *et al.*, 2010 ; Kamar *et al.*, 2014). Pour traiter les patients qui répondent mal à la ribavirine, certaines molécules utilisées dans le traitement d'autres infections virales hépatiques peuvent être administrées seules ou en combinaison avec la ribavirine (Kupke & Werner, 2021 ; Aslan & Balaban, 2020 ; Alric *et al.*, 2011). C'est le cas chez les patients ayant reçu une greffe de foie ou les patients HIV qui ont été traités avec succès par l'interféron-alpha pégylé (IFNU-PEG) administré seul ou en combinaison avec la ribavirine (Kamar *et al.*, 2015). L'IFNU-PEG a été également utilisé pour traiter l'hépatite E chronique chez des patients receveurs d'une transplantation rénale, pancréatique, cardiaque ou pulmonaire (Aslan *et al.*, 2020).

Il est cependant à noter que ces traitements ne sont pas spécifiques du HEV et qu'ils causent des effets secondaires comme l'anémie hémolytique pour la ribavirine et l'augmentation du risque de rejet de greffe pour l'IFNU-PEG (Brochot *et al.*, 2010 ; Feld *et al.*, 2017 ; Kamar *et al.* 2014 ; Kupke & Werner, 2021). Ces effets peuvent amener à une mauvaise observance ou un arrêt du traitement.

### **2. Traitement de l'hépatite E**

La ribavirine a également montré un intérêt dans la prise en charge des patients ayant des pathologies hépatiques sous-jacentes et qui risquent d'évoluer vers un tableau d'hépatite E aiguë grave (Péron *et al.*, 2011 ; Kupke & Werner, 2021).

L'hépatite E peut aussi évoluer vers des tableaux cliniques graves d'hépatite fulminante au troisième trimestre de la grossesse en cas d'infection par le HEV-1. Cependant, l'utilisation de la ribavirine est contre-indiquée chez les femmes enceintes en raison de son pouvoir tératogène mis en évidence dans les modèles animaux (Aslan & Balaban, 2020, Chilaka & Konje, 2021). En 2017, Sinclair *et al.* ont publié les résultats à mi-parcours d'une étude de suivi de femmes enceintes exposées à la ribavirine dans le cadre de leur traitement contre le HCV (Sinclair *et al.*, 2017). Du fait de

la faible taille de l'échantillonnage, aucun lien n'a pu être établi dans cette étude entre traitement par la ribavirine et tératogénicité. Les auteurs restent prudents et conseillent d'éviter l'exposition des femmes enceintes à la ribavirine durant la grossesse et durant les 6 mois qui précèdent. Dans cette étude, aucune femme exposée à la ribavirine uniquement au troisième trimestre n'a été incluse. A cette période, l'organogénèse fœtale étant terminée, il pourrait être envisageable de proposer la ribavirine au cas par cas considérant le taux de mortalité très élevé (20%) des patientes infectées par le HEV à cette période de la grossesse (Aslan & Balaban, 2020).

### **3. Résistance à la ribavirine**

Le mécanisme d'action de la ribavirine n'est pas complètement élucidé. Il a été démontré que la ribavirine ralentissait la réplication virale du HEV en inhibant l'inosine monophosphate déshydrogénase, amenuisant ainsi le pool de groupement guanosine triphosphate (GTP) de la cellule hôte (Debing et *al.*, 2014). Quelques cas de résistance à la ribavirine ont été rapportés et deux mutations (G1634R et Y1320H) localisées dans la polymérase virale du HEV ont permis d'expliquer cette résistance (Debing et *al.*, 2014 ; Debing et *al.*, 2016). De plus, il a été démontré que la mutation G1634R augmentait la réplication virale du HEV, lui permettant ainsi d'échapper à l'action de la ribavirine (Debing et *al.*, 2014). D'autres mutations supplémentaires dans la séquence de la polymérase virale ont été ultérieurement décrites. Certaines rendent le HEV sensible à la ribavirine, d'autres favorisent ou ralentissent la réplication virale du HEV (Debing et *al.*, 2016 ; Todt et *al.*, 2016).

Dans de nombreux cas de résistance à la ribavirine, le sofosbuvir qui est un inhibiteur de la polymérase virale NS5B (Non structural protein 5B) du HCV et qui a été approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux a montré un intérêt dans la prise en charge des patients infectés (Aslan & Balaban, 2020). En raison de son efficacité rapportée dans des études cliniques, l'usage du sofosbuvir a aussi été envisagé dans le traitement de l'hépatite E (Aslan & Balaban, 2020). Néanmoins, une étude récente a montré la résistance du HEV en phase chronique même après un protocole de traitement par le sofosbuvir (Horvatits et *al.*, 2019). De plus et dans certains cas de résistance à la ribavirine, le sofosbuvir est administré en combinaison avec la ribavirine chez les patients atteints d'une hépatite E aiguë (Biliotti et *al.*, 2018). Cette combinaison a également montré un intérêt dans la prise en charge des patients immunodéprimés atteints par l'hépatite E (Drinane et *al.*, 2019). En revanche, d'autres études ont démontré que l'administration combinée du sofosbuvir et de la ribavirine n'avait pas d'effet dans le cas d'une hépatite E aiguë observée chez des receveurs de greffe d'organe et infectés par le HIV (Donnelly et *al.*, 2017 ; Van Der Valk et *al.*, 2017). Ceci peut être associé à la présence de plusieurs mutations telles que les mutations K1383N, V1479I et G1634R qui confèrent une résistance à l'administration combinée du sofosbuvir et de la ribavirine. D'ailleurs, une

étude clinique de phase 2 est en cours afin d'évaluer l'efficacité du sofosbuvir dans le traitement des infections causées par le HEV (Aslan & Balaban, 2020).

L'utilisation d'une molécule anti-virale prometteuse, le 2'-C-méthyl-guanosine, a été également évaluée *in vitro* dans des lignées cellulaires infectées par le HEV-3. Ce composé a montré un effet de synergie avec la ribavirine dans le traitement de l'hépatite E (Nishyama et al., 2019). Cependant, actuellement aucune équipe n'a étudié son effet dans des modèles animaux ou chez les patients infectés par le HEV.

Lors d'études menées *in vitro*, il a été démontré que le Mycophénolate mofétil, un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase, possédait une activité inhibitrice sur le HEV (Zhou et al., 2014 ; Wang et al., 2014). Cependant, des complications cliniques ont été observées chez des patients souffrant d'hépatite E chronique et recevant du Mycophénolate mofétil d'où l'importance d'approfondir les études sur l'effet de cette substance (Aslan & Balaban, 2020).

Le zinc peut être administré comme un adjuvant chez les patients souffrant d'hépatite E et présentant une résistance à la ribavirine. De même, une étude récente a montré l'intérêt du zinc chez des patients en phase de rechute d'infection par le HEV. Une concentration sérique de zinc significativement plus faible a été observée chez les patients atteints d'hépatite E chronique par rapport à un groupe témoin (Horvatits et al., 2019). Ces données restent controversées vu qu'une autre équipe a montré une résistance à l'infection malgré la présence d'une concentration importante de zinc chez des patients souffrant d'hépatite E chronique et traités par la ribavirine (Marion et al., 2019). Des études supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de mieux comprendre l'impact exact du zinc sur l'hépatite E.

Un composé naturel appelé silvestrol, qui est un inhibiteur naturel des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction, a également été décrit comme un inhibiteur du HEV. Le traitement par ce composé conduit à une diminution de l'ARN viral du HEV chez des souris infectées. Néanmoins, ce composé naturel n'a pas encore été testé chez les humains (Todt et al., 2018b).

De nouveaux candidats antiviraux tels que les NITD008 et GPC-N114, qui ont été initialement développés pour traiter respectivement le virus de la Dengue (DENV) et les *picornavirus*, ont montré un effet puissant d'inhibition de la réplication virale du HEV sans induire de cytotoxicité. Ces deux composants ont été testés en culture cellulaire et ont montré un effet synergique sur la réplication virale. En revanche, aucune équipe n'a évalué leurs effets *in vivo* (Netzler et al., 2019).

Plus récemment, Soon et collaborateurs (2019) ont identifié des peptides du HEV reconnus par les récepteurs des cellules T cytotoxiques (Soon et al., 2019). Cette approche pourrait trouver une

application dans le traitement par immunothérapie de l'hépatite E chronique (Soon et *al.*, 2019 ; Kupke & Werner, 2021).

## VII. Prévention générale et vaccination

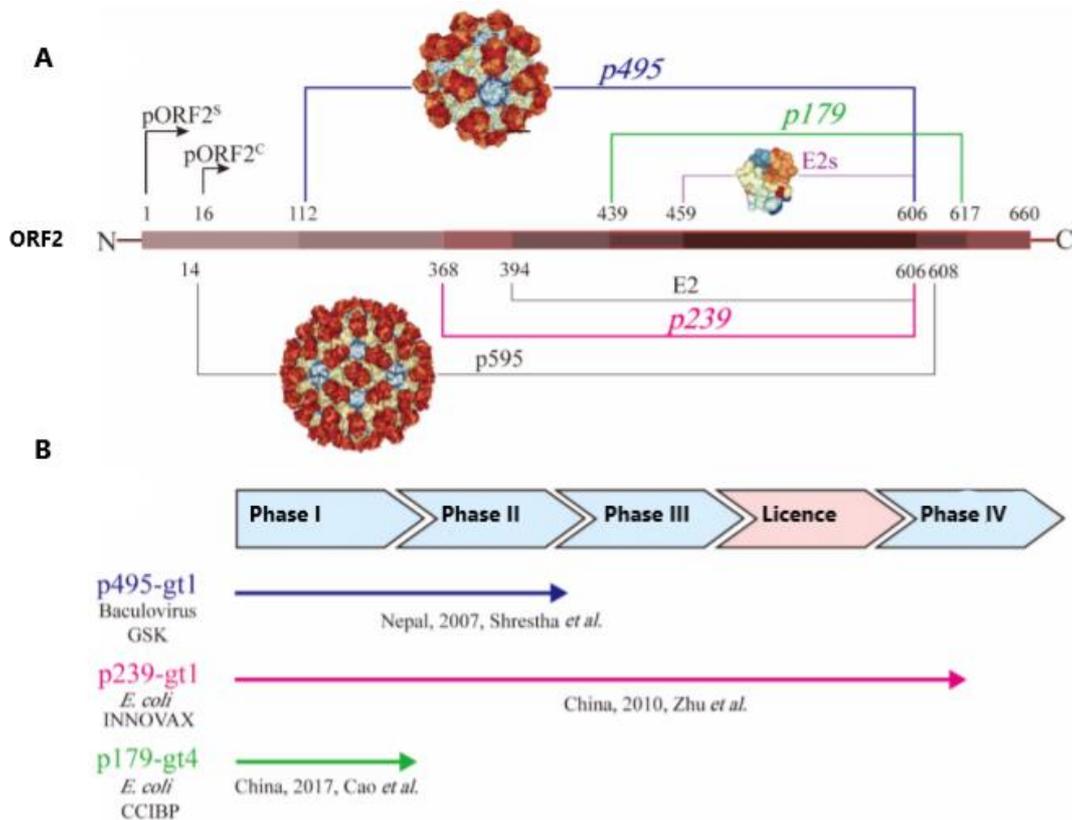
### 1. Prévention générale

Comme l'eau contaminée est à l'origine de plusieurs épidémies causées par le HEV dans de nombreux pays en développement et afin de limiter la contamination des eaux par le HEV, l'approvisionnement des populations avec une eau exempte de pathogènes devrait être mis en place. L'hygiène individuelle et l'amélioration des conditions sanitaires peuvent également réduire le nombre d'infections. De même, la réduction de la consommation de viande crue ou mal cuite constitue une autre mesure efficace. Une cuisson pendant au moins 20 minutes à une température supérieure à 70°C est déjà conseillée pour éviter une éventuelle infection (Emerson et *al.*, 2005).

### 2. Vaccination

Plusieurs épidémies de HEV ont été documentées dans différentes parties du monde comme en Chine (Bi et *al.*, 1994), au Soudan (Guthmann et *al.*, 2006) et en Ouganda (Teshale et *al.*, 2010). Les premiers essais de challenge chez des macaques ont révélé une production d'anticorps anti-HEV contre une infection par ce virus (Arankalle et *al.*, 1993 ; Tsarev et *al.*, 1994) d'où l'idée de développer des vaccins pour prévenir les épidémies d'hépatites E dans le monde.

Grâce à son immunogénicité, la protéine ORF2 du HEV a été utilisée comme un antigène cible dans l'ensemble des candidats vaccins développés contre une infection par le HEV. Des formes complètes ou bien des formes tronquées de cette protéine ont été exprimées dans de nombreux systèmes d'expression (Purdy et *al.*, 1992 ; Im et *al.*, 2001 ; Zhang et *al.*, 2001) et plusieurs de ces produits ont été utilisés comme candidats potentiels dans le développement d'un vaccin contre une infection par le HEV. Le développement de plusieurs candidats vaccins a été arrêté en phase préclinique et seuls trois candidats vaccins ont bénéficié de la poursuite de leur développement dans le cadre d'essais cliniques (**Fig. 5**, Li et *al.*, 2020). En outre, les sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium et le sulfate de potassium et d'aluminium) ont été utilisés comme adjuvants pour l'ensemble de ces trois vaccins (Li et *al.*, 2020).



**Figure 5 : Représentation schématique des différents candidats vaccins dirigés contre le HEV et étudiés dans le cadre d'essais cliniques.**

**(A)** Représentation des différentes formes tronquées de l'ORF2 utilisées dans le développement de vaccins contre le HEV. La protéine ORF2 se compose de 660aa. La forme tronquée p595 (aa14-608) peut former une particule virale similaire au virion natif. La structure de cette forme tronquée a été déterminée par cryo-EM. La forme p495 (aa112-608) peut former des particules virales différentes au virion natif et sa structure a été établie par les rayons X. Cette forme a été employée comme un antigène vaccinal fabriqué par GSK et elle a montré son intérêt lors des essais cliniques. La forme p239 (aa368-606) a été autorisée comme vaccin en Chine. Le vaccin p179 (aa439-617) à son tour a montré son intérêt lors d'un essai clinique de phase I. La forme tronquée E2 (aa 459-606) a été largement utilisée aussi comme cible dans le diagnostic du HEV et il a été démontré qu'elle était capable de former des hexamères en solution. La structure de la forme E2s, la forme la plus courte de l'ORF2 capable de former un dimère abritant les principaux épitopes neutralisants du HEV, a été également déterminée à haute résolution **(B)** Schéma des trois vaccins qui ont été étudiés dans le cadre d'essais cliniques. Le candidat p495 du HEV-1, produit par GSK, est en 2<sup>e</sup> phase clinique. Le candidat p239 du HEV-1, produit par INNOVAX, a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Chine (Hecolin®). Pour le candidat produit par CCIBP, p179 du HEV-4 un essai clinique de phase II est en cours. Adaptée de (Li *et al.*, 2020).

En 2011, un vaccin a été homologué sous le nom commercial d'Hecolin® en Chine. Cependant, il n'a pas été pré-qualifié par l'Organisation mondiale de la santé (Innis *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2020). Une étude récente a montré que ce vaccin est suffisamment immunogène chez des personnes âgées de plus de 65 ans (Yu *et al.*, 2019). En revanche, l'innocuité et l'efficacité du vaccin vis-à-vis des personnes immunodéprimées et des femmes enceintes n'ont toujours pas été déterminées (Wu *et al.*, 2016).

Le premier candidat vaccin, p495-gt1, comportant une partie de l'ORF2 (acides aminés (aa) 112-606) du HEV-1, a été produit en cellules d'insectes / baculovirus et une étude clinique de phase II a montré une efficacité de protection de 95,5% de ce vaccin après trois immunisations. Aucun effet indésirable

n'a été détecté (Shrestha et *al.*, 2007). Cependant, ce projet n'a pas progressé davantage après l'essai clinique de phase III.

Un autre candidat vaccin, p239-gt1, comportant une partie plus courte de l'ORF2 (aa 368-606) du HEV-1, a été exprimé chez *E.coli*. Lors d'un essai clinique de phase III, son niveau de protection vis-à-vis du HEV atteignait 100%, 12 mois après 3 doses (Zhu et *al.*, 2010 ; Li et *al.*, 2020). Une autre étude a montré que ce candidat vaccin conférait une protection à long terme (jusqu'à 4 ans après la 3<sup>e</sup> immunisation) contre l'hépatite E avec un niveau de protection de 86,8%. Néanmoins, ce vaccin n'a été évalué que chez des adultes en bonne santé et l'accumulation de données cliniques supplémentaires sont nécessaires dans des populations telles que les patients immunodéprimés ou souffrant de maladies hépatiques chroniques. L'efficacité de ce vaccin à protéger contre les HEV-2 et HEV-3 reste aussi à évaluer (Pischke & Wedemeyer, 2012).

Plus récemment, un candidat vaccin basé sur la protéine p179 (aa439-617) du HEV-4, exprimé dans *E.coli*, a été évalué lors d'un essai clinique de phase I. Ce candidat vaccin s'est montré efficace pour une population d'une tranche d'âge allant de 16 à 65 ans. Un essai clinique de phase II est en cours (Li et *al.*, 2020).

Dans l'ensemble, ces données indiquent que la protéine ORF2 et ses formes tronquées peuvent être utilisées comme cibles afin de développer des vaccins contre le HEV et garantir la production d'anticorps neutralisants fonctionnels (Li et *al.*, 2020). Comme le HEV circule dans le sang sous forme quasi-enveloppée et est ainsi protégé de l'action des anticorps neutralisants, l'efficacité vaccinale de neutralisation des particules virales demeure limitée (Nagashima et *al.*, 2014).

## VIII. Réponse immunitaire et échappement par le HEV

Le système immunitaire joue un rôle indispensable dans l'élimination des agents pathogènes qui envahissent l'hôte, incluant les virus. La reconnaissance des composants viraux induit tout d'abord une réponse immunitaire innée caractérisée par la production de protéines antivirales telles que les interférons (IFN) de type I et III et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), permettant une réponse rapide contre l'infection. Ces acteurs de l'immunité innée sont également essentiels pour promouvoir le développement d'une réponse immunitaire adaptative plus spécifique, comprenant la production d'anticorps par les cellules B et la génération de lymphocytes T spécifiques du virus. Cette réponse immunitaire adaptative facilite l'éradication complète du virus (Hakim et *al.*, 2018).

### 1. La réponse immunitaire innée

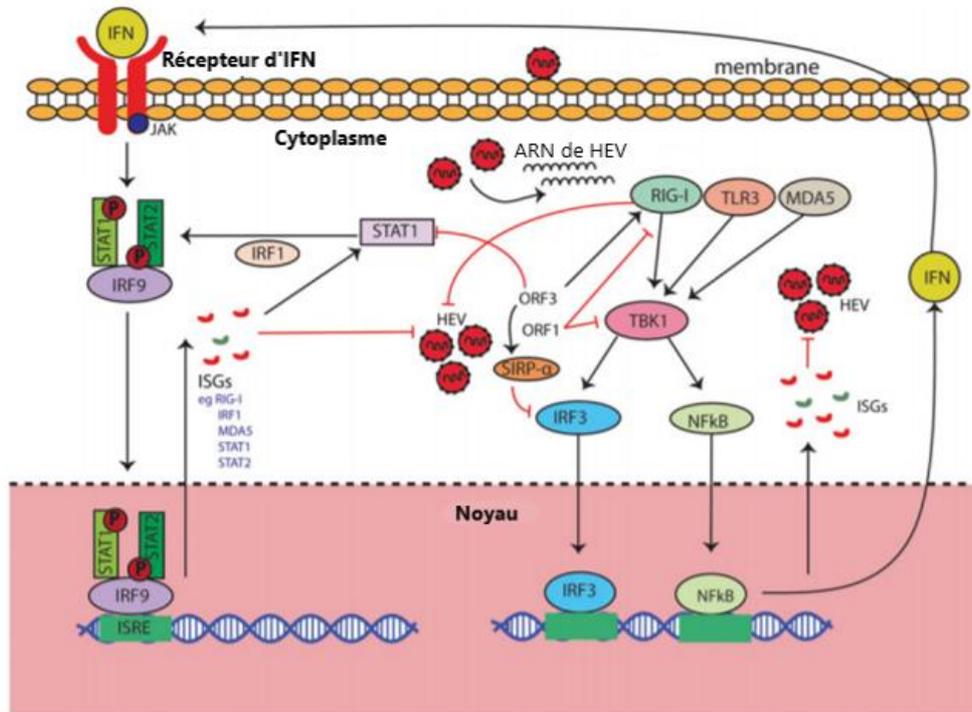
La réponse immunitaire innée lors de l'infection par le HEV n'est toujours pas clairement définie. Toutefois, des stratégies d'échappement à cette réponse ont été développées par le HEV.

### 1.1. Déroulement de la réponse immunitaire innée

Tout d'abord, les ARN viraux sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour Pattern Recognition Receptor) spécifiques des virus à ARN, à savoir des récepteurs de type RIG-I (RLR) et des Toll-like receptors (TLR). Alors que les RLR détectent la présence des ARN viraux dans le cytoplasme, les TLR détectent leur présence dans les endosomes (Hakim et *al.*, 2018). Parmi les RLR, les voies RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I, également connu sous le nom de DDX58) et MDA5 (Melanoma Differentiation Associated Gene 5 également connu sous le nom d'IFIH1) sont impliquées dans la reconnaissance de l'ARN viral du HEV (Hakim et *al.*, 2018 ; Xu et *al.*, 2017). Concernant les 13 TLR connus, seuls les TLR3, 4 et 7 sont activés lors d'une infection par le HEV (Kawai & Akira, 2011). En effet, alors que l'absence de RIG-I ou de TLR3 facilite la réplication du HEV (**Fig.6**), leur restauration freine sa réplication d'où l'importance de ces deux effecteurs dans le cycle viral de ce virus (Devhare et *al.*, 2016).

Après reconnaissance des ARN viraux par les PRR, les voies de signalisation cellulaire médiées par les Interferon Regulatory Factor (IRF) 3 et 7 et par NF- $\kappa$ B sont activées, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires incluant certains IFN et le TNF- $\alpha$  (Kawai et *al.*, 2011, Hakim et *al.*, 2018 ; Devhare et *al.*, 2013). Il existe trois types d'IFN, à savoir les IFN de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$  et autres sous-types), les IFN de type II (IFN- $\gamma$ , seul membre de ce type) et les IFN de type III (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 et l'IFN- $\lambda$ 4) (Platanias et *al.*, 2005). Il a été démontré que le HEV induit principalement une réponse IFN de type III, plutôt que de type I (Yin et *al.*, 2017, Devhare et *al.*, 2016 ; Sooryanarain et *al.*, 2020).

Après production, les IFN se fixent sur leurs récepteurs spécifiques, ce qui active la voie de signalisation JAK/STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription). Suite à leur activation par les IFN de type I et III, les protéines STAT1 et STAT2 sont phosphorylées, s'associant alors à l'IRF9. Ce complexe, connu sous le nom d'ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) est transloqué dans le noyau, induisant la transcription d'une centaine de gènes stimulés par l'IFN (ISGs) (Syedbasha et *al.*, 2017 ; Platanias et *al.*, 2005 ; Hakim 2017) (**Fig. 6**). Parmi les centaines d'ISGs produits, seuls les protéines RIG-I, MDA5 et IRF1 ont été désignées comme de puissants effecteurs anti-HEV (Xu et *al.*, 2017 ; Xu et *al.*, 2016). Une surexpression de 25 types d'ISGs a été associée à une hépatite E chronique chez des patients recevant une transplantation rénale (Moal et *al.*, 2013), ce qui prouve que les ISGs sont impliqués dans la réponse immunitaire innée. De plus, l'inhibition de JAK ou l'extinction des gènes codant STAT1 ou IRF9 induisent une augmentation de la réplication du HEV, renforçant l'implication des IFNs dans la réponse antivirale vis-à-vis du HEV (Zhou et *al.*, 2016 ; Wang et *al.*, 2017).



**Figure 6 : Réponse IFN lors de l'infection par le HEV.**

Lors de l'infection, le HEV est principalement reconnu par les récepteurs RIG-I, TLR3 et MDA5. Cette reconnaissance active les voies de signalisation médiées par IRF3 et NF- $\kappa$ B, entraînant la production et la sécrétion d'IFN. La liaison ultérieure des IFNs à leurs récepteurs correspondants conduit à une phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2. Une fois phosphorylée, ces deux protéines se lient au facteur IRF9 pour former le complexe ISGF3. Une fois transloquée dans le noyau, ce complexe se lie à une séquence promotrice d'ADN spécifique, l'ISRE (IFN-Stimulated Response Element) et induit la transcription de certains d'ISG (IFN-Stimulated Gene). Les ISG RIG-I, MDA5 et IRF1 ont été identifiés comme de puissants effecteurs anti-HEV, l'IRF1 inhibant le HEV *via* l'activation de la voie JAK/STAT. Adaptée de (Hakim *et al.*, 2017).

Hormis la production d'IFN, les virus induisent la production de nombreuses autres molécules inflammatoires. En effet, outre les IFNs, l'infection par le HEV conduit à la production de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires incluant notamment le TNF- $\alpha$  (Devhare *et al.*, 2013). Un niveau significativement plus élevé de TNF- $\alpha$  a été détecté chez les femmes enceintes infectées par le HEV et a été associé à des formes d'hépatite E plus sévères (Kumar *et al.*, 2014). De plus, des mutations dans la région promotrice du gène codant le TNF- $\alpha$  ont été associées à la sensibilité humaine vis-à-vis du HEV (Mishra & Arankalle, 2011). Enfin, alors que le traitement de cellules hépatiques HepG2 par le TNF- $\alpha$  inhibe la réplique du HEV, l'utilisation d'un anti-TNF- $\alpha$  déclenche une augmentation de la réplique de HEV (Behrendt *et al.*, 2017).

## 1.2. Les stratégies d'HEV vis-à-vis de la réponse immunitaire innée

Le HEV a développé des stratégies pour contourner la réponse immunitaire innée, et ce *via* ses 3 protéines virales.

Plusieurs domaines de la polyprotéine non structurale ORF1 sont capables d'inhiber la réponse innée. Le macrodomaine X bloque la phosphorylation de l'IRF3 ce qui atténue la réponse IFN, freinant de ce fait la production des ISGs (Nan et *al.*, 2014). Le domaine papain-like cysteine protease (PCP), grâce à son activité dé-ubiquitinase, inactive RIG-I et TBK-1, bloquant ainsi la production d'IFN- $\beta$  (Nan et *al.*, 2014). Une étude a montré que le domaine Methyltransferase (Met)-Y-PCP est capable d'inhiber l'activation des ISGs en réponse à l'IFN- $\beta$  en inhibant la translocation nucléaire et la phosphorylation de STAT1 (Bagdassarian et *al.*, 2018). Enfin, une étude récente a montré que la polymérase virale du HEV est capable de se lier à l'ISG IFIT1, facteur inhibiteur de la traduction de l'ARN du HEV, empêchant ainsi l'inhibition de sa traduction médiée par IFIT1 (Pingale et *al.*, 2019).

La protéine ORF2 est impliquée dans le blocage de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Surjit et *al.*, 2012 ; Tian et *al.*, 2017 ; Lin et *al.*, 2019).

Concernant l'ORF3, Huang et collaborateurs ont montré que l'ORF3 du HEV induit l'expression de la protéine SIRP- $\alpha$  (Signal regulator protein U), diminuant la phosphorylation de l'IRF3 et donc la production d'IFN- $\beta$ . Ceci peut expliquer les taux faibles d'IFN- $\beta$  observés lors de la phase précoce de l'infection par le HEV (Huang et *al.*, 2016). De plus, le HEV a prouvé sa capacité à bouleverser la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, réduisant significativement la production de cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF- $\alpha$ , l'interleukine 8 et l'interleukine 1 $\beta$ . Le domaine P2 de l'ORF3 inhibe la voie de signalisation NF- $\kappa$ B induite par le TLR3 (He et *al.*, 2016). L'ORF3 inhibe aussi cette voie induite par le TLR4 (Lei et *al.*, 2016). Alors que de nombreuses études montrent l'implication de l'ORF3 dans l'échappement du HEV vis-à-vis de la réponse innée, il a été montré dans une étude que la protéine ORF3 des HEV-1 et HEV-3 augmente la production de l'IFN- $\beta$  *via* l'activation de RIG-I (Nan et *al.*, 2014). Une étude menée en 2018 a montré que l'ORF3 du HEV-1 freine l'induction des IFNs de type I *via* non seulement l'inhibition de l'expression des TLR3 et TLR7 mais aussi de la phosphorylation des IRF3 et IRF7 induite respectivement par les TLR3 et TLR7 (Lei et *al.*, 2018). La variation de séquence de l'ORF3 d'un génotype à l'autre nécessite des études plus approfondies (Lin & Zhang, 2021).

Au vu de l'ensemble de ces données, il semblerait que le HEV contrôle étroitement l'équilibre entre l'inhibition et l'induction de la production d'IFN à différents stades de son cycle de réplication afin de favoriser son évasion dans la cellule hôte, et ce en fonction du génotype du HEV (Hakim et *al.*, 2017).

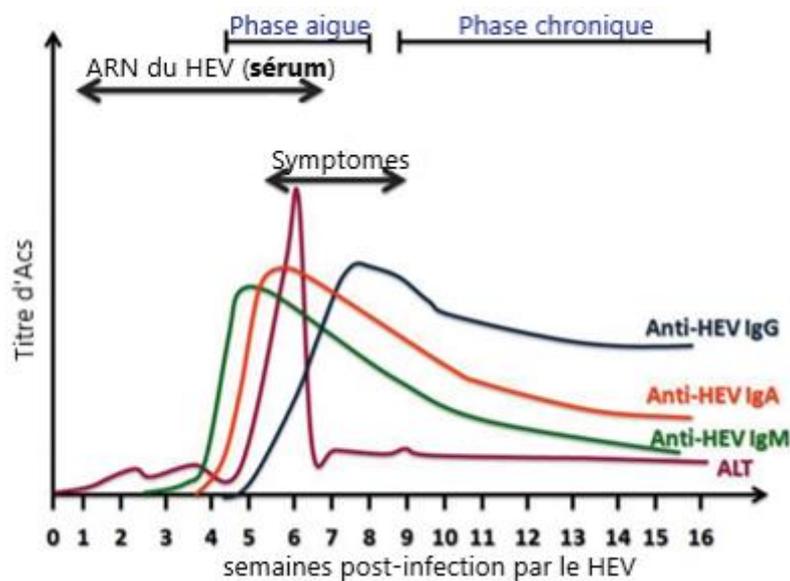
## 2. La réponse immunitaire adaptative

Comme toute réponse immunitaire adaptative, la réponse immunitaire adaptative dirigée contre le HEV s'accompagne d'une réponse adaptative permettant la production d'anticorps par les lymphocytes B (réponse humorale) et la production de lymphocytes T spécifiques (réponse à médiation cellulaire).

### 2.1. Réponse adaptative à médiation humorale

Des études chez des primates non humains ont indiqué la présence d'anticorps spécifiques anti-HEV qui protègent les animaux contre de nouvelles infections par le HEV (Zhu et al., 2014), ce qui prouve que le HEV induit une réponse immunitaire humorale au début de l'infection.

D'une manière générale, les anticorps anti-HEV d'isotype IgM (voire IgA) apparaissent rapidement après infection (phase ictérique). Cette apparition est suivie d'une augmentation progressive et un peu plus tardive des anticorps anti-HEV d'isotype IgG, avec un pic environ deux mois après l'infection (Lhomme et al., 2016) (**Fig.7**). Ces IgG peuvent persister toute la vie pour fournir une immunité à l'hôte (Hoofnagle et al., 2012). La protéine de capside ORF2 serait la principale cible pour la production d'anticorps anti-HEV, avec de nombreux épitopes immunodominants identifiés (Zhang et al., 2012 ; Tang et al., 2015). Le potentiel immunogène de la protéine ORF1 est sujet à controverse (Al-Ayoubi et al., 2018 ; Brown et al., 2016).



**Figure 7 : Médiateurs de la réponse humorale au cours d'une infection par le HEV.**

L'ARN du HEV peut être détecté très tôt et commence à décliner dans le sérum jusqu'à des niveaux indétectables 5 à 6 semaines après l'infection. Les anticorps anti-HEV d'isotype IgM apparaissent entre la deuxième et la troisième semaine après infection. Les anticorps anti-HEV d'isotype IgA sont produits après les anticorps anti-HEV d'isotype IgM et sont détectables environ 1 mois après l'infection. Le pic de transaminases (ALT), enzyme hépatique, est superposable avec celui des anticorps anti-HEV d'isotype IgM puis décroît brusquement, pouvant ainsi être utilisé comme un outil dans le diagnostic de l'infection par le HEV. La production d'IgG débute une à deux semaines après l'apparition des anti-HEV d'isotype IgM et atteint un pic environ deux mois après l'infection. Adaptée de (Lhomme et al., 2016).

## 2.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Une plus forte proportion de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques a été observée dans le sang périphérique des patients atteints par le HEV par rapport à des sujets non infectés (Husain et al., 2011). La mise en place d'une réponse T spécifique du HEV a été démontrée *in vitro*, et ce par la prolifération lymphocytaire et la production de cytokines (incluant le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ) après stimulation par différentes ORF recombinantes du HEV (Naik et al., 2002 ; Al-Ayoubi et al., 2018, Husain et al., 2011 ; Shata et al., 2007). Dans le cas d'hépatite E auto-résolutive, une diminution rapide des réponses T spécifiques contre le HEV a été montrée au cours des premières semaines de la primo-infection (Brown et al., 2016). En revanche, des lymphocytes T spécifiques du HEV ont été détectés au moins jusqu'à un an et demi voire des années après guérison, indiquant la génération de cellules T mémoires spécifiques du HEV (Shata et al., 2007 ; Gisa et al., 2016 ; Brown et al., 2016 ; Suneetha et al., 2012).

Le HEV étant non-cytopathique, la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> contenant des granzymes et des perforines (molécules cytotoxiques) et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisant de l'IFN- $\gamma$  et du TNF-U dans le foie pourrait contribuer aux lésions hépatiques. Ainsi, une présence importante de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été retrouvée dans des biopsies de foie de patients infectés par le HEV souffrant d'une insuffisance hépatique aiguë ou décédés suite à une insuffisance hépatique fulminante (Prabhu et al., 2011 ; Naik et al., 2015).

Plusieurs études ont rapporté la présence d'une immunité croisée entre les HEV-1 et HEV-3 (Gisa et al., 2016 ; Brown et al., 2016).

### IX. Modèles d'étude du HEV

#### 1. Lignées cellulaires

Depuis sa découverte, la production et la propagation du HEV ont été étudiées dans diverses cellules cancéreuses (Fu et al., 2019). Pillot et collaborateurs ont pu démontrer que le virus responsable de l'hépatite non-A non-B, connu maintenant sous le nom de HEV, était capable d'infecter les cellules PLC/PRF/5 (Pillot et al., 1987). Dix ans plus tard, Meng et collaborateurs ont réalisé des tests de neutralisation du HEV produit dans la même lignée cellulaire (Meng et al., 1997). Malgré de nombreuses publications ayant rapporté la propagation réussie d'isolats du HEV en culture cellulaire, l'efficacité de réplication du virus *in vitro* reste toujours faible (Fu et al., 2019).

Une étude comparant 21 lignées cellulaires a montré que seules les lignées issues de carcinome pulmonaire (A549) et d'hépatome (HepG2 et PLC3/PRF/5) étaient permissives au HEV (Okamoto et al., 2011). Takahashi et collaborateurs ont montré que le HEV-1 pouvait également être cultivé dans les cellules PLC/PRF/5 et A549 (Takahashi et al., 2010). Des études récentes ont montré que le HEV était capable de se répliquer dans des sous-clones de cellules A549 et PLC/PRF/5 (Schemmerer et al., 2019 ; Feng et al., 2014 ; Montpellier et al., 2018). En 2011, la souche Kernow-C1 du HEV-3, isolée d'un patient

coinfecté par le HEV et le HIV, a été sélectionnée en culture cellulaire suite à 6 passages successifs. Ce patient était infecté chroniquement par le HEV depuis 2 ans. Cette souche a intégré un fragment provenant de la protéine ribosomique S17 humaine dans la région hypervariable (HVR) de l'ORF1. Cette même insertion a également été retrouvée chez d'autres patients infectés chroniquement par le HEV montrant qu'il ne s'agit pas d'un artefact de culture cellulaire (Shukla et al., 2012). En outre, il a été démontré que l'insertion de la protéine S17 dans une souche de HEV-1 (souche Sar55) augmente de façon importante la capacité répliquative de ce génotype après transfection dans des cellules de hamster BHK-21 (pour revue, Kenney & Meng, 2015b).

Un système utilisant la souche Kernow-C1 p6 (« p6 » indiquant les six passages de cette souche en culture cellulaire) et les cellules PLC3, un sous-clone de la lignée PLC/PRF/5, a été décrit par notre équipe (Montpellier et al., 2018). Ce système a permis à la fois une production importante et très précoce de la protéine ORF2 et des particules infectieuses dès 4 jours après électroporation du génome viral. La purification des particules sur gradient ou coussin d'iodixanol a permis d'obtenir des titres viraux importants allant de 1 à  $5 \times 10^6$  FFU (*Focus Forming Units/ml*). Les particules virales produites dans ce système sont morphologiquement similaires aux particules isolées à partir de patients infectés par le HEV (Montpellier et al., 2018).

Des cellules hépatocytaires humaines isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 développée suite à une hépatite C chronique appelées HepaRG ont été infectées avec succès par le HEV (Rogée et al., 2013 ; Pellerin et al., 2021). Ces études ont montré que les cellules HepaRG représentent un bon modèle d'infection par le HEV. Récemment, Capelli et collaborateurs ont identifié un sous-clone polarisé des cellules HepG2 (F2) hautement permissives pour les isolats de HEV-1 et HEV-3. Actuellement, il s'agit du seul modèle décrit montrant le trafic vectoriel du HEV (Capelli et al., 2019).

## **2. Les modèles animaux du HEV**

Dès la découverte du HEV dans les années 90, des modèles de primates avaient été utilisés pour comprendre sa pathologie et son cycle de réplication. Actuellement, il existe différentes espèces animales qui sont utilisées comme modèles d'infection par le HEV (**Fig. 8**).

Plusieurs espèces de primates non humains sont susceptibles à une infection par le HEV ; d'ailleurs, des singes rhesus et cynomolgus capturés dans la nature présentent des preuves sérologiques d'une exposition naturelle au HEV (Arankalle et al., 1995b ; Purcell et Emerson, 2001). Ces animaux sont utilisés comme modèles à la fois pour l'étude des HEV-1 et -2 à transmission interhumaine mais aussi des HEV-3 et -4 à transmission zoonotique (Purcell & Emerson, 2001 ; Kenney & Meng, 2019) (**Fig. 8**).

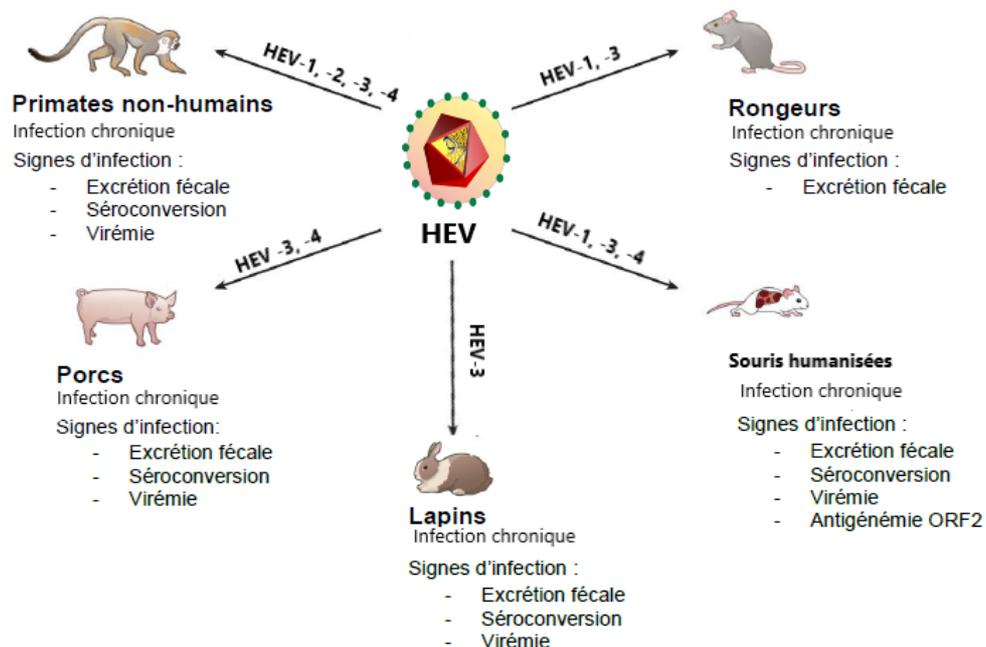
Ces modèles animaux ont été également utilisés pour l'évaluation de l'immunogénicité des candidats vaccins dirigés contre le HEV (Krawcznski et *al.*, 2011).

Le porc représente la première espèce naturelle connue porteuse du HEV. Avec le sanglier, le porc domestique est actuellement considéré comme le principal réservoir animal de l'infection par le HEV-3 et le HEV-4 pour l'Homme (Kenney & Meng, 2018). Chez le porc, l'infection par les HEV-3 et HEV-4 entraîne une hépatite asymptomatique (**Fig. 8**). A l'aide du modèle porcin, il a été montré que bien qu'ayant un tropisme hépatique, le HEV pouvait se répliquer dans des organes extra-hépatiques comme l'intestin grêle, les ganglions lymphatiques et le colon (Williams et *al.*, 2001). Une autre étude a comparé la cinétique d'infection entre des porcs inoculés par voie intraveineuse avec le HEV et des porcs ayant été en contact avec des porcs infectés avec le HEV (Bouwknegt et *al.*, 2009). L'excrétion d'ARN viral dans les fèces et la virémie ont été détectées dans les deux catégories de porcs mais étaient détectés plus précocement pour les porcs inoculés par rapport aux porcs contacts. Le modèle porcin a également été utilisé afin d'évaluer l'efficacité de candidats vaccins anti-HEV. La vaccination des porcs avec des vaccins basés sur des formes tronquées de la protéine de capsid du HEV a engendré une forte production d'IgG anti-HEV conférant une protection contre une infection par le HEV-3 (Sanford et *al.*, 2011). De plus, une étude réalisée par la même équipe a montré qu'une infection des porcs par le HEV-3 induisait une immunité protectrice contre une deuxième infection par le HEV-3 et le HEV-4, démontrant que les porcs pouvaient constituer un bon modèle animal pour tester l'efficacité des candidats vaccins contre le HEV (Sanford et *al.*, 2011).

Le lapin a également été bien étudié ces dernières années comme un modèle animal du HEV. L'infection naturelle par le HEV chez les lapins a été identifiée pour la première fois en Chine en 2009 (Zhao et *al.*, 2009), puis aux États-Unis (Cossaboom et *al.*, 2011) et en France (Izopet et *al.*, 2012). L'infection expérimentale par le HEV-1 et le HEV-4 induit des lésions caractérisées par une nécrose hépatocellulaire locale (Kenney & Meng, 2018). Les lapins infectés excrétaient le virus dans leurs selles, produisaient des anticorps anti-HEV, présentaient des taux sériques d'alanine transférase (ALT) élevés qui étaient accompagnés de lésions hépatiques aiguës. Le génome du HEV isolé à partir du lapin est phylogénétiquement proche du HEV-3 qui infecte l'Homme (Zhao et *al.*, 2009) et le HEV isolé du lapin est capable d'infecter d'autres espèces (Li & Wakita, 2019). D'ailleurs, des séquences proches du HEV du lapin ont été isolées chez des patients français infectés par le HEV suggérant une transmission occasionnelle de ces souches de lagomorpe à l'Homme (Abravanel et *al.*, 2017). C'est pour l'ensemble de ces raisons que le lapin est souvent utilisé comme un modèle d'étude du HEV. Une autre étude a suggéré que ce modèle animal pouvait être utilisé pour étudier l'infection chronique par le HEV (Han et *al.*, 2014, **Fig. 8**). Une équipe a dévoilé quelques cas de transmission verticale chez la lapine avec un fort pourcentage de mortalité similaire à celui observé chez les femmes enceintes ; le modèle lapin

pourrait donc permettre d'étudier les mécanismes conduisant à ces taux élevés de mortalité et ainsi de mieux comprendre la pathologie particulière du HEV évoluant chez la femme enceinte (Kenney & Meng, 2018).

De par leur petite taille, leur facilité de manipulation et un taux de reproduction élevé, les rongeurs sont très utilisés comme modèle d'étude des infections virales (Kenney & Meng, 2018). Au début des années 2010, de nouvelles souches d'HEV ont été isolées à partir de fèces et de sérum de rats sauvages en Allemagne et aux États-Unis (Johns et al., 2010 ; Purcell et al., 2011). Les premiers essais de culture du HEV isolé de rat dans des lignées cellulaires dérivées de rat ont échoué (Johns et al., 2010). Mais ensuite, des équipes ont réussi à établir des modèles de culture *in vitro* du HEV isolé du rat dans des lignées cellulaires hépatiques humaines Huh-7 et HepG2/C3A (Debing et al., 2016 ; Jirintai et al., 2014). Les rats *nude* infectés par le HEV de rat développent une infection persistante et sont utiles pour cribler de nouvelles molécules antivirales (Debing et al., 2016). Par contre, chez le rat Wistar infecté expérimentalement, l'excrétion du virus n'est que transitoire et ni ces animaux ni les rats *nude* ne sont susceptibles à l'infection par les HEV-1 à 4 (Li & Wakita, 2019). Réciproquement, des efforts pour infecter des singes ou des porcs par le HEV provenant de rat sont restés vains (Li & Wakita, 2019). En conclusion, le modèle rat peut être utile pour tester de nouvelles molécules antivirales mais il n'est pas approprié pour étudier les génotypes humains du HEV.



**Figure 8 : Illustration schématique des différents modèles animaux les plus couramment utilisés dans l'étude du HEV.**

Les génotypes HEV qui produisent une infection active dans ces modèles sont répertoriés à côté des flèches. Les caractéristiques de chaque modèle sont signalées en dessous de l'image de l'animal. Adaptée à partir de (Kenney & Meng, 2018).

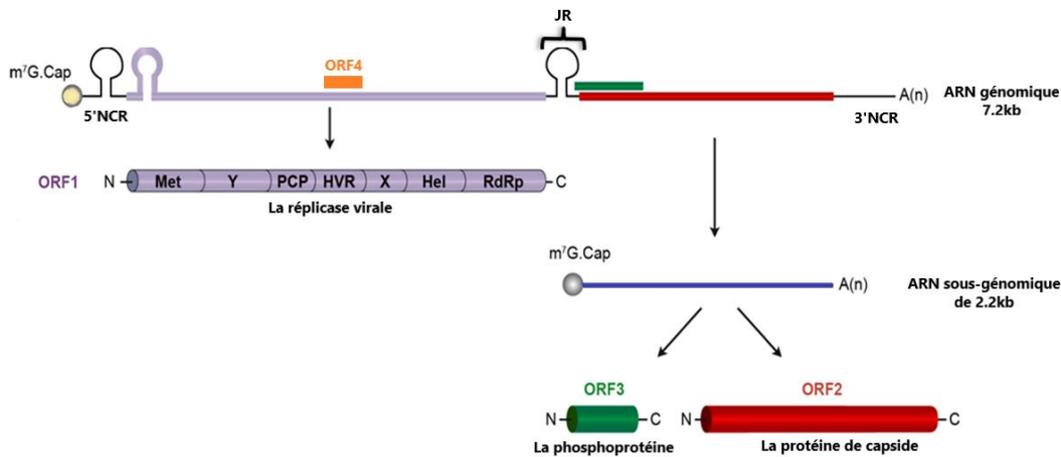
Contrairement au rat, aucun *Hepevirus* n'a jamais été isolé de souris sauvages (Li & Wakita, 2019). Une étude menée chez des souris (C57BL/6) a montré l'incapacité des HEV-1, HEV-3 et HEV-4 à se répliquer dans ce modèle (Li et al., 2008). En revanche, le HEV-3 d'origine porcine est capable d'infecter des souris Balb/C en entraînant des modifications des taux d'enzymes hépatiques et en induisant des lésions histopathologiques du foie (Huang et al., 2009). Des souris au foie humanisé ont également été développées et permettent la répllication du HEV-1 à des titres plus élevés que le HEV-3 (Sayed et al., 2017a). Néanmoins, ces modèles ont toute leur place dans les phases précliniques pour l'évaluation de nouvelles molécules antivirales contre le HEV (Alweiss et al., 2016 ; Sayed et al., 2017b). Ces souris au foie humanisé ont également permis d'établir une infection après inoculation intrasplénique de plasma provenant d'un patient atteint d'hépatite chronique, confirmant ainsi le risque de transmission de l'hépatite E par transfusion de produits sanguins (Sayed et al., 2017a).

Le génome complet du HEV de furet a été séquencé pour la première fois aux Pays-Bas en 2010. De plus, une analyse phylogénétique a révélé que cette souche était génétiquement proche du HEV provenant du rat (Raj et al., 2012). Depuis, d'autres souches ont été isolées à partir de furets provenant de diverses régions du monde. Des tentatives infructueuses d'infection expérimentale du HEV isolé de furet chez des primates non humains et des rats de laboratoire suggèrent une capacité de transmission zoonotique très limitée pour cette souche (Li et al., 2016). Le modèle furet peut néanmoins trouver une utilité dans l'étude des hépatites chroniques puisque le furet peut développer naturellement une hépatite persistante sans traitement immunosuppresseur (Li et al., 2016).

## X. Caractéristiques virologiques du HEV

### 1. Le génome du HEV

Le HEV présente un génome à ARN simple brin de polarité positive (ARN sb (+)) de 7,2kb (**Fig. 9**) contenant trois cadres ouverts de lecture codant pour 3 protéines virales : l'ORF1 (encore appelée réplicase virale), l'ORF2 (ou protéine de capsid) et la phosphoprotéine ORF3 (Lin & Zhang, 2021). Un quatrième cadre ouvert de lecture codant l'ORF4 a également été identifié dans le génome viral du HEV-1 (Nair et al., 2016).



**Figure 9 : Organisation génomique du HEV.**

Le HEV possède un génome à ARN simple brin de polarité positive de 7,2kb. La réplicase virale est représentée en violet et est formée de sept domaines différents. L'ORF2 est colorée en rouge. L'ORF3 est colorée en vert. L'ORF4, colorée en orange, a été identifiée dans le génome viral du HEV-1. NCR : régions non codantes, JR : région de jonction, m7g : coiffe 5'-methylguanosine, A(n) : queue poly-Adénosine. Adaptée de (Ankavay et *al.*, 2018).

Un ARN génomique de pleine longueur et un ARN sous-génomique de 2,2kb sont transcrits dans la cellule infectée (Graff et *al.*, 2006 ; Ichiyama et *al.*, 2009). La transcription de l'ARN sous-génomique des HEV-1,-3 et HEV-4 commence en 5'GC de l'ARN viral (Ichiyama et *al.*, 2009). L'ORF2 et l'ORF3 sont traduites directement à partir de l'ARN sous-génomique (Graff et *al.*, 2006). L'ARN sous-génomique est plus abondant que l'ARN génomique, ce qui explique les taux très importants d'expression de l'ORF2 et l'ORF3 dans la cellule hôte contrairement à l'ORF1 (Varma et *al.*, 2011).

L'ORF4 chevauche le domaine X et le domaine hélicase (Hel) de l'ORF1 et elle est produite en condition de stress du réticulum endoplasmique (RE) grâce à un élément structuré de l'ARN qui permet l'interaction interne avec les ribosomes (IRES). Des anticorps anti-ORF4 ont été également détectés dans le sérum des patients infectés (Nair et *al.*, 2016).

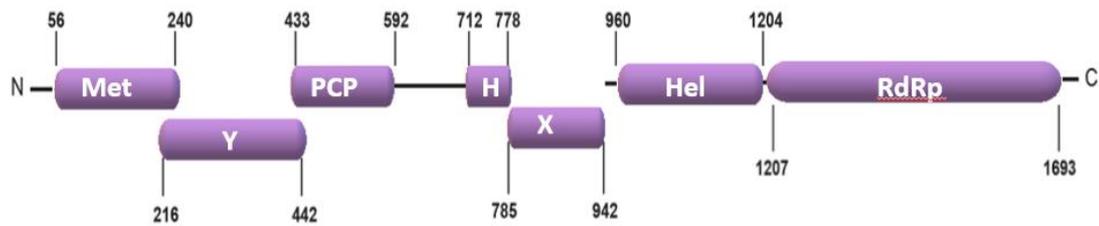
## 2. Les protéines virales

### 2.1 La protéine ORF1

#### 2.1.1. Organisation génomique de l'ORF1

La protéine ORF1, encore appelée réplicase virale, est une polyprotéine non structurale d'un poids moléculaire estimé à 186 kDa pour le HEV-1 (souche Sar55) et à 194 kDa pour le HEV-3 (souche C1 Kernow-p6) (Artimo et *al.*, 2012). En se basant sur des analyses bio-informatiques et en comparant la séquence de la réplicase du HEV avec d'autres protéines non structurales de virus à ARN sb (+), 7 domaines ont été identifiés dans l'ORF1 (**Fig. 10**): le domaine Met (aa 56-240), le domaine Y (aa 216-442), le domaine PCP (aa 433-592), le domaine HVR (ou H) ou domaine riche en prolines qui est le plus

petit domaine (aa 712-778), le macrodomaine X (aa 785-942), l'Hel (aa 960-1204) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp, aa 1207-1693) (Koonin et *al.*, 1992).



**Figure 10 : Les différents domaines de la protéine ORF1.**

La protéine ORF1 est constituée de 1693 aa répartis en 7 domaines distincts (violet): le domaine Met (méthyl-transférase), le domaine Y qui chevauche une partie du domaine Met, le domaine papain-like cystein protease (PCP) qui chevauche une partie du domaine Y, le domaine hypervariable (HVR ou H) ou domaine riche en prolines, le macrodomaine X qui chevauche légèrement le domaine H, l'hélicase (Hel) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Les limites N-terminale (N) et C-terminale (C) prédites des différents domaines sont indiquées en aa. Les domaines chevauchants sont décalés vers le bas. Les séquences inter-domaines sont représentées par un trait noir. Adaptée de (Koonin et *al.*, 1992) et de (Proudfoot et *al.*, 2019).

### 2.1.2. Fonctions des différents domaines de la polyprotéine ORF1

#### - Le domaine méthyl-transférase :

Avec l'aide de l'analyse bio-informatique et des alignements de séquences du HEV et d'autres virus à ARN sb (+), des homologies de séquence avec des domaines déjà connus ont été identifiés dans plusieurs domaines de l'ORF1, notamment dans le domaine Met (Koonin et *al.*, 1992). Plus précisément, les résidus conservés d'acides aminés Y20 et H64 ainsi que le motif D34xxR37 caractéristique des domaines Met, sont également retrouvés dans la séquence du domaine Met du HEV (Rozanov et *al.*, 1992).

Le domaine Met catalyse la coiffe en 5' de l'ARN génomique et de l'ARN sous-génomique grâce à une activité guanine-7-méthyl-transférase et guanylyl-transférase (LeDesma et *al.*, 2019). Cette fonction combinée est assurée par une seule protéine de 110 kDa (Magden et *al.*, 2001) qui permet le transfert d'un GTP, donnant naissance à une molécule 7-méthyl-guanosine-5'-triphosphate, qui se lie de manière covalente à l'extrémité 5' de génome viral du HEV. Ce processus a également été décrit chez de nombreux virus à ARN sb (+) tels que les virus appartenant au groupe des *Alphavirus-like* (Ahola et *al.*, 1997 ; Ahola et *al.*, 2000). Dans les cellules eucaryotes, la méthylation a lieu après le transfert du groupe GTP (Decroly et *al.*, 2011). La particularité du domaine Met du HEV et des *Alphavirus-like* en fait une cible attractive pour la découverte de nouvelles molécules antivirales. Dans le cas du HEV, l'activité catalytique du domaine Met a été confirmée *in vitro* en exprimant les domaines Met-Y-PCP dans un système baculovirus–cellules d'insectes (Magden et *al.*, 2001). En plus de son importance au

cours de la traduction de l'ARNm, la coiffe de l'ARN viral protégerait le virus de la réponse immunitaire innée de la cellule hôte (Ahmad et *al.*, 2011). De plus, Magden et collaborateurs ont suggéré une relation étroite de ce domaine avec la membrane cellulaire (Magden et *al.*, 2001).

Diverses mutations ont été retrouvées dans le domaine Met chez les patients atteints d'une hépatite aiguë ou bien d'une insuffisance hépatique due au HEV (LeDesma et *al.*, 2019). Certaines de ces mutations D29N et V27A conduisent à une augmentation de la charge virale chez les patients souffrant d'une hépatite aiguë causée par le HEV-1. Par contre, une autre mutation H105R conduit à une diminution de la virémie chez les patients infectés par le HEV (Borkakoti et *al.*, 2017). De plus, une étude clinique a révélé la présence de six substitutions dans la région de la réplicase virale associées à l'hépatite E fulminante induite par le HEV-1 (Koonin et *al.*, 1992 ; Magden et *al.*, 2001). L'une de ces substitutions (F179S) est située dans le domaine Met (Mishra et *al.*, 2013).

L'activité du domaine Met est essentielle à l'accomplissement du cycle viral du HEV puisque la transfection intrahépatique d'ARN non coiffé dans un modèle de chimpanzé n'a pas permis l'initiation de l'infection par HEV-1 (Emerson et *al.*, 2001).

#### - **Le domaine Y**

A ce jour, peu de données concernant le deuxième domaine de la polyprotéine non-structurale du HEV, nommé domaine Y, ont été publiées. Cependant, des études ont montré l'homologie de séquence de ce domaine avec celui d'autres virus connus. D'autres études ont rapporté la conservation de plusieurs motifs de ce domaine dans différents génotypes du HEV (LeDesma et *al.*, 2019 ; Parvez, 2017).

L'analyse de la séquence d'aa du domaine Y (aa 216-442) du HEV a montré que les résidus cystéines C336 et C337 sont conservés dans les séquences des 4 génotypes humains du HEV et semblent être des sites de palmitoylation permettant ainsi l'enchâssement de la protéine ORF1 dans les membranes cellulaires (Parvez, 2017). La mutation de ces résidus inhibe totalement la réplication du HEV dans les cellules HepG2/C3A d'origine humaine (Parvez, 2017). Une séquence hydrophobe, formant une hélice  $\alpha$  (LYSWLFE, aa 410-416), hautement conservée entre les 4 génotypes humains du HEV, semble être également impliquée dans l'interaction avec les membranes cellulaires comme cela a été décrit pour le virus de la mosaïque du brome et du concombre. D'ailleurs, la substitution W413A abolit également la réplication du HEV (Parvez, 2017). Les résidus d'aa C336, C337 et W413 se trouvent également dans des régions où l'ARN forme des structures secondaires dont la destruction par les substitutions d'alanine pourraient aussi expliquer la non viabilité des mutants (Parvez, 2017 ; LeDesma et *al.*, 2019).

Enfin, il semble que l'activité enzymatique du domaine Met dépende du domaine Y suggérant que ce domaine puisse être une extension du domaine Met (Ahola & Karlin, 2015). Cependant, il reste encore beaucoup à apprendre concernant la fonction exacte de ce domaine et son importance dans le cycle de réplication virale du HEV (LeDesma et al., 2019).

#### - **Le domaine de la papaïne-like cystéine protéase (PCP)**

De nombreux auteurs ont tenté d'étudier la maturation de l'ORF1 et de valider l'existence d'une activité protéase pour le HEV. Cette question est toujours très débattue au sein de la communauté HEV (voir synthèse dans le paragraphe ii. Données sur la maturation de l'ORF1). Dans le présent paragraphe, nous allons nous concentrer sur les éléments de séquences et de structures qui ont permis d'identifier ce domaine du HEV comme étant un domaine protéase.

Une analyse bio-informatique ancienne révèle une faible similarité (20%) du domaine protéase putatif (aa 433-592) du HEV avec le domaine PCP du virus de la rubéole (RUBV) (Koonin et al., 1992). Mais les auteurs de cette étude n'avaient pas trouvé à l'époque d'autre similarité avec d'autres domaines protéases d'autres virus. Les auteurs ont quand même conclu à la présence probable d'un domaine protéase pour le HEV sur la base de l'identification d'aa conservés (C483 et H590) potentiellement impliqués dans le site catalytique (Koonin et al., 1992). Une vingtaine d'années plus tard, Parvez et collaborateurs ont réalisé une série de mutations d'aa conservés dans le domaine PCP. Ils établissent que 6 résidus cystéine (C457, C459, C471, C472, C481, C483) et 3 résidus histidine (H443, H497, H590), dont 2 avaient été considérés par Koonin et collaborateurs (Koonin et al., 1992) comme faisant partie du site catalytique putatif, étaient indispensables à la réplication du HEV-1 (Parvez, 2013). L'année suivante, Paliwal et collaborateurs ont exprimé et purifié le domaine protéase putatif (aa 440-610) de l'ORF1. Ces auteurs ont proposé une activité chymotrypsine-like protéase sur la base de la sensibilité de la PCP du HEV-1 à certains inhibiteurs et de sa capacité à cliver des substrats fluorogéniques spécifiques (Paliwal et al., 2014). Ils ont aussi suggéré que les résidus H443, C472, C481 et C483 étaient impliqués dans la formation du site catalytique de l'enzyme.

La même année, un modèle tridimensionnel du domaine protéase du HEV a été construit *in silico* en prenant comme modèle la protéase de RUBV (Parvez & Khan, 2014). Les auteurs ont identifié les résidus C434 / H443 (contrairement à H590, Koonin et al., 1992) comme étant essentiels à l'activité papaïne-like cystéine protéase. Un motif de liaison au zinc et trois ponts disulfure potentiels ont également été prédits dans cette région (Parvez & Khan, 2014).

Plus récemment, une région ordonnée, située entre 2 régions désordonnées et légèrement en aval des régions précédemment étudiées (aa 510-691), a été exprimée et purifiée en système bactérien (Proudfoot et al., 2019). L'analyse biochimique, biophysique et structurale de la protéine cristallisée a

permis d'identifier une région ayant une homologie de structure avec un domaine liant les acides gras (*Fatty acid binding domains*, FABD) et l'existence d'un site catalytique liant le zinc, suggérant une métalloprotéase. Les auteurs ont formé l'hypothèse que la fixation d'acides gras sur le FABD serait susceptible de réguler l'activité protéase et ainsi la maturation de l'ORF1 mais cela doit être vérifié en culture cellulaire.

Enfin, Saraswat et collaborateurs ont exprimé le domaine PCP (aa 432-592) de HEV-1 à l'aide du système baculovirus-cellules d'insectes. Douze inhibiteurs de différentes familles de protéases ont été testés et l'activité protéase du HEV s'est révélée être sensible aux inhibiteurs de cystéine protéase. Ces résultats, l'identification des résidus d'aa constituant le site catalytique (C483, H590 et N591) ainsi qu'un modèle de reconstitution tridimensionnelle ont permis aux auteurs de valider la nature de papaine-like protéase du domaine PCP du HEV (Saraswat et *al.*, 2020).

En conclusion, la nature précise du domaine PCP du HEV ainsi que ses limites précises sont encore sujets de débat dans la littérature. Deux hypothèses majeures ont été émises concernant la fonction du domaine PCP. La première hypothèse suggère que ce domaine possède une ou plusieurs activité(s) protéase(s) responsable(s) du clivage de la polyprotéine non structurale en différentes sous-unités fonctionnelles distinctes. La deuxième hypothèse suggère que la PCP ne serait pas responsable de la maturation de l'ORF1 et que la cible de son activité protéolytique pourrait être une protéine cellulaire (LeDesma et *al.*, 2019).

#### - **La région hypervariable (HVR)**

La région HVR est située directement en aval du domaine PCP putatif. Ce domaine est aussi nommé région polyproline (PPR) à cause de la fréquence importante des résidus proline dans cette région par rapport au reste de l'ORF1. La région HVR est limitée par 2 séquences conservées TLYTRTWS et RRLXLYPDG présentes respectivement à ses extrémités N- et C-terminales (Purdy et *al.*, 2012). Ces deux séquences exceptées, la variabilité de la composition en aa de la région HVR peut atteindre 71% selon les génotypes du HEV. Cette variabilité s'élève à 31% entre les isolats de HEV-1, 41% entre les isolats de HEV-3 et 46% entre les isolats de HEV-4 (Pudupakam et *al.*, 2009). La présence d'insertions et/ou de délétions dans la région HVR peut également causer des différences de taille entre les génomes des différents génotypes du HEV (LeDesma et *al.*, 2019).

La fonction la plus couramment décrite pour la région HVR serait qu'elle joue un rôle structural de charnière flexible entre les domaines ORF1 adjacents (Koonin et *al.*, 1992 ; LeDesma et *al.*, 2019). L'HVR (aa712-778) est intrinsèquement désordonnée, riche en aa polaires et chargés, pauvre en aa hydrophobes mais riche en résidus glycine et proline. Cette composition de la séquence aminée empêche la formation d'une structure tri-dimensionnelle robuste (Holla et *al.*, 2013 ; Purdy et *al.*,

2012). Par conséquent, la région HVR pourrait permettre des changements conformationnels susceptibles de réguler des interactions protéines-protéines (LeDesma et *al.*, 2019 ; Purdy et *al.*, 2012). Ces interactions de la protéine ORF1 avec d'autres protéines virales ou cellulaires pourraient être indispensables lors des étapes d'entrée ou d'assemblage du HEV (Parvez, 2017).

D'autres auteurs ont avancé l'hypothèse que l'HVR pouvait influencer le tropisme de l'hôte. En effet, la diversité de séquence de cette région intrinsèquement désordonnée est deux fois plus grande pour les HEV-3 et -4 qui sont zoonotiques par rapport à celle du HEV-1 dont la transmission est interhumaine, ce qui suggère une association entre l'hétérogénéité des séquences et l'étendue du spectre d'hôtes (Purdy et *al.*, 2012 ; LeDesma et *al.*, 2019). En plus, l'insertion d'un fragment de la protéine ribosomale humaine S17 s'est avérée élargir le spectre de l'hôte de la souche Sar-55 (HEV-1) *in vitro* permettant l'infection d'une lignée cellulaire provenant du hamster, suggérant également le rôle potentiel de l'HVR dans l'adaptation du virus à son hôte (Shukla et *al.*, 2012).

L'analyse d'isolats de HEV provenant de patients chroniquement infectés par le HEV a révélé que l'HVR pouvait acquérir des insertions au fil du temps, soit à partir d'autres régions du génome viral, soit à partir de gènes humains (Lhomme et *al.*, 2014 ; Johne et *al.*, 2014). Bien que la raison de ces insertions reste méconnue, l'insertion de séquences aminées provenant des protéines ribosomales humaines S17 et S19 dans la région HVR procure au HEV une capacité répliquative augmentée *in vitro* (Shukla et *al.*, 2012 ; Nguyen et *al.*, 2012). Dans ces deux études, les auteurs rapportent que les souches comportant les insertions ribosomales étaient, au départ, minoritaires dans les échantillons de selles des patients chroniquement infectés par le HEV. Puis, à la suite de plusieurs passages en culture cellulaire, elles sont devenues majoritaires, indiquant que ces insertions confèrent un avantage répliquatif en culture aux souches virales qui les hébergent. D'ailleurs, la souche Kernow-C1-p6 constitue l'une des souches de HEV la plus couramment utilisée en raison de sa meilleure capacité répliquative. En outre, un signal de localisation nucléaire (NLS) est présent au sein du fragment de la protéine ribosomale S17 insérée dans l'HVR de la souche p6. En 2015, Kenney et Meng ont montré qu'après transfection des protéines ORF1 des souches p6 (avec S17) et p1 (sans S17) en fusion avec la *Yellow Fluorescent Protein (YFP)*, l'ORF1 de la souche p6 présentait une localisation nucléaire qui n'était pas observée pour l'ORF1 de la souche p1. Les auteurs n'ont malheureusement pas pu détecter la protéine ORF1 endogène dans des cellules infectées. Par ailleurs, ils ont pu mettre en évidence la fonctionnalité du NLS en immunofluorescence à l'aide de mutants uniquement après transfection de l'HVR en fusion avec 3 copies de la *YFP* (Kenney et Meng, 2015a). Dans cette étude, la fonctionnalité du NLS n'a pas été validée avec la protéine ORF1 complète.

Enfin, d'autres études ont montré que l'HVR pouvait impacter l'infectiosité du HEV et sa capacité répliquative *in vivo* et *in vitro*. La délétion complète de l'HVR engendre une atténuation importante de l'infectiosité du HEV chez les porcs et les poulets (Pudupakam et *al.*, 2009). La même équipe a également montré que la délétion des parties C-terminale et centrale de l'HVR diminuait fortement l'efficacité de répliquon en cellules Huh-7, alors que la délétion de la partie N-terminale n'avait qu'un faible impact sur la répliquon du HEV (Pudupakam et *al.*, 2009). Cependant, le rôle spécifique de l'HVR dans le cycle de répliquon du HEV reste à élucider.

D'un point de vue pratique, étant donné qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique disponible dirigé contre la répliquase virale du HEV, l'HVR est considérée comme une région de prédilection favorable à l'insertion d'épitopes-étiquettes, ceux-ci pouvant permettre de suivre l'ORF1 dans les différents compartiments cellulaires grâce à des anticorps spécifiques (Szkolnicka et *al.*, 2019).

#### - Le domaine X

Comme pour les autres domaines de la répliquase virale du HEV, la fonction du domaine X a été initialement déduite sur la base d'alignements de séquences avec d'autres virus à ARN sb (+) (Koonin et *al.*, 1992). Par la suite, plusieurs études élucidant l'importance de cette région dans le cycle viral du HEV ont été réalisées. En revanche, sa fonction précise n'est pas caractérisée. Ce domaine est également connu sous le nom de «macrodomaine» à cause de son homologie de séquence avec des protéines humaines contenant des macrodomaines. Ces domaines lient l'ADP ribose (Karras et *al.*, 2005). En effet, l'ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à ajouter un ou plusieurs ADP-ribose(s) aux protéines. Ces ADP-ribosylations semblent nécessaires pour un certain nombre de processus biologiques y compris la transcription d'ARN et la réparation de l'ADN endommagé (Corda & Giroloma, 2003 ; Karras et *al.*, 2005).

Le domaine X du HEV lie le poly-ADP ribose avec une bonne affinité et pourrait jouer un rôle dans la répliquon virale et/ou la traduction (Neuvonen & Ahola, 2009 ; LeDesma et *al.*, 2019). Cette liaison a lieu même en présence d'un compétiteur poly-A et pourrait être médiée *via* un recrutement de facteurs cellulaires au complexe de répliquon (Neuvonen & Ahola, 2009). L'extrémité du domaine X du HEV interagit également avec l'extrémité C-terminale contenant le domaine catalytique de Met ainsi qu'avec la protéine ORF3 (LeDesma et *al.*, 2019 ; Anang et *al.*, 2016). De façon intéressante, le domaine X lie ces 2 protéines virales de façon compétitive ce qui, selon les auteurs, pourrait constituer un mécanisme régulateur du cycle viral (Anang et *al.*, 2016).

Le rôle du domaine X dans la répliquon a aussi été suggéré par des mutations (N809A, H812L, G816A, G817A ou G817V) localisées dans le site catalytique du domaine X de la souche Sar-55 du HEV-1, qui induisent une réduction sévère de la capacité répliquon du virus (Parvez, 2015). Des études

supplémentaires sur le domaine X s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre son rôle exact dans le cycle de réplication du HEV.

#### - **Le domaine hélicase (Hel)**

Les hélicases sont des enzymes capables de séparer les brins d'acides nucléiques en déroulant les structures secondaires et en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (Kadare & Haenni, 1997). Il existe trois superfamilles d'hélicases qui partagent deux motifs conservés, connus sous le nom de motifs Walker A et Walker B, qui structurent le domaine de liaison au NTP (LeDesma et al., 2019). Le domaine Hel du HEV est situé en aval du domaine X et appartient à la superfamille 1 dans laquelle sont retrouvées des hélicases d'*Alphavirus*, d'*Artérovirus*, de *Coronavirus* et de *Rubivirus* (Ahmad et al., 2011). Ces hélicases ont une activité de déroulement de l'ARN de l'extrémité 5' vers 3'.

Le domaine Hel du HEV possède 7 motifs caractéristiques de la superfamille 1 des hélicases (segments I, Ia, II, III, IV, V et VI) ; un domaine NTPase ainsi qu'un site de liaison à l'ARN ont également été identifiés par des analyses bio-informatiques (Koonin et al., 1992). Plus tard, cette activité NTPase a été mise en évidence expérimentalement dans un système d'expression hétérologue du domaine Hel (aa 960-1204) du HEV (Karpe & Lole, 2010a). Dans cette étude, la polarité (5' vers 3') de l'activité de déroulement de l'ARN a été confirmée ainsi que la préférence de l'enzyme pour les résidus rNTP par rapport aux dNTP. La même année, les mêmes auteurs ont montré que l'activité NTPase du domaine Hel était essentielle pour catalyser la première étape de la synthèse de la coiffe de l'ARN du HEV (Karpe & Lole, 2010b).

La contribution de chacun des 7 motifs de l'Hel a été étudiée en réalisant des mutants de délétion (Mhaindarkar et al., 2014). En conclusion de cette étude, il ressort que les motifs Ia et III sont essentiels à l'activité NTPase et au déroulement de l'ARN, alors que les autres domaines possèdent des fonctions alternatives non essentielles.

Des mutations ponctuelles dans le domaine Hel de la réplicase virale ont été identifiées dans des isolats de patients souffrant d'hépatite fulminante. Devhare et collaborateurs ont émis l'hypothèse que ces mutations pouvaient intensifier l'activité du domaine Hel et ainsi stimuler la réplication du HEV. Ils ont donc réalisé des mutations (V1120I, L1110F et les deux combinées) et ont montré qu'elles n'avaient que peu d'impact sur l'activité ATPase et altéraient l'efficacité de réplication du HEV-1 (Devhare et al., 2014). Une autre équipe ayant caractérisé l'impact sur la réplication du HEV-3 de la mutation V1213A, associée à des hépatites sévères dues au HEV-4, conclut également à une réplication moins efficace de ce mutant (Cao et al., 2018). Ces auteurs expliquent leurs résultats en posant l'hypothèse que les mutations détectées dans le domaine Hel seraient susceptibles de modifier les interactions de ce

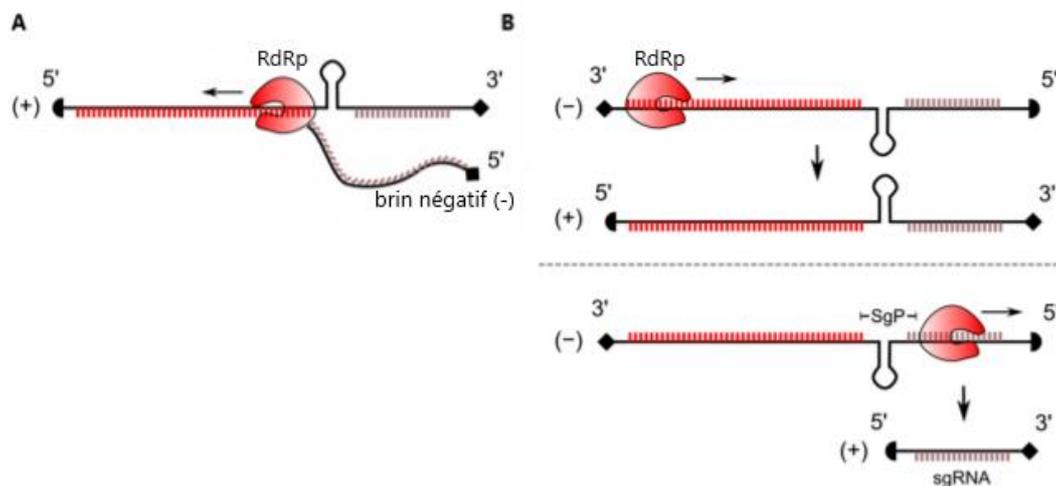
domaine avec des protéines virales ou cellulaires, ce qui aurait pour conséquence d'altérer la réponse immune et d'accroître la gravité de l'hépatite E (Devhare et *al.*, 2014 ; Cao et *al.* 2018).

En résumé, le domaine Hel de l'ORF1 du HEV présente des fonctions essentielles à l'accomplissement du cycle viral, notamment lors de la synthèse de la coiffe de l'ARN viral et de la réplication du génome. Une étude plus approfondie des fonctions assurées par ce domaine permettrait de mieux appréhender les conséquences des mutations qui y surviennent sur le plan clinique.

#### - Le domaine ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp)

La RdRp est indispensable à la réplication du génome d'une grande majorité de virus à ARN de polarité positive. La RdRp du HEV est localisée en aval du domaine Hel, est phylogénétiquement proche des RdRp des *Alphavirus*, *Rubivirus* et virus de plantes et fait partie de la superfamille III des RdRp (Koonin et *al.*, 1992). La RdRp du HEV possède un site catalytique formé de 3 résidus aminés (GDD) qui lie le magnésium (Kenney & Meng, 2019). Une mutation ponctuelle de GDD en GAD abolit entièrement la réplication du HEV (Emerson et *al.*, 2004).

Au cours du cycle de réplication du HEV, la RdRp transcrit d'abord l'ARN viral en un brin d'ARN intermédiaire de polarité négative qui est ensuite utilisé comme matrice pour la transcription du génome viral complet ainsi que de l'ARN sous-génomique (Fig. 11). La RdRp du HEV se fixe à l'extrémité 3'-UTR (*Untranslated region*) du brin d'ARN viral sens avec une affinité élevée, alors que sa liaison à l'extrémité 5'-UTR du brin anti-sens est moindre et encore plus faible pour la liaison au promoteur de l'ARN sous-génomique (Mahilkar et *al.*, 2016 ; LeDesma et *al.*, 2019) (Fig. 11). Cependant, la régulation fine de la fixation de la RdRp sur les différentes molécules d'ARN viral et son impact sur la cinétique de la transcription du HEV restent encore incomprises.



**Figure 11 : Transcription de l'ARN du HEV par RdRp.**

**A-**La RdRp du HEV se fixe à l'extrémité 3' du génome viral et transcrit un brin négatif de l'ARN viral. **B-** Le brin négatif formé en A sert de matrice pour la transcription du génome viral et de l'ARN sous-génomique (sgRNA). Figure adaptée de (LeDesma et *al.*, 2019).

Du fait de son faible niveau d'expression, la localisation subcellulaire de l'ORF1 reste encore controversée. La RdRp, combinée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et exprimée de façon stable dans des cellules hépatocytaires HepG2, se localise au niveau des membranes du RE, suggérant que, comme pour d'autres virus à ARN, le RE pourrait être le site de réplication du HEV (Rehman *et al.*, 2008). Cinq jours après transfection du génome viral complet dans des cellules hépatiques (Hep293TT), Szkolnicka et collaborateurs rapportent pourtant que l'ORF1 étiquetée avec un épitope HA ne colocalise pas avec les marqueurs cellulaires du RE ou des mitochondries mais qu'elle colocalise faiblement avec ceux de l'appareil de Golgi et du compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC). Par ailleurs, les coefficients de colocalisation les plus élevés (>0,6) ont été rapportés dans cette étude entre l'ORF1 et les tétraspanines CD63 et CD151, protéines transmembranaires, marqueurs d'exosomes (Szkolnicka *et al.*, 2019).

D'une manière générale, les RdRp virales interagissent souvent avec d'autres protéines virales et/ou cellulaires afin de constituer des plateformes de réplication virale. Ainsi, il a été suggéré que ces protéines cellulaires et virales pouvaient moduler les niveaux de transcription de l'ARN viral en modulant l'activité de la RdRp (LeDesma *et al.*, 2019). Dans le cas du HEV, le domaine RdRp interagit avec le domaine PCP mais aussi probablement avec les domaines Met et Hel qui exercent des fonctions complémentaires pour la transcription de l'ARN (Osterman *et al.*, 2015). De plus, la RdRp du HEV est capable d'interagir avec la protéine IFIT1 qui inhibe la traduction de l'ARN viral (Pingale *et al.*, 2019). La RdRp séquestre donc IFIT1 pour permettre la poursuite de la réplication virale. Un autre exemple d'interaction de la RdRp avec une molécule de l'hôte est la découverte d'un site de liaison du microARN miR-122 sur la séquence correspondant au domaine RdRp du HEV-1 (Haldipur *et al.*, 2018). Le miR-122, qui est le microARN le plus exprimé dans le foie, régule positivement la réplication du HEV comme cela a été observé pour HCV (Chang *et al.*, 2008).

Sur le plan clinique, plusieurs mutations dans la région RdRp du HEV ont été corrélées avec une évolution vers une forme grave de l'hépatite E (LeDesma *et al.*, 2019). Une étude réalisée en Inde, a comparé les séquences RdRp d'isolats provenant de femmes enceintes infectées par le HEV-1, souffrant d'hépatite E aiguë ou d'hépatite fulminante (Borkakoti *et al.*, 2017). Les auteurs ont associé la présence de mutations ponctuelles C1483W et N1530T dans la région RdRp avec la détection de charges virales élevées et la gravité des symptômes de l'hépatite fulminante chez la femme enceinte.

Enfin, une mutation ponctuelle G1634R, corrélée à une résistance au traitement par la ribavirine, a été observée dans le domaine RdRp chez des sujets immunodéprimés souffrant d'une hépatite E chronique (Debing *et al.*, 2016). D'autres mutations telles que les mutations Y1320H, G1634K, K1398R, V1479I et Y1587F ont été identifiées chez les patients infectés par le HEV-3 et ont pu être associées à

une capacité répliquative accrue du virus et ainsi expliquer la résistance à la ribavirine (Todt et al., 2018a).

### 2.1.3. Données sur la maturation de l'ORF1

La synthèse des études publiées dans la littérature ne permet pas de dégager un consensus quant à l'existence d'une maturation de l'ORF1 du HEV. En effet, la polyprotéine ORF1 exprimée en système hétérologue peut subir une maturation et générer plusieurs polypeptides (Ansari et al., 2000 ; Sehgal et al., 2006, **Tableau 1**). Néanmoins, ces résultats restent controversés puisque, jusqu'à présent, la maturation de l'ORF1 n'a pas été mise en évidence en système infectieux (Debing et al., 2016).

Les polyprotéines non structurales des virus à ARN simple brin sont généralement clivées par des protéases virales ou cellulaires. Les protéases sont classées en plusieurs groupes : aspartate-, cystéine-, métallo-, et thréonine-protéases. Les protéases de type papaine appartiennent à la famille des cystéine-protéases (Lecaille et al., 2002). De nombreuses données sont en faveur de la maturation de l'ORF1 en plusieurs sous-unités fonctionnelles. D'ailleurs, l'expression de l'ORF1 dans le système baculovirus-cellules d'insectes a montré que le domaine PCP était capable de cliver la réplicase virale du HEV en 9 sous-unités (**Tableau 1**). Certains produits de clivage étaient inhibés en présence d'E-64d, un inhibiteur de cystéine protéases (Sehgal et al., 2006). Par contre, d'autres auteurs défendent une activité protéase chymotrypsine-like (Paliwal et al., 2014). Dans cette étude, le domaine PCP (aa 440-610) exprimé en système bactérien puis purifié a été incubé avec les domaines Met-PCP, Hel-RdRp de l'ORF1 et avec l'ORF2. Dans les 3 cas, des produits de clivage ont été observés (**Tableau 1**) et le clivage de l'ORF1 a pu être inhibé par le PMSF et la chymostatine, des inhibiteurs de protéase chymotrypsine-like (Paliwal et al., 2014).

Le clivage de l'ORF1 a également été révélé après transfection des cellules Huh-7 S10-3 avec un vecteur exprimant l'ORF1 du HEV-1 étiquetée avec 2 épitopes : HA en N-terminal et Histidine en C-terminal. Après immunoprécipitation des lysats cellulaires, 2 fragments de 35 kDa et 78 kDa ont été détectés en N- et C-terminal, respectivement (Parvez, 2013, **Tableau 1**). L'analyse de l'impact de plusieurs mutations de résidus aminés dans le domaine X et dans le site catalytique putatif du domaine PCP ont conduit cet auteur à suggérer que l'activité catalytique du domaine PCP serait importante dans la réplication du HEV et que le domaine X pourrait en être le substrat (Parvez, 2013).

D'autres études ont suggéré l'implication d'une nouvelle protéase virale (autre que le domaine PCP) ou de protéases cellulaires dans le clivage de l'ORF1 (Ropp et al., 2000). En effet, dans cette étude, les auteurs ont muté le résidu cystéine 483 du site catalytique (Koonin, 1992) mais n'ont pas réussi à inhiber le clivage de l'ORF1 en deux sous-produits à l'extrémité C-terminale (107 kDa) et N-terminale (78 kDa). L'implication de protéases cellulaires dans la maturation de l'ORF1 a été rapportée plus

récemment (Kanade *et al.*, 2018). Précisément, la présence d'un site putatif de clivage par le facteur cellulaire Xa a été localisée en C-terminal du domaine PCP. Deux autres sites de clivage par la thrombine ont été identifiés dans le domaine X et entre les domaines Hel et RdRp (Kanade *et al.*, 2018). Ces sites de clivage sont conservés dans tous les génotypes. La digestion par la thrombine des domaines X-Hel et Hel-RdRp a été mise en évidence *in vitro*. Des mutations au sein de leurs séquences consensus ont induit une inhibition de la réplication virale. De plus, le traitement par un inhibiteur de sérine protéases actif sur le facteur Xa et la thrombine de cellules Huh-7 S10-3 électroporées avec un réplicon HEV-1 a fortement diminué la réplication virale. Ces résultats suggèrent que le facteur Xa et la thrombine seraient impliqués dans la maturation de l'ORF1 et que leurs activités catalytiques seraient cruciales pour la réplication virale (Kanade *et al.*, 2018).

Des données en défaveur du clivage de la protéine ORF1 ont également été publiées. En utilisant des systèmes d'expression hétérologue procaryote et eucaryote ainsi qu'un système d'expression *in vitro*, aucune maturation de la polyprotéine ORF1 n'a été observée après 24h (Ansari *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont transfecté des cellules 293T avec un vecteur d'expression dans lequel ils ont inséré l'ORF1 de souches HEV-1 ou HEV-3 (Suppiah *et al.*, 2011). Aucun clivage d'aucune des 2 polyprotéines n'a été détecté contrairement aux résultats précédemment publiés par cette même équipe (Ropp *et al.*, 2000) et contrairement à la détection des produits de clivage attendus pour la polyprotéine de RUBV qui constituait un contrôle positif dans cette étude (Suppiah *et al.*, 2011). En 2013, Pertillä et collaborateurs ont mis en évidence des produits de clivage de l'ORF1 exprimée *in vitro* (130 kDa en N-terminal et 57 kDa en C-terminal, **Tableau 1**). Cependant, après transfection de l'ORF1 de pleine longueur et marquage métabolique des cellules Huh-7 et HeLa, aucun produit de clivage évident n'a pu être détecté (Pertillä *et al.*, 2013). Ceci a conduit les auteurs à interpréter les produits de 130 kDa et 57 kDa obtenus *in vitro* comme le résultat d'une dégradation protéolytique. En conséquence, l'existence d'une maturation de l'ORF1 ainsi que l'implication du domaine PCP du HEV ou d'autres protéases de la cellule hôte dans ce processus sont encore controversées.

**Tableau 1 : Données bibliographiques concernant la maturation de l'ORF1.**

Système d'expression	Lignée cellulaire/bactérie	Construction	Evidence de maturation	Produits de maturation	Références
Virus de la vaccine	Cellules HeLa, HepG2, Vero ...	ORF1 étiquetée	Oui	Ext. N-terminale : <b>107</b> kDa Ext. C-terminale : <b>78</b> kDa	Ropp et <i>al.</i> , 2000
Transfection <i>in vitro</i> et culture bactérienne	HepG2 E.coli JM109	ORF1 étiquetée	Aucune		Ansari et <i>al.</i> , 2000
Système baculovirus/cellules	Cellules d'insectes T.ni	ORF1 étiquetée	Oui	*Ext. N-terminale : <b>122, 106, 93, 59, 26</b> kDa *Ext. C-terminale : <b>98, 47, 35</b> et <b>22</b> kDa	Sehgal et <i>al.</i> , 2006
Culture <i>in vitro</i> (vecteur d'expression)	293T	ORF1 étiquetée	Aucune		Suppiah et <i>al.</i> , 2011
Expression <i>in vitro</i>	Transfection Cellules Huh-7 et HeLa	ORF1 étiquetée Forme complète de l'ORF1	Oui Non	<b>130</b> et <b>57</b> KDa (dégradation)	Pertilla et <i>al.</i> , 2012
Réplicon du HEV-1 (souche Sar55)	Huh-7 S10-3	ORF1 étiquetée	Oui	*Ext. N-terminale : <b>35</b> kDa *Ext. C-terminale : <b>78</b> kDa	Parvez, 2013
Réplicon HEV	Hep293TT	ORF1 étiquetée	Aucune		Szkolnicka et <i>al.</i> , 2019
Transfection avec l'ARN vir	HepG2-C3A	Forme complète de l'ORF1	Aucune		Ju et <i>al.</i> , 2020
Culture bactérienne	<i>E.coli</i> C43	Domaines : Met-PCP Hel-RdRp	Oui	<b>35</b> kDa <b>55, 35</b> kDa	Paliwal et <i>al.</i> , 2014
Culture bactérienne	<i>E.coli</i>	Domaines : X-Hel Hel-RdRp	Oui	<b>25</b> kDa <b>25</b> kDa	Kanade et <i>al.</i> , 2018

## 2.2 La protéine ORF2

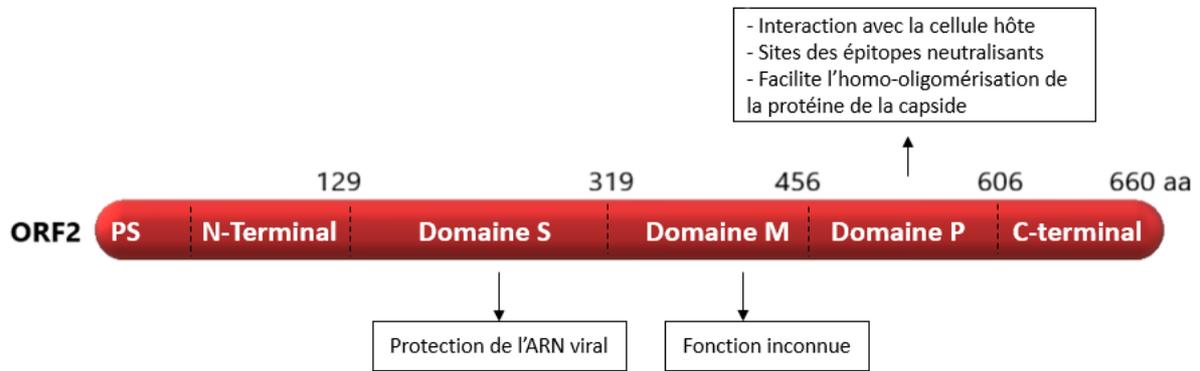
Le cadre de lecture ORF2 code pour la protéine ORF2 qui est la protéine de capsid du HEV. Cette protéine de 660 aa (**Fig. 12**) a une poids moléculaire théorique de 72 kDa (Lin & Zhang, 2021). La séquence de l'ORF2 présente un peptide signal (PS) en position N-terminale (23 premiers aa) et trois sites potentiels de N-glycosylation nommés N1, N2 et N3 au niveau des asparagines 137, 310 et 562.

L'expression de formes tronquées de l'ORF2 (aa 112-608) dans des cellules d'insectes (les cellules SF9 et les cellules Tn5) permet une production massive de pseudo-particules virales (VLP), qui sont des particules sub-virales dépourvues de génome viral (Li *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2005). Ainsi, des analyses structurales de pseudo-particules virales a révélé l'existence de trois domaines dans l'ORF2: un domaine Shell (S, aa 129-319), un domaine Middle (M, aa 320-455) et un domaine Protruding (P, aa 456-606) (Yamashita *et al.*, 2009).

Le **domaine S**, en formant la structure interne de la particule virale, aurait une fonction protectrice de l'ARN viral (Coulibaly *et al.*, 2005). Il est constitué de 8 feuillets bêta anti-parallèles disposés en sandwich et de 4 hélices alpha (Yamashita *et al.*, 2009).

Le **domaine M** forme une structure torsadée constituée de 6 feuillets bêta et de 4 hélices alpha. Il serait exposé à la surface de la particule et est associé au domaine S (Yamashita *et al.*, 2009).

Le **domaine P** est lié au domaine M par une région riche en prolines. Il est constitué de feuillets bêta torsadés. Le domaine P serait le domaine le plus exposé à la surface des particules et formerait des protrusions à la surface virale. Il interviendrait dans l'interaction des virions avec la cellule hôte et contient des épitopes neutralisants (Yamashita *et al.*, 2009). Comme décrit précédemment, plusieurs épitopes de ce domaine ont d'ailleurs été impliqués dans des projets de développement de vaccins contre le HEV (Schofield *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2015). Il a été montré que certains anticorps, produits à la suite d'immunisation avec l'un de ces épitopes, bloquaient l'infection par le HEV chez les primates non humains (Schofield *et al.*, 2000). Le domaine P contiendrait également un motif d'homo-oligomérisation de la protéine ORF2. En effet, la délétion des aa 585-610 induit une perte de l'oligomérisation. De plus, plusieurs résidus tels que la Y557, la T564, la V598, la A599 et la L601 du domaine P semblent être cruciaux pour la dimérisation du domaine (Li *et al.*, 2009). Étant donné que les pseudo-particules virales représentent un antigène efficace pour la détection des immunoglobulines spécifiques du HEV (IgG et IgM) et contiennent des épitopes dominants des lymphocytes T et B (Li *et al.*, 1997 ; Aggarwal *et al.*, 2007), ils sont utilisés dans des tests ELISA développés pour le diagnostic du HEV (Chen *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2008 ; Mazalovska *et al.*, 2017 ; Taherkhani *et al.*, 2014).



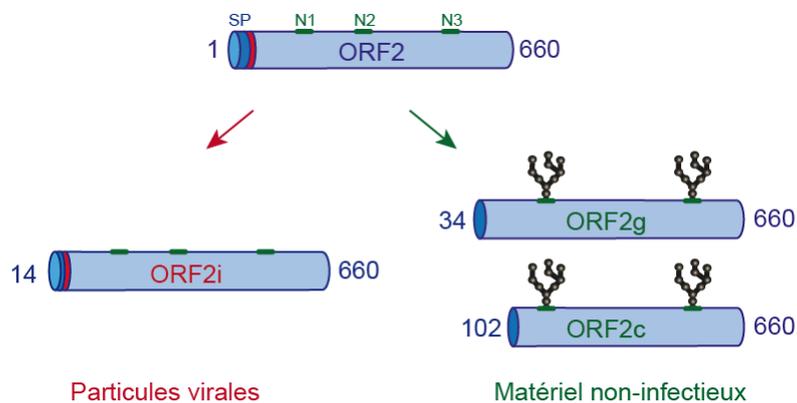
**Figure 12: Représentation schématique des différents domaines de la protéine de capsid du HEV.**

Les différents domaines sont indiqués. Les nombres au-dessus des différents domaines indiquent les résidus d'aa de la protéine de capsid. Les fonctions connues des domaines sont indiquées dans les cases inférieures. PS : peptide signal ; domaine S : domaine shell ; domaine M : domaine intermédiaire ; domaine P : protruding domain. Adaptée de (Lin and Zhang, 2021).

Au laboratoire, il a été montré qu'au moins trois formes de l'ORF2 sont produites au cours du cycle infectieux du HEV (Montpellier et *al.*, 2018) (**Fig. 13**):

-la forme **ORF2i** est la forme associée aux **particules infectieuses**. Cette protéine d'environ 80 kDa n'est pas N- ou O-glycosylée. Sa séquence précise a été déterminée et son extrémité N-terminale séquencée. Elle est constituée des résidus 14 à 660.

-les formes **ORF2g et ORF2c** sont des protéines massivement secrétées mais ne sont **pas associées à du matériel infectieux**. Ces deux formes font respectivement environ 90 kDa et 75 kDa. Elles sont N-glycosylées, O-glycosylées et sialylées. Leur séquence précise a également été déterminée et leur extrémité N-terminale séquencée. Le premier aa de l'ORF2g correspond à la Ser34 et le premier aa de l'ORF2c est la Ser102. La forme ORF2c est un produit de clivage de la protéine ORF2g (Ankavay et *al.*, 2019 ; Hervouet, Ferrié et Ankavay, 2021). Les protéines ORF2g/c ne forment pas de matériel particulaire.



**Figure 13 : Représentation schématique des différentes formes d'ORF2 produites au cours du cycle infectieux du HEV.**

Au cours de son cycle infectieux, le HEV sécrète une quantité importante de formes glycosylées de la protéine de capsid (nommées ORF2g et ORF2c) au niveau du surnageant des cellules productrices ainsi qu'au niveau des sérums des patients infectés par ce virus. Ces deux formes ne sont pas associées au génome viral. En revanche, ORF2i est associée aux particules virales et n'est pas glycosylée (Montpellier et *al.*, 2018). La protéine ORF2 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation, notés N1 à N3, mais seuls N1 et N3 sont glycosylés. SP : peptide signal (représenté en rouge). Adaptée à partir de (Hervouet, Ferrié et Ankavay, 2021)

Parmi les trois sites potentiels de N-glycosylation de l'ORF2 qui sont le N1 (137NLS), le N2 (310NLT) et le N3 (562NTT), seuls les sites N1 et N3 sont glycosylés sur les protéines ORF2g et ORF2c. De plus, la N-glycosylation de l'ORF2 n'est pas impliquée dans l'assemblage et l'infectiosité des particules virales du HEV (Ankavay et *al.*, 2019).

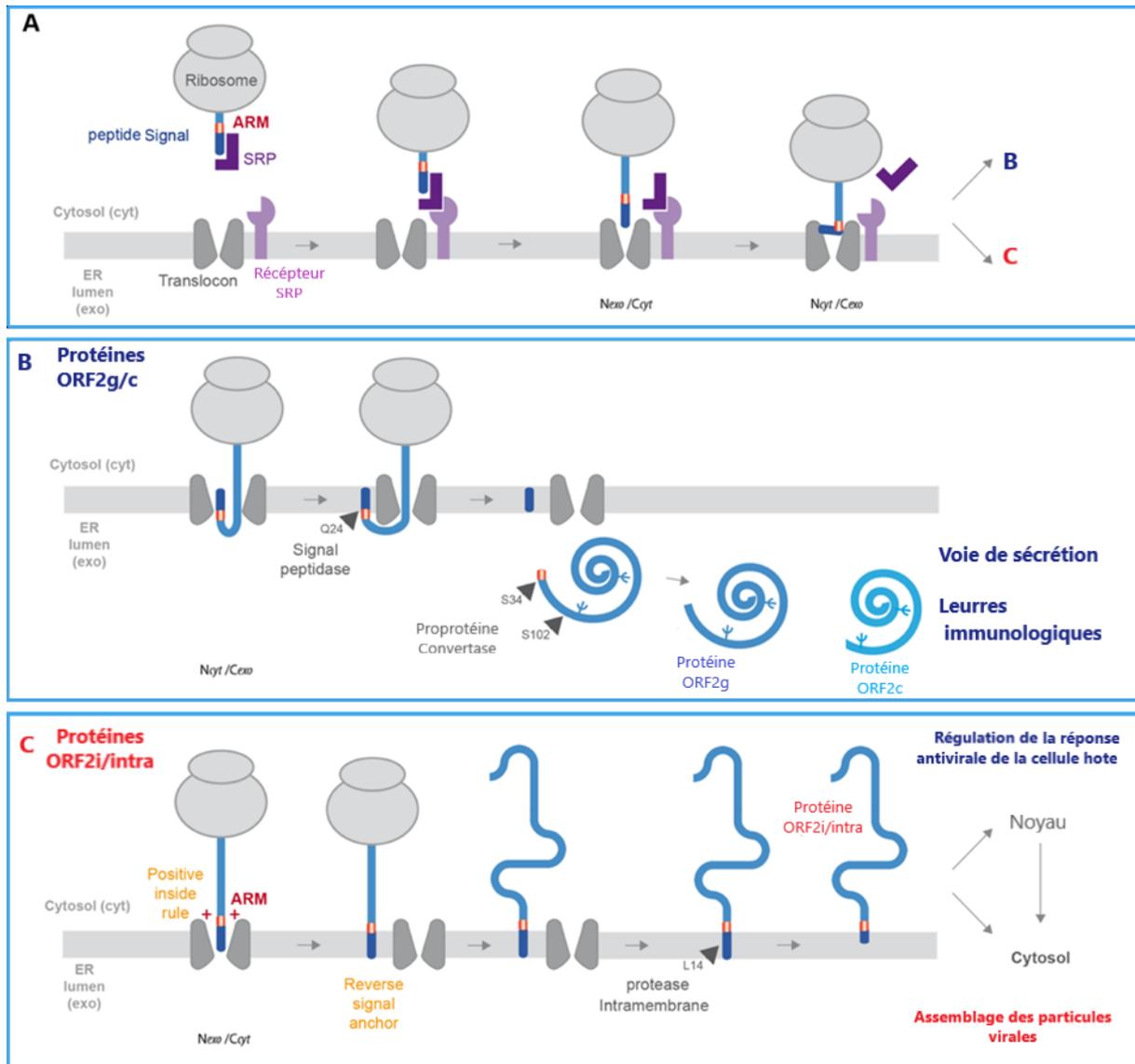
L'identification des formes de la protéine ORF2 a conduit le laboratoire à émettre l'hypothèse qu'il existerait un mécanisme de régulation fine de l'expression de la protéine de capsid et que celle-ci pourrait suivre deux voies de production :

- **Une voie productive conduisant à l'expression de la protéine ORF2i.** Dans cette voie, le PS de l'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.

- **Une voie non-productive conduisant à la sécrétion massive des protéines ORF2g/ORF2c.** 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. La protéine ORF2g suivrait alors la voie de sécrétion où elle subirait des modifications post-traductionnelles : maturation des N-glycanes, O-glycosylation, sialylation et maturation par des protéases pour générer notamment la forme ORF2c.

Une autre étude a confirmé l'existence de plusieurs formes de l'ORF2. Dans cette étude, il a été suggéré que la forme ORF2 associée aux particules virales (nommée ORF2c dans leur étude) serait issue d'une ré-initiation de la traduction à partir d'un AUG interne situé au codon 16 en aval du premier codon AUG. La forme glycosylée (nommée ORF2s dans leur étude) ne contiendrait pas de domaine de liaison au récepteur cellulaire mais est capable d'inhiber la neutralisation par des anticorps (Yin et *al.*, 2018).

Lors de la caractérisation de la glycosylation de l'ORF2 (Ankavay et *al.*, 2019), le laboratoire a également montré que la protéine ORF2 présente une localisation nucléaire, indépendante de son statut de glycosylation, au cours du cycle infectieux du HEV. Ces résultats confirmaient les résultats obtenus par Lenggenhager et collaborateurs sur des biopsies de foies de patients infectés par le HEV, publiés peu de temps auparavant (Lenggenhager et *al.*, 2017).



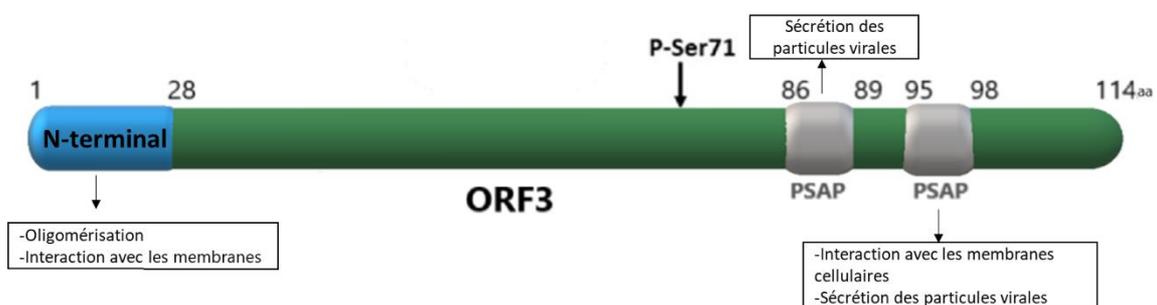
**Figure 14 : Modèle de régulation d'adressage de la protéine ORF2 par l'ARM.**

**A-** La particule de reconnaissance du peptide signal (SRP) reconnaît le peptide signal de la protéine ORF2 qui émerge du ribosome lors de la traduction. Par la suite, le complexe ribosome-protéine-SRP est transloqué vers la membrane du RE *via* une interaction de la SRP avec son récepteur. **B-** Le peptide signal s'insère initialement dans une orientation Nexo/Cyt, puis inverse son orientation en Ncyt/Cexo. L'extrémité C-terminale du peptide signal est exposée à la lumière du RE et est clivée par une signal peptidase, générant ainsi un nouveau N-terminal. La traduction reprend alors, l'ORF2 néosynthétisée est transloquée dans la lumière du RE où elle est glycosylée et subit probablement une maturation par des proprotéines convertases. Cette voie génère les deux formes glycosylées ORF2g/c. **C-** Pour une fraction d'ORF2, l'ARM conduit le peptide signal de l'ORF2 à conserver son orientation Nexo/Cyt. La protéine ORF2 ancrée au niveau de la membrane du côté cytosolique est probablement ensuite reconnue par une protéase intra-membranaire afin de générer l'ORF2i /ORF2intra qui est transloquée dans le noyau et rejoint le site d'assemblage des particules virales. Adaptée de (Hervouet, Ferrié, Ankavay et al, 2021)

Le laboratoire a donc réalisé une étude approfondie des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à la biogenèse des différentes formes de l'ORF2 (Hervouet, Ferrié, Ankavay, et *al.* 2021). La caractérisation poussée d'une série de mutants et de chimères de l'ORF2 a permis de démontrer qu'il existe un mécanisme de régulation fine de l'expression de la protéine de capsid ORF2. En effet, un motif de 5 aa riche en arginine (**ARM**), situé dans la région N-terminale de l'ORF2, a été identifié comme un régulateur central des localisations subcellulaires et des fonctions des différentes formes de l'ORF2 (**Fig. 14**). L'ARM contrôle la translocation nucléaire de l'ORF2, favorisant la régulation des réponses antivirales de l'hôte. Ce motif régule également la double topologie et la fonctionnalité du PS de l'ORF2, conduisant à la production de la forme ORF2i infectieuse cytosolique ou des formes ORF2g/c glycosylées non infectieuses réticulaires. En outre, l'ARM sert également de site de clivage de la protéine ORF2g sécrétée par la furine. Enfin, il favorise l'association membranaire de l'ORF2 qui est probablement essentielle pour l'assemblage des particules virales (Hervouet, Ferrié, Ankavay, et *al.* 2021).

### 2.3 La protéine ORF3

L'ORF3 est une petite protéine multifonctionnelle de 13 kDa (appelée également VP13) (**Fig. 15**). Sa traduction commence en amont de la séquence de la protéine ORF2. Plusieurs équipes ont montré que cette petite protéine virale régulatrice est immunogène (Osterman et *al.*, 2012 ; Yang et *al.*, 2016). L'ORF3 est enchâssée dans la membrane des virions quasi-enveloppés circulant dans le sérum des patients infectés ou des particules produites en culture cellulaire. L'ORF3 n'est plus associée aux particules virales nues après le retrait de l'enveloppe (Okamoto et *al.*, 2011 ; Qi et *al.*, 2015). Il a été montré que la protéine ORF3 interagit avec la protéine ORF2 non glycosylée (Tyagi et *al.*, 2002) et que la phosphorylation du résidu Ser71 du HEV-1 (ou Ser70 du HEV-3) de l'ORF3 est essentielle pour son interaction avec la protéine de capsid (Zafrullah et *al.*, 1997 ; Tyagi et *al.*, 2002).



**Figure 15 : Représentation schématique de la protéine ORF3.**

Adaptée de (Lin & Zhang, 2021).

Il a été montré que l'absence de phosphorylation de l'ORF3 n'a pas d'effet majeur sur la réplication virale chez des primates non humains (Graff et *al.*, 2005). En effet, il s'avère que l'ORF3 n'est pas

nécessaire pour la réplication virale (Graff et *al.*, 2006) mais joue un rôle primordial dans l'infectiosité du HEV *in vivo* (Graff et *al.*, 2005a ; Huang et *al.*, 2007).

Au cours du cycle infectieux du HEV, l'ORF3 forme un oligomère et s'associe aux membranes grâce à son extrémité N-terminale et notamment des résidus cystéine palmitoylés (Gouttenoire et *al.*, 2018). L'ORF3 serait orientée du côté cytosolique des membranes. Il a été suggéré que deux domaines N-terminaux hydrophobes de l'ORF3 médient son association avec les microtubules facilitant éventuellement la sécrétion des particules virales (Kannan et *al.*, 2009). Plusieurs études suggèrent l'implication du gène de sensibilité aux tumeurs 101 (TSG101) et de la voie des corps multi-vésiculaires (MVB) lors de la sécrétion des particules virales du HEV. En effet, deux motifs **PXXP** (un motif en position 86-89 et un motif en position 95-98) dans l'ORF3 sont importants pour la sécrétion des particules infectieuses du HEV. L'ORF3 interagit avec le TSG101 via le **motif PSAP 95-98** facilitant ainsi la libération des particules sécrétées (Emerson et *al.*, 2010 ; Nagashima et *al.*, 2011). En plus d'interagir avec la voie MVB, il a été suggéré que l'ORF3 possède une activité viroporine de classe I permettant la formation d'un canal ionique pour la libération virale. La mutation des deux motifs PXXP de l'ORF3 abroge la libération des particules virales. En revanche, elle n'affecte pas l'activité viroporine de cette protéine virale (Ding et *al.*, 2017a).

#### 2.4 La protéine ORF4

L'ORF4 a été identifiée chez le HEV-1 dans la séquence codante de l'ORF1 (du nucléotide 2835 au nucléotide 3311). Cet ORF code la protéine virale ORF4 qui est produite uniquement dans des conditions de stress du RE. Il a également été suggéré que l'expression de la protéine ORF4 dépend de la coiffe de l'ARN viral et qu'elle est médiée par une initiation interne (Nair et *al.*, 2016). La protéine ORF4 a comme fonction de stimuler l'activité de la polymérase virale de la protéine ORF1 (Nair et *al.*, 2016). La fonction exacte de l'ORF4 reste méconnue et l'utilisation d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques semble nécessaire pour mieux comprendre l'utilité de cette protéine virale (Lin & Zhang, 2021).

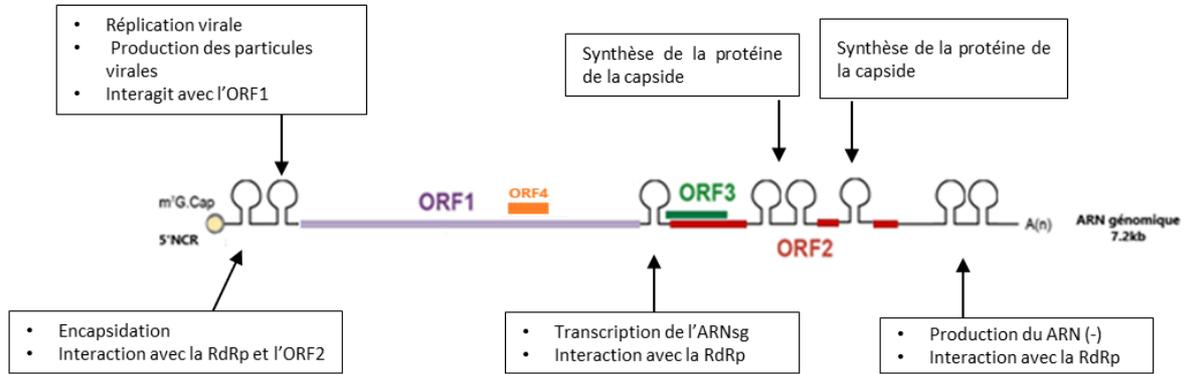
#### 2.5 Les éléments régulateurs

Le génome du HEV contient des éléments régulateurs agissant en *cis* appelés CRE. Deux éléments ont d'abord été décrits, l'un au niveau de la région 3' non codante (3'NCR) et de l'extrémité 3' de l'ORF2 jouerait un rôle important dans la réplication génomique et l'autre serait le promoteur de la synthèse de l'ARN sous-génomique (SgP). Ces deux régions contiennent des résidus hautement conservés dans divers génotypes du HEV (**Fig. 16**) (Cao et *al.*, 2010 ; Aggrawal et *al.*, 2001). Ces régions présentent également des homologies de séquences avec celles présentes chez les *Alphavirus*, tels que le virus Sindbis et le virus de la forêt de Semliki, qui suivent le même mécanisme de réplication que le HEV (Niesters & Strauss, 1990).

La réplication du HEV est initiée par la transcription à partir de l'ARN(+) d'un ARN matrice anti-sens (-) complémentaire. Cette initiation de la transcription nécessite la liaison de la RdRp à la région 3' de l'ARN(+) (LeDesma et *al.*, 2019). Une étude a suggéré que la présence de deux structures en boucle situées au niveau des nucléotides 7089-7163 et 7173-7194 ainsi que la queue poly-A en 3' semblent nécessaires pour l'interaction avec la RdRp. La mutation de ces régions ou bien la délétion de la queue poly-A entraînent une réduction de la liaison de la RdRp à l'ARN viral induisant un blocage de la réplication (Aggrawal et *al.*, 2001).

Le SgP est une séquence conservée située entre les nucléotides 5080-5132 permettant la synthèse de l'ARN sous-génomique (ARNsg) (Cao et *al.*, 2010 ; Ding et *al.*, 2018 ; Cao et *al.*, 2018). Il couvre trois régions : la région codante 3' de l'ORF1 (du nucléotide 5080 jusqu'au nucléotide 5109), la région de jonction entre l'ORF1 et le site de début de la transcription de l'ORF3 (transcriptional start site-TSS) et d'un élément génétique constitué de 9 nucléotides situé entre le TSS et le site d'initiation de la traduction de l'ORF3 (LeDesma et *al.*, 2019). Le SgP est requis pour la transcription de l'ARNsg bi-cistronique, codant à la fois pour les protéines ORF3 et ORF2, médiée par la RdRp. D'ailleurs, les mutations dans la séquence du SgP abolissent la traduction des protéines ORF3 et ORF2 (Huang et *al.*, 2007). Des mesures de mobilité électrophorétique de la protéine RdRp ont montré qu'elle présente une affinité de liaison plus élevée pour la région 3' NCR que pour le SgP. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement les interactions entre ces différentes structures (Aggrawal et *al.*, 2001).

Emerson et collaborateurs ont également rapporté la présence de deux éléments régulateurs qui forment des boucles internes dans la région centrale de l'ORF2 appelées ISL1 et ISL2 (pour internal stem loops). Des mutations silencieuses introduites dans ces éléments entraînent une réduction de la synthèse de l'ORF2 illustrant leur importance dans le cycle viral du HEV (Emerson et *al.*, 2013). Plus récemment, deux éléments *cis* ont été rapportés : le premier situé dans le domaine Met de l'ORF1 (nucléotides 102-131) et le deuxième présent au niveau de l'extrémité C-terminale de l'ORF2 (nucléotides 7311-7340). Ces deux éléments semblent cruciaux à la fois pour la réplication virale ainsi que pour la production de particules virales. Ces deux éléments seraient capables de recruter l'ORF1 dans le complexe de réplication du HEV (Ju et *al.*, 2020).



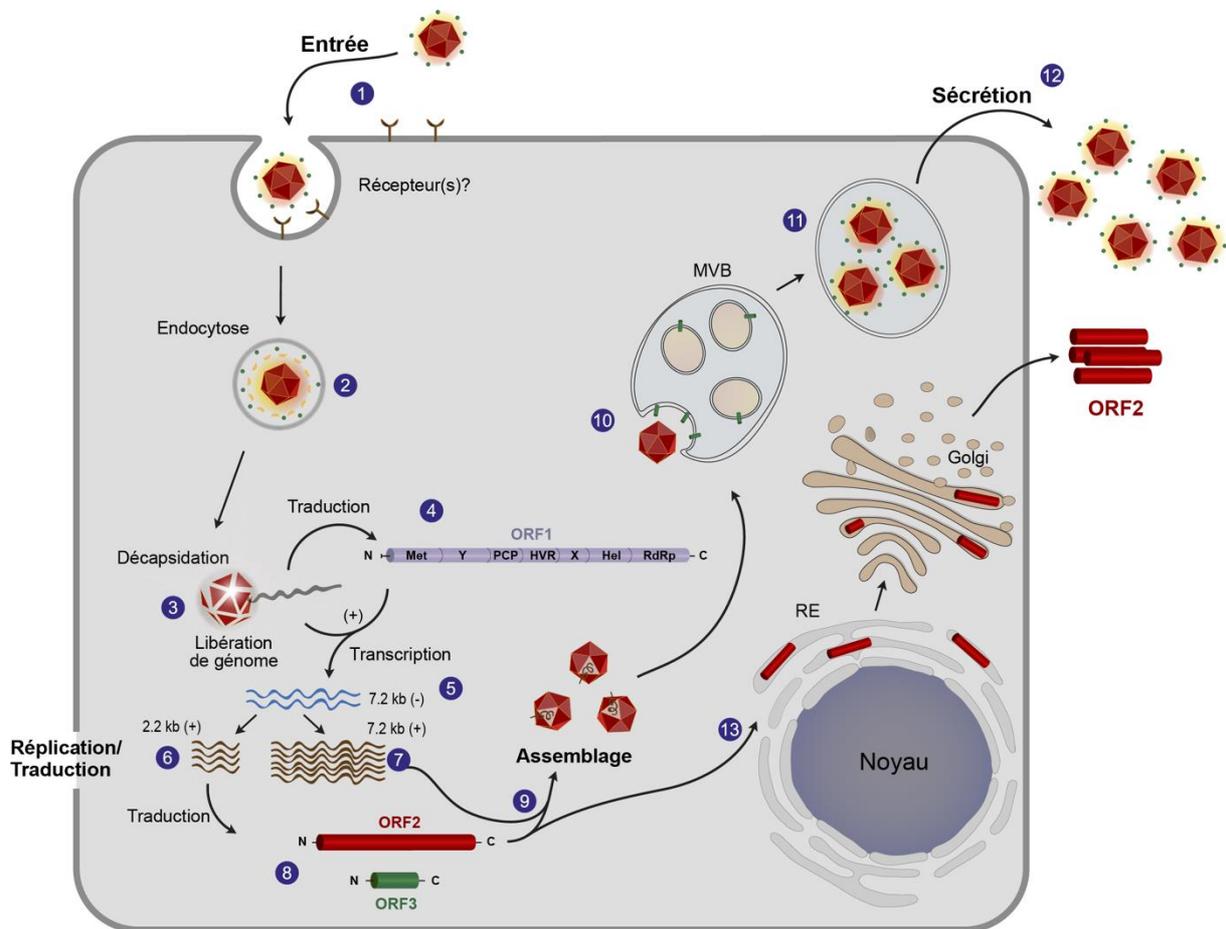
**Figure 16 : Les éléments cis-régulateurs du HEV et leurs fonctions associées.**

La réplicase virale est représentée en violet. L'ORF2 est en rouge. L'ORF3 est en vert. L'ORF4, colorée en orange, a été identifiée récemment dans le cas de génome viral de HEV-1. NCR : régions non codantes, m<sup>7</sup>G.Cap: coiffe 5'-methylguanosine cap, A(n) : queue poly-Adénosine. Adaptée de (LeDesma et *al.*, 2019 ; Emerson et *al.*, 2013 ; Ju et *al.*, 2020).

Actuellement, aucune étude n'a fourni de données sur la cinétique de production des ARN simple brin de polarité négative, de l'ARN (+) ainsi que de l'ARNsg au cours du cycle de réplication du HEV (LeDesma et *al.*; 2019).

### 3. Cycle de réplication du HEV

Du fait de la difficulté à amplifier le HEV en culture cellulaire, les étapes précises du cycle infectieux du HEV restent à définir (**Fig. 17**). La première étape est l'attachement et l'entrée des particules virales dans la cellule hôte. Les particules nues et les HEV quasi-enveloppées utiliseraient des mécanismes différents (Yin & Feng, 2011). Les virions nus du HEV s'attacheraient à la surface cellulaire de manière aspécifique en utilisant des protéoglycanes à héparine sulfate (HSPG) tandis que les virions quasi-enveloppés se fixeraient à la cellule hôte indépendamment des molécules HSPG (Yin et *al.*, 2016). Les récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée du HEV ne sont pas connus à ce jour. L'entrée des particules quasi-enveloppées impliquerait une endocytose par une voie dépendante de la clathrine, de la dynamine-2, de Rab5/Rab7 et du cholestérol (Yin et *al.*, 2016 ; Kapur et *al.*, 2011 ; Holla et *al.*, 2015 ; Ankavay et *al.*, 2018 ). Le mécanisme d'entrée des particules non enveloppées reste à définir.



**Figure 17: Cycle infectieux du HEV.**

**1.** Le HEV initie son cycle en interagissant de manière peu spécifique avec la surface de la cellule cible avant d’interagir avec un ou plusieurs récepteurs spécifiques non encore identifiés. **2.** Les particules virales seraient ensuite internalisées dans la cellule par endocytose. **3.** Dans le cytoplasme, la dissociation de la capsid virale permettrait la libération du génome viral. **4.** La protéine ORF1, contenant la réplicase virale, serait immédiatement synthétisée par la machinerie de traduction cellulaire. **5.** La présence de la réplicase virale conduirait à la synthèse d’ARN simple brin de polarité négative (-) à partir de l’ARN génomique de polarité positive (+). Ces ARN(-) serviraient de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN(+) sous-génomiques d’environ 2,2 kb (**6**) et génomiques d’environ 7,2 kb (**7**). **8.** Les protéines ORF2 et ORF3 seraient ensuite traduites à partir des ARN sous-génomiques. La protéine ORF2 suivrait deux voies : une voie productive (**9**) dans laquelle cette protéine s’assemble avec l’ARN(+) génomique pour former des virions ; ces virions (**10**), présents au niveau des MVB seraient ensuite enveloppés d’une couche lipidique (**11**) dans laquelle la protéine ORF3 viendrait s’insérer. **12.** Les virions seraient ensuite sécrétés grâce à l’ORF3. **13.** Dans la voie non productive, la grande majorité de la protéine ORF2 est transloquée dans la lumière du RE pour suivre la voie de sécrétion classique des protéines. Cette voie utilisée par l’ORF2 n’aboutit pas à la formation de particules virales.

En entrant dans la cellule hôte et après décapsidation, l’ARN viral est libéré dans le cytosol où il est traduit par la machinerie cellulaire pour produire la réplicase virale du HEV. La 7-méthylguanosine au niveau de la région 5’UTR du génome du HEV recrute la sous-unité ribosomale 40S permettant d’initier la traduction du ARN viral (Lin & Zhang., 2021).

Une fois produite, la RdRp de la réplicase virale initie la transcription de l’ARN génomique viral en se liant à son extrémité 3’UTR pour produire l’ARN intermédiaire de polarité négative (Mahilkar et al.,

2016). Ce dernier sert de matrice pour la production de nouveaux ARN génomiques de polarité positive de 7,2kb ainsi que pour la production des ARN sous-génomiques de 2,2kb (Lin & Zhang., 2021). Ces ARN sous-génomiques sont par la suite coiffés et polyadénylés et sont traduits en protéines virales ORF2 et ORF3 (Lin & Zhang., 2021). La protéine ORF2 est massivement produite et pourrait suivre deux voies : (1) une **voie majeure non-productive**, dans laquelle la protéine est transloquée dans la lumière du RE et suivrait la voie de sécrétion où elle est glycosylée et clivée. Cette voie conduit à la synthèse des formes non infectieuses ORF2g (g pour la forme glycosylée) et ORF2c (c pour la forme clivée), qui sont potentiellement des leurres immunologiques ; (2) une **voie productive** pour laquelle une fraction de la protéine ORF2, nommée ORF2i, resterait du côté cytosolique des compartiments membranaires de la voie de sécrétion, pour ensuite rejoindre le site d'assemblage des particules virales (Ankavay et al., 2018). Pour l'encapsidation et l'assemblage viral, l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2 interagirait avec 76 nucléotides de l'extrémité 5' du génome viral (Surjit et al., 2004). Suite à l'assemblage, les particules virales sont transportées par des MVB pour être par la suite libérées par la voie cellulaire exosomale (Nagashima et al., 2018).

Une étude a montré la présence de la protéine membranaire intégrale du réseau Trans-Golgi 2, un des marqueurs spécifiques du réseau *trans*-Golgi, sur l'enveloppe des particules du HEV ce qui suggère que ces particules sont associées à des membranes d'origine intracellulaire et non issues de la membrane plasmique (Nagashima et al., 2014). La présence de l'enveloppe lipidique permet au virus d'échapper aux anticorps neutralisants. En effet, des anticorps monoclonaux spécifiques de la capsid ne sont pas capables de neutraliser les particules du HEV quasi-enveloppées (Nagashima et al., 2018). De plus, de nombreuses études ont montré que les particules nues du HEV sont plus infectieuses que les particules du HEV enveloppées (Lin & Zhang., 2021).

Seuls les virions nus sont détectés dans la bile et les selles alors que les particules quasi-enveloppées sont retrouvées dans le sang et l'urine des patients infectés (Van De Garde et al., 2016 ; Marion et al., 2019). Une étude récente a permis de déterminer le mécanisme par lequel le HEV traverse la barrière intestinale. Ainsi, le HEV se répliquerait dans un premier temps dans les cellules intestinales et les virions produits seraient libérés par exocytose sous une forme quasi-enveloppée, à la fois aux pôles basal et apical des entérocytes, avec toutefois une sécrétion dix fois plus importante au pôle apical. Les particules infectieuses libérées du côté apical seraient délipidées sous l'action des sels biliaires et des enzymes pancréatiques et permettraient une réinfection des cellules intestinales. Les particules quasi-enveloppées sécrétées à partir du pôle basal circuleraient quant à elles jusqu'au foie, *via* la veine porte, pour infecter les hépatocytes (Marion et al., 2019). Par conséquent, le HEV qui infecte les hépatocytes est très probablement majoritairement voire uniquement sous sa forme quasi-enveloppée.

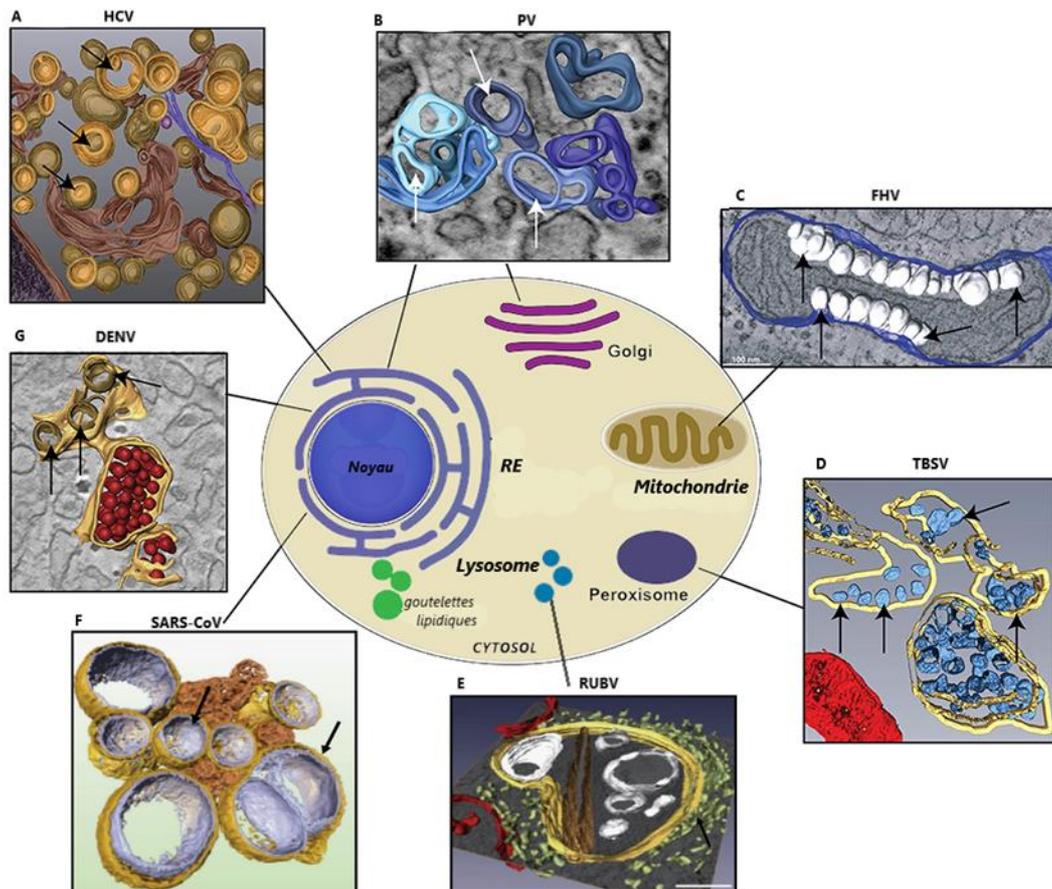
## Partie 2 : Remaniements membranaires induits par les virus à ARN simple brin de polarité positive

### I. Description des remaniements membranaires induits par les virus à ARN simple brin de polarité positive

#### 1. Les compartiments ciblés par les différentes familles de virus à ARN simple brin de polarité positive

Les virus à ARN sb (+) se répliquent dans le cytoplasme de la cellule hôte, où ils sont confrontés à des conditions plutôt défavorables pour la réplication de leur génome. C'est pourquoi, ces virus établissent des compartiments permettant non seulement leur réplication en concentrant les réplicases virales et les facteurs de l'hôte nécessaires, mais aussi leur protection vis-à-vis des protéases, nucléases et senseurs de l'immunité innée présents dans le cytoplasme (Harak & Lohmann, 2015 ; Paul & Bartenschlager, 2013 ; Wolff et al., 2020). Plusieurs noms ont été attribués à ces structures telles que remaniements membranaires, altérations membranaires, réarrangements membranaires, structures viro-induites (VF pour viral factories), usines virales ou encore organites de réplication virale (ROs) (Netherlon & Wileman, 2011 ; DeCastro et al., 2013 ; Wolff et al., 2020). Ces plateformes structurales servant pour la réplication virale sont communes à plusieurs familles de virus à ARN sb (+) incluant les *Flaviviridae* (*Flavivirus*, *Hepacivirus*), les *Coronaviridae* (*Coronavirus*), les *Togaviridae* (*Alphavirus*), les *Picornaviridae* (*Enterovirus*, *Rhinovirus*), les *Caliciviridae* (*Norovirus*) et les *Nodaviridae* (*Nodavirus*). La localisation et la nature de ces usines dépendent du génome viral et de sa stratégie de réplication (Nikolic & Blondel, 2017). Ainsi, ces structures peuvent dériver du RE (*Coronavirus*, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Arterivirus*), de l'appareil de Golgi (*Enterovirus*), des mitochondries (*Nodavirus*), des lysosomes (*Alphavirus*), des peroxyosomes (*Tombusvirus*) ou de multiples organites (*Poliovirus* (PV), *Norovirus*) (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014 ; McCartney et al., 2005) (**Fig.18**).

De nombreux virus issus de différentes familles incluant les *Flaviviridae*, les *Picornaviridae*, les *Coronaviridae* et les *Togaviridae* ont été largement étudiés dans ce domaine et peuvent ainsi être utilisés comme support pour la compréhension et l'analyse de la réplication d'autres virus à ARN sb (+) tels que le HEV. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous détaillerons dans ce chapitre les remaniements membranaires induits par ces différentes familles de virus à ARN sb (+).



**Figure 18 : Reconstruction tridimensionnelle des usines virales induites par différents virus à ARN sb (+).**

**A) le HCV** (Virus de l'hépatite C): Le RE est en marron foncé. La membrane externe des vésicules à double membrane est en marron clair et la membrane interne en jaune. Les vésicules à simple membrane sont en violet, les filaments intermédiaires en bleu (Romero-Brey et *al.*, 2012). **B) le PV** (Poliovirus): Les structures à simple membrane sont en différentes nuances de bleu. Ces structures subissent des invaginations secondaires donnant naissance à des structures à double membrane lors de stades plus tardifs de l'infection (non représentées ici) (Belov et *al.*, 2012). **C) le FHV** (Flock House Virus): Les vésicules viro-induites sont en blanc et la membrane mitochondriale externe en bleu (Kopek et *al.*, 2007a). **D) le TBSV** (Tomato Bushy Stunt Virus): Reconstruction 3D montrant une mitochondrie en rouge et un corps multivésiculaire peroxysomal en jaune contenant les vésicules viro-induites en bleu (Fernandez de Castro et *al.*, 2017). **E) le RUBV** (Virus de la rubéole): Les vésicules viro-induites sont en blanc, le lysosome en jaune, le RE en vert clair et les mitochondries en rouge (Fontana et *al.*, 2010). **F) le SARS-CoV** (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus): Un réseau interconnecté de vésicules à double membrane (DMVs) dérivé du RE. Le RE est en marron clair, les membranes externes interconnectées des DMVs en jaune et les membranes internes des DMVs en bleu (Knoops et *al.*, 2008). **G) le DENV** (Virus de la Dengue): Les vésicules viro-induites sont en rouge et les membranes du RE en marron (Welsch et *al.*, 2009).

## 1.1. Virus à ARN sb (+) enveloppés

### 1.1.1. La famille des *Flaviviridae*

#### a. Généralités

La famille des *Flaviviridae* comprend de nombreux pathogènes tels que le HCV, le virus de la fièvre du Nil occidental, le virus de la fièvre jaune et le DENV. Elle se divise en quatre genres dont les genres *Flavivirus* et *Hepacivirus* qui infectent les humains et semblent responsables de nombreuses flambées épidémiques (Reid et *al.*, 2015).

#### b. Ng " J E X " e q o o g " o q f <sup>3</sup> n g " f ø <sup>2</sup> v w f g " f g " n c " d k q i les différents virus de la famille des *Flaviviridae*

Le HCV est un petit virus enveloppé dont le génome est un ARN sb (+) d'environ 9,6 kb codant une seule polyprotéine d'environ 3000 aa qui est ensuite clivée pour générer des protéines structurales (core, E1 et E2) et non structurales (NS) (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Ce virus représente le seul membre connu du genre des *Hepacivirus* (Manns et *al.*, 2017). Les remaniements membranaires induits par le HCV ont été observés et initialement décrits pour la première fois comme une accumulation de vésicules d'environ 85 nm de diamètre contenues dans une matrice membranaire, et ont été nommés membranous webs (MWs) (Egger et *al.*, 2002). L'analyse tomographique des MWs a révélé qu'il s'agissait de vésicules à double membrane (DMVs), membrane qui provenait probablement d'exvaginations des membranes du RE (Romero-Brey et *al.*, 2012). D'autres études ont montré l'existence de structures alternatives comme des vésicules à simple membrane (SMVs), des vésicules groupées, des vésicules contiguës (CVs) et des vésicules à membranes multiples (Ferraris et *al.*, 2010 ; Harak & Lohmann, 2015). La présence des protéines NS et de l'ARN double brin au sein des MWs suggère que ces structures seraient le site de réplication du HCV (Ferraris et *al.*, 2010). De plus, le MW est associé aux gouttelettes lipidiques cellulaires, ces dernières étant des éléments majeurs pour l'assemblage de la particule virale (Harak & Lohmann, 2015).

### 1.1.2. La famille des *Coronaviridae*

#### a. Généralités

La famille des *Coronaviridae* regroupe quatre genres de virus enveloppés contenant de très gros génomes à ARN sb (+) coiffés et polyadénylés allant de 26 à 32 kb. Ces virus infectent de nombreux mammifères et induisent des troubles des systèmes respiratoire, gastro-intestinal, hépatique et nerveux central (Reid et *al.*, 2015).

b. Le SARS-CoV-2, un coronavirus induit par les différents virus de la famille des Coronaviridae

Un virus de la famille des *Coronaviridae*, dénommé SARS-CoV-2 (virus responsable du syndrome respiratoire aiguë sévère) est à l'origine de l'épidémie actuelle COVID-19. Son génome est composé de 13 à 15 cadres ouverts de lecture (Naqvi et *al.*, 2020). Depuis sa découverte, de nombreuses études ont été réalisées afin d'étudier l'interaction entre le SARS-CoV2 et sa cellule hôte (Farkash et *al.*, 2020 ; Caldas et *al.*, 2020 ; Hopfer et *al.*, 2020 ; Eymieux et *al.*, 2021). Des données récentes montrent que la réplication du SARS-CoV2 induit des changements ultrastructuraux similaires à ceux induits par le SARS-CoV (Ogando et *al.*, 2020 ; Hopfer et *al.*, 2020).

Très récemment, une analyse cinétique de cellules infectées par le SARS-CoV2 a montré que les usines virales induites par ce virus correspondent à des DMVs situées à proximité du noyau (Eymieux et *al.*, 2021a). Les premières modifications induites par le virus ont été observées 6 heures après infection avec la formation de groupes de SMVs dans le cytoplasme, qui correspondent probablement à des précurseurs des DMVs. De gros changements ont ensuite été observés 8 heures après infection, avec la présence de nombreuses DMVs souvent proches du noyau formant ainsi le site de réplication (Eymieux et *al.*, 2021a). Il est à noter, que dans les cellules infectées une augmentation d'empilements parallèles de membranes dérivées du RE contenant des complexes de pores nucléaires, appelées annulate lamellae, a été observé. Ces structures dont on ne connaît pas la fonction précise, ne sont pas spécifiques d'une infection virale mais pourraient être un marqueur d'infection virale (Eymieux et *al.*, 2021b).

### 1.1.3. La famille des *Togaviridae*

#### a. Généralités

Les virus de la famille des *Togaviridae* sont des virus enveloppés de forme sphérique de 50 à 70nm contenant de l'ARN sb (+) coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Cette famille comprend deux genres : les *Rubivirus* et les *Alphavirus*. RUBV, à l'origine de la rubéole (également connue sous le nom de rougeole allemande), est le seul membre du genre *Rubivirus*. C'est un virus à ARN sb (+) d'environ 10kb contenant deux cadres ouverts de lecture, l'un codant deux protéines NS P150 et P90 (réplicases), l'autre codant pour la protéine de capsid C et pour les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Harak & Lohmann, 2015). Le genre *Alphavirus* contient, quant à lui, au moins 30 membres avec une transmission se faisant principalement par les moustiques. Ce sont des virus possédant un génome d'environ 11,5 kb comprenant deux cadres ouverts de lecture, l'un codant la réplicase (polyprotéine NS clivée en 4 protéines (nsP1 à nsP4), l'autre codant les protéines structurales (Harak & Lohmann, 2015). L'infection par ces virus est souvent associée à des éruptions cutanées, de la fièvre et des douleurs articulaires sévères qui peuvent durer des semaines voire des mois. Certains virus de ce genre

peuvent provoquer des symptômes plus graves tels que l'encéphalite, et ce à la fois chez l'Homme et les animaux (Reid et *al.*, 2015).

b. Naissance et développement de la biogenèse des usines virales induites par les différents virus de la famille des *Togoviridae*

Les VFs induites par les virus de la famille des *Togoviridae* (le RUBV et les *Alphavirus*) sont morphologiquement similaires, servent de complexe de réplication et proviennent des endosomes tardifs et des lysosomes. Elles sont nommées vacuoles cytopathiques (CPVs) et peuvent atteindre de très larges diamètres allant de 600 à 2000 nm. Ces dernières contiennent de nombreuses petites sphérules invaginées ou vésicules d'environ 50nm de diamètre, de larges vacuoles et des feuillettes de membranes rigides (Magliano et *al.*, 1998 ; Harak & Lohmann, 2015). Les CPVs recrutent d'autres organites tels que les citernes du RE rugueux, les membranes du Golgi ou la mitochondrie et sont connectées à la voie endo-lysosomale (Fontana et *al.*, 2010).

1.2. Virus à ARN sb (+) non enveloppés famille des *Picornaviridae*

1.2.1. Généralités

La famille des *Picornaviridae* comprend un groupe très diversifié de pathogènes comme le PV, le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus coxsackie B3 (CVB3). Seuls quelques représentants de cette famille, dont principalement ceux du genre *Enterovirus*, ont été analysés afin de savoir s'ils étaient capables de moduler l'homéostasie membranaire intracellulaire de leur cellule hôte (Harak & Lohmann, 2015).

1.2.2. Le PV comme modèle d'étude de la biogenèse des usines virales induites par les différents virus de la famille des *Picornaviridae*

Les premières images de microscopie électronique représentant des altérations membranaires induites par un membre de cette famille ont été prises sur des cellules infectées par le PV (Dales et *al.*, 1965). De nombreuses équipes ont rapporté qu'une infection par le PV entraîne une réorganisation rapide et massive des membranes intracellulaires en amas de vésicules étroitement associées et ayant des tailles très hétérogènes (Belov et *al.*, 2008). Les premières altérations membranaires sont observées 2 à 3h après l'infection et se caractérisent par des SMVs tubulaires allongées (Bienz et *al.*, 1983). Quatre heures après infection, les premières DMVs d'environ 100 à 300 nm de diamètre apparaissent avec une augmentation de leur nombre durant l'infection, alors qu'en parallèle les SMVs disparaissent (Belov et *al.*, 2012), montrant une conversion des SMVs en DMVs (Harak & Lohmann, 2015). Les membranes du RE, des lysosomes et de l'appareil de Golgi contribuent à la formation de ces usines virales (Schlegel et *al.*, 1996). Des analyses sur des cellules infectées par le PV ont permis de localiser les protéines virales à la fois à la surface des vésicules ainsi qu'à l'intérieur de ces structures en forme de rosette. De plus, l'ARN sb (+) est retrouvé à la surface de ces structures vésiculaires, l'ARN

(-) étant, quant à lui, présent à l'intérieur. Ainsi, elles seraient un complexe servant à la fois à la réplication, l'assemblage et la libération des virions (Egger et *al.*, 1996 ; Harak & Lohmann, 2015).

## 2. Mécanismes de biogenèse des usines virales induites par les virus à ARN sb (+)

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est permis par de nombreux facteurs incluant le transport vésiculaire. Un des paramètres régulant ce trafic est la courbure membranaire qui peut être négative ou positive. Alors que la courbure négative des membranes correspond à des projections de membranes préexistantes vers la lumière d'un organite ou vers le milieu extracellulaire, la courbure positive se définit par la projection des membranes d'un organite vers le cytoplasme (Paul & Bartenschlager, 2013, Bakhache et *al.*, 2019).

La courbure membranaire est détournée par de nombreux virus pour la biogenèse de leurs VFs et fait intervenir de nombreux processus tels que la formation et l'oligomérisation des protéines membranaires, l'incorporation de lipides, l'interaction des membranes avec le cytosquelette et l'échafaudage de protéines cellulaires (Bakhache et *al.*, 2019) (**Fig.19 I**). Alors que la courbure négative des membranes est prédominante pour la formation de SMVs, la courbure positive des membranes est, quant à elle, impliquée dans la biogenèse des DMVs (**Fig. 19 II**).

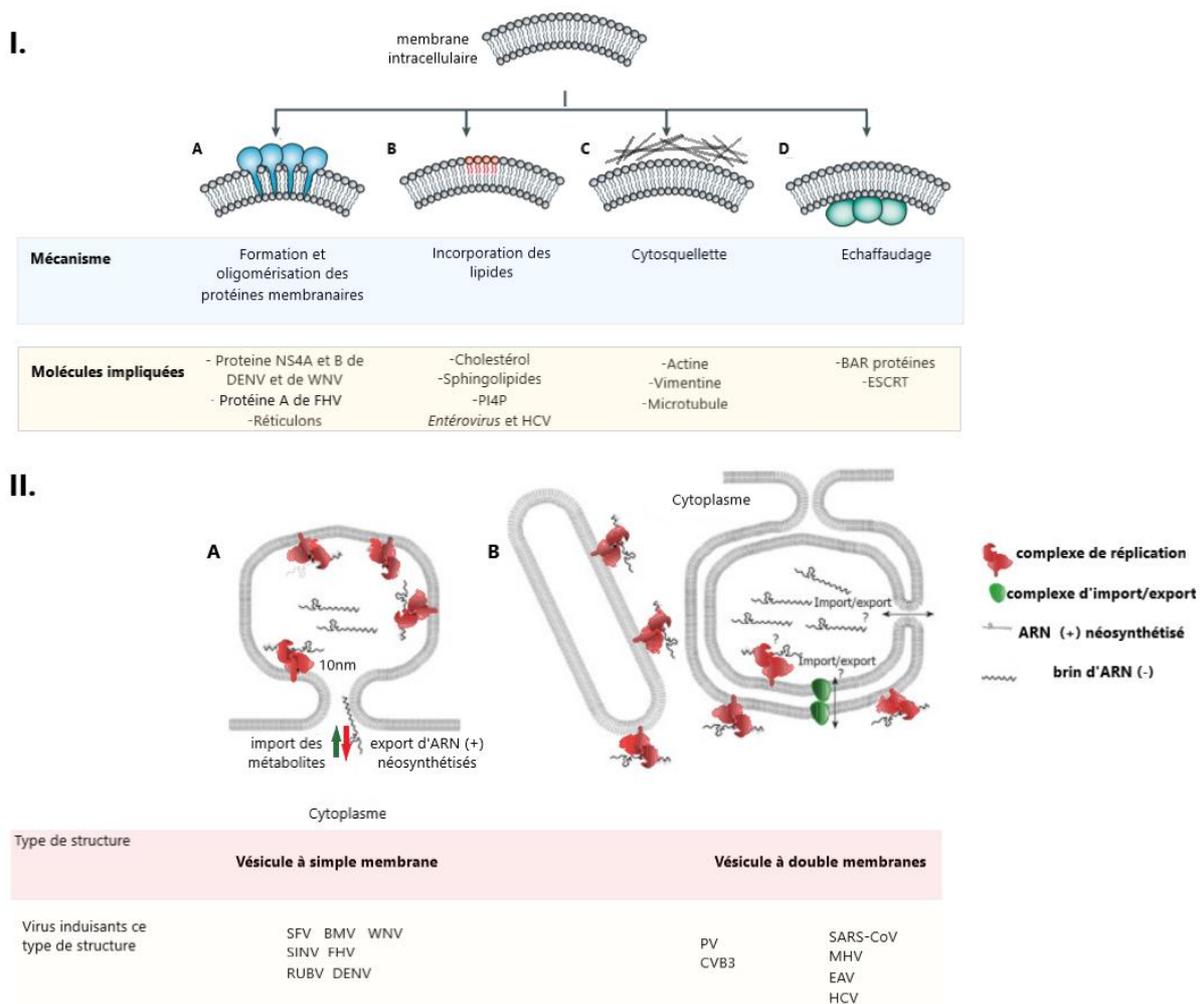
Les VFs résultant d'une courbure négative des membranes sont délimitées par la continuité des membranes cellulaires et reliées au cytoplasme *via* un pore ayant un diamètre allant de 8 à 11nm. Ce dernier permettrait non seulement l'import des métabolites et des cofacteurs cellulaires nécessaires à la réplication virale, mais aussi l'export des molécules d'ARN néo-synthétisées (Bakhache et *al.*, 2019 ; Paul & Bartenschlager, 2013 ; Wolff et *al.*, 2020). Cette hypothèse a été confirmée suite à un marquage de l'ARN viral avec de la bromouridine dans le cas du RUBV (Kujala et *al.*, 2001), du FHV (Kopek et *al.*, 2007) et du virus de la mosaïque du brome (Schwartz et *al.*, 2002) (**Fig. 19 II, A**).

Les DMVs ont une structure et une biogenèse plus complexe que les SMVs. De plus, comme les deux membranes sont souvent scellées, les échanges avec le cytoplasme sont plus difficiles (Knoops et *al.*, 2008 ; Romero-Brey et *al.*, 2012 ; Paul & Bartenschlager, 2013). Deux différentes voies conduisant à la topologie des DMVs sont actuellement proposées (**Fig.19 II, B**).

La première voie concerne les *Enterovirus* (le PV et le CVB3). Après courbure membranaire positive et fission, des tubules (vésicules à simple membrane) apparaissent à partir de l'organite donneur. L'appariement membranaire forme alors des citernes qui se courbent (courbure positive de la membrane externe et courbure négative de la membrane interne), conduisant à des DMVs ouvertes qui se ferment ensuite par fission (Wolff et *al.*, 2020). Dans cette voie, la réplication est principalement retrouvée au niveau des tubules constituées d'une simple membrane, le complexe de réplication

contenant la réplicase entévirale réside dans ces structures (Belov et *al.*, 2012 ; Bienz et *al.*, 1987 ; Paul & Bartenschlager, 2013). La réplication virale cesserait après l'appariement membranaire conduisant à la formation des DMVs (Paul & Bartenschlager, 2013).

La deuxième voie concerne les *Hepacivirus* (le HCV), les *Coronavirus* (SARS-CoV et le Coronavirus murin) et les *Arterivirus* (Arterivirus équin). Les membranes s'apparient pour former des citernes qui se courberaient donnant lieu dans un premier temps à des DMVs ouvertes. Ces dernières subiraient alors deux fissions aboutissant à des DMVs connectées puis des DMVs fermées (Wolff et *al.*, 2020). Concernant le SARS-CoV et l'Arterivirus équin, le marquage de l'ARNdb a révélé la présence massive d'ARN viral dans la lumière des DMVs. De plus, un marquage avec la bromouridine a montré une association entre l'ARN viral en cours de synthèse et les membranes des DMVs, suggérant que ces structures seraient le site de réplication virale. Si cette dernière a lieu dans la lumière des DMVs, les mécanismes d'import de métabolites et d'export de l'ARN viral ne sont pas encore clairement définis. Comme la tomographie à haute résolution n'a pas montré la présence de connexion, comme observée dans le cas des SMVs, des canaux protéiques et des transporteurs serviraient de moyens d'échanges entre la lumière des DMVs et le cytoplasme (Knoops et *al.*, 2008 ; Knoops et *al.*, 2012 ; Paul & Bartenschlager, 2013). Concernant le HCV, les DMVs s'accumulent lors de la phase active de la réplication de l'ARN viral. Alors que la majorité des DMVs ne montrent aucune discontinuité membranaire, une petite fraction présente une ouverture vers le cytoplasme permettant donc des échanges entre les deux compartiments. Il est donc suggéré que la réplication virale se produirait à l'intérieur des DMVs tant que la discontinuité est présente et cesserait après le scellement complet des DMVs (**Fig.19 II, B**) (Romero-Brey et *al.*, 2012, Paul & Bartenschlager, 2013).



**Figure 19 : Mécanismes et topologies des courbures membranaires impliqués dans la biogenèse des usines virales.**

**I.** Représentation schématique des différents mécanismes de courbure membranaire : **A)** Représentation du mécanisme de formation et d'oligomérisation des protéines membranaires observé dans le cas des virus DENV, virus de la fièvre du Nil occidental (WNV) et FHV. **B)** Représentation du mécanisme d'incorporation des lipides tels que le cholestérol, les sphingolipides ou les PI4Ps. Ce phénomène a été décrit dans le cas du HCV et des *Entérovirus*. **C)** Description de l'implication du cytosquelette dans le processus de courbure membranaire. Il semble que l'actine, la vimentine et les microtubules joueraient un rôle crucial dans ce processus. **D)** Représentation du mécanisme d'échafaudage assuré par les protéines BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) et ESCRT. **II.** Topologies des structures membranaires viro-induites. **A)** Représentation de la topologie à simple membrane. **B)** Représentation de la topologie à double membrane. Ces compartiments viro-induits sont délimités par la continuité des membranes cellulaires et reliés au cytoplasme par un pore de 10nm. Adaptée de (Bakhache et al., 2019) et (Paul & Bartenschlager, 2013).

## II. Facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des usines virales

Les protéines NS semblent avoir une certaine spécificité pour la reconnaissance des différents organites et possèdent souvent de multiples domaines hydrophobes impliqués dans ce ciblage et les réarrangements membranaires. Les mécanismes moléculaires induisant la formation de ces structures complexes sont encore mal compris mais il est clair que les protéines NS sont des acteurs clés dans la biogenèse des VFs (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014).

De nombreuses protéines NS seraient impliquées dans la biogenèse des SMVs. Ainsi, l'expression dans la levure de la protéine 1a du virus de la mosaïque du brome induit la formation de sphérules ressemblant à celles observées en cas d'infection. L'ancrage initial de la protéine 1a du côté cytoplasmique de la membrane du RE permet l'enclenchement de la biogenèse de la VF, cette dernière possédant donc une membrane issue du RE et un diamètre compris entre 50 et 70 nm (Schwartz et al., 2002). L'implication d'une protéine NS dans la formation de sphérules a aussi été observée pour le FHV, virus appartenant à la famille des *Nodaviridae*. La réplication de ce virus a lieu à l'intérieur de sphérules possédant une membrane issue des mitochondries. La protéine A du FHV s'ancre à la membrane externe des mitochondries, permettant ainsi la formation de la VF (Dye et al., 2005, Miller & Ahlquist, 2002). Leur formation est induite par les composants P90 et P150 de la réplicase virale du RUBV, protéines localisées à l'intérieur des CPVs tout comme l'ARN double brin (Fontana et al., 2007)

Les protéines NS sont aussi impliquées dans la biogenèse des DMVs et agissent dans la plupart des cas en coopération. Dans le cas du SARS-CoV, les protéines nsp3, nsp4 et nsp6 sont cruciales pour la formation des DMVs. Alors que les protéines nsp3 et nsp4 agissent de concert pour l'appariement des membranes, la protéine nsp6 permet la prolifération des membranes et la localisation périnucléaire des DMVs à proximité du centre organisateur des microtubules (Angelini et al., 2013). Concernant le MERS, autre *Coronavirus*, les protéines nsp3 et nsp4 sont nécessaires pour la formation des DMVs, la protéine nsp6 n'étant pas requise (Oudhoorn et al., 2017). Cette coopération entre différentes protéines NS est aussi retrouvée chez les *Arterivirus* et les *Picornavirus* (Wolff et al., 2020). Pour certains virus, l'expression d'une seule protéine NS semble suffisante pour la formation des DMVs. C'est par exemple le cas de la protéine NS5A du HCV, possédant une hélice amphipathique en position N-terminale, qui serait capable d'induire à elle seule des DMVs (Romero-Brey et al., 2012). Toutefois, dans d'autres études, les protéines NS3, NS4B et NS5B ont été montrées impliquées dans la formation des VFs induites par le HCV (Romero-Brey et al., 2012 ; Paul et al., 2018, Romero-Brey et al., 2015, Paul et al., 2011 ; Wolff et al., 2020).

### III. Facteurs cellulaires impliqués dans la biogenèse des usines virales

Tout d'abord, le cytosquelette cellulaire semble impliqué dans la biogenèse des VFs. En effet, de nombreuses équipes ont montré une localisation des complexes de réplication de certains virus à ARN sb (+) à proximité des réseaux de microfilaments formés par l'actine ou des filaments intermédiaires riches en vimentine (Frolova et *al.*, 2006 ; Bakhache et *al.*, 2019). Dans le cas du ZIKV, des structures composées de filaments intermédiaires et de microtubules forment de véritables cages englobant leur site de réplication (Cortese et *al.*, 2017).

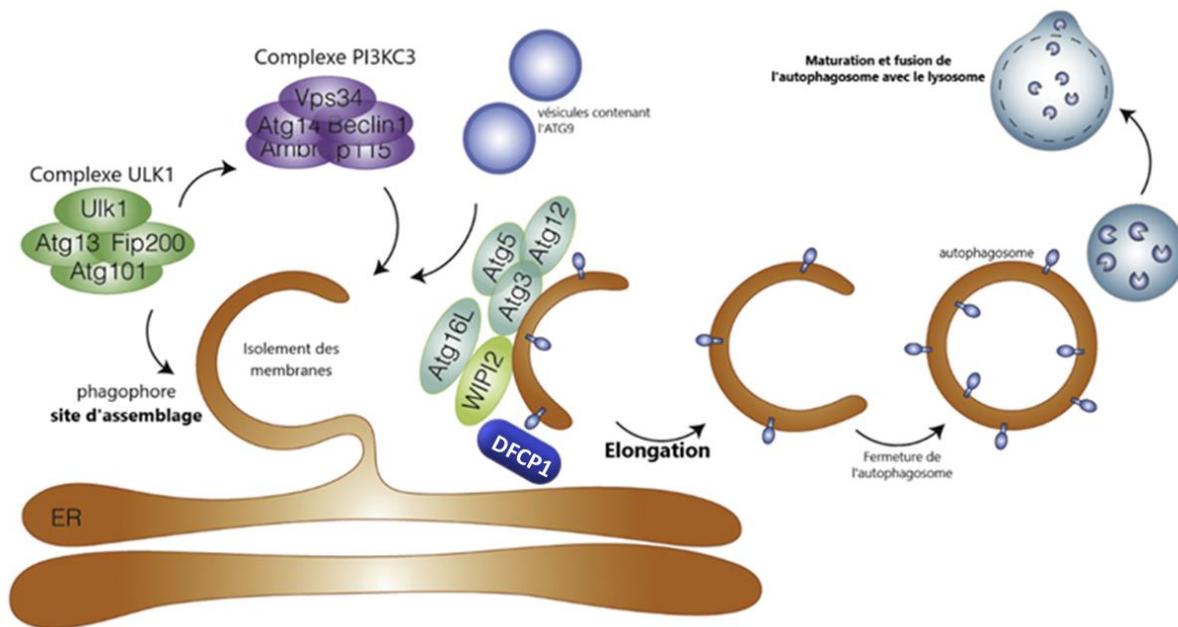
Dans ce chapitre, nous détaillerons plus précisément le rôle de l'autophagie, des protéines de la voie de sécrétion et des lipides cellulaires dans la formation et/ou le fonctionnement des VFs.

#### 1. L' a u t o p h a g i e

##### 1.1. Généralités

L'autophagie est un processus intracellulaire qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, il facilite non seulement le recyclage des protéines et des organites endommagés, mais permet aussi l'élimination des pathogènes intracellulaires. La restriction calorique augmente l'activité autophagique, ce qui permet à la fois le maintien de l'homéostasie cellulaire mais aussi un apport énergétique (Matsushita et *al.*, 2006).

Lors de ce mécanisme, les protéines cytoplasmiques et les organites endommagés ubiquitinylés sont séquestrés dans des vésicules à double membrane nommées autophagosomes, membrane provenant du RE (Mijaljica et *al.*, 2006 ; Wong & Sanyal, 2020). La formation de ce compartiment se fait de façon progressive grâce à 3 complexes protéiques (complexe Unc-51 Kinase 1 (ULK1), complexe PI3KC3, complexe ATG5/ATG12/ATG16L) et au moins 4 protéines (WIPI, DCFP1, ATG3 et LC3 (membre de la famille ATG8)). Après maturation et fusion de l'autophagosome avec le lysosome, le contenu est hydrolysé et libéré dans le cytoplasme (**Fig.20**) (Wong & Sanyal, 2020).



**Figure 20 : Mécanisme de l'induction de l'autophagie.**

Suite à un stress cellulaire, le complexe Unc-51like Kinase 1 (ULK1) est activé, déclenchant l'isolement des membranes du phagophore par phosphorylation des composants du complexe PI3KC3. Cela active la production locale de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau du RE conduisant au recrutement des protéines WIPI et DFCP1. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est à son tour recruté ce qui amplifie la liaison induite par ATG3 de protéines de la famille ATG8 au phosphatidylethanolamine présent sur la membrane. Ces protéines incluant la microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), alors ancrées sous une forme lipidique sont nécessaires à l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. Ce dernier mature et fusionne avec le lysosome, le contenu étant alors hydrolysé et recyclé dans le cytoplasme. Adaptée de (Wong & Sanyal, 2020).

En fonction des cargos destinés à la destruction, l'autophagie peut être classée en mitophagie (mitochondrie endommagée), pexophagie (peroxysome), phagie du RE (RE), lipophagie (gouttelettes lipidiques) et xénophagie (agents pathogènes) (Mao et *al.*, 2019).

Alors que le but initial de la xénophagie est d'éliminer les pathogènes incluant les virus, plusieurs équipes de recherche ont montré que de nombreux virus à ARN sb (+) détournent cette voie à leur profit, à savoir pour leur réplication ou leur assemblage (Wong & Sanyal, 2020). Le premier lien entre les vésicules induites par un virus à ARN sb (+) et les autophagosomes a été proposé il y a longtemps par George Palade et collaborateurs qui, par microscopie électronique, ont montré que les vésicules contenant le PV ressemblaient à des autophagosomes (Dales et *al.*, 1965). Par la suite, de nombreuses études ont clairement établi l'existence de ce détournement pour une multitude de virus à ARN sb (+) incluant le PV (Bird et *al.*, 2014), le CVB3 (Mohamud et *al.*, 2018 ; Alirezai et *al.*, 2015), le DENV (Zhang et *al.*, 2020 ; Heaton et *al.*, 2010), le ZIKV (Cortese et *al.*, 2017 ; Offerdahl et *al.*, 2017) et le SARS-CoV (Prentice et *al.*, 2004).

### 1.2. Les autophagosomes comme site de réplication virale des virus à ARN sb (+)

Dans le cas du PV, des amas de vésicules exprimant le marqueur de l'autophagosome LC3 et des marqueurs lysosomaux, ressemblant à des autolysosomes, sont colocalisés avec le complexe de réplication de ce virus (Wong & Sanyal, 2020 ; Suhy et *al.*, 2000). Dans le cas de la famille des *Flaviviridae*, de nombreuses protéines NS ont été retrouvées dans les autophagosomes. Il a été rapporté que la protéine NS1 du DENV et les molécules d'ARN double brin colocalisaient avec la protéine LC3 et les protéines ribosomales (Panyasrivanit et *al.*, 2009 ; Khakpoor et *al.*, 2009). Dans le cas du HCV, une étude a rapporté que l'autophagosome servirait de site de réplication pour ce virus. L'analyse par gradient de sucrose a montré que le marqueur LC3-II co-sédimentait avec l'ARN viral du HCV et ses protéines NS3 et NS5A (Ferraris et *al.*, 2010). La réplication virale dans les autophagosomes induits par le HCV a été confirmée par d'autres études (Wang & Qu, 2018, Fahmy & Labonté, 2017). Néanmoins, d'autres études menées par microscopie confocale n'ont pas clairement montré de colocalisation entre des protéines virales du HCV et les marqueurs de la voie de l'autophagie (LC3 ou l'ATG5) (Dreux et *al.*, 2009 ; Tanida et *al.*, 2009). La suggestion que les autophagosomes ne seraient pas le site majeur pour la réplication virale du HCV a été confirmée par une autre étude (Ke et *al.*, 2011). L'autophagosome comme site potentiel de réplication virale a été étudié pour de nombreux virus avec pour certains des résultats conflictuels ou pour d'autres l'absence de preuves précises de réplication dans cet organite (Wong & Sanyal, 2020). Par conséquent, l'implication de l'autophagie pour la réplication virale n'est pas encore clairement définie.

### 1.3. @

L'utilisation des autophagosomes comme site d'assemblage a été rapportée chez certains virus à ADN tel que le virus de l'hépatite B (Döring et *al.*, 2018 ; Wong & Sanyal, 2020). En revanche, les données sur l'implication de l'autophagosome dans l'assemblage des virus à ARN sb (+) restent limitées. La première étude mentionnant l'implication de l'autophagie lors d'une infection par le DENV, a été réalisée par Lee et collaborateurs (Lee et *al.*, 2018). Il a aussi été suggéré que dans le cas d'une infection par le DENV, l'autophagie aiderait à l'assemblage des particules virales (Mateo et *al.*, 2013).

## 2. Voie de sécrétion

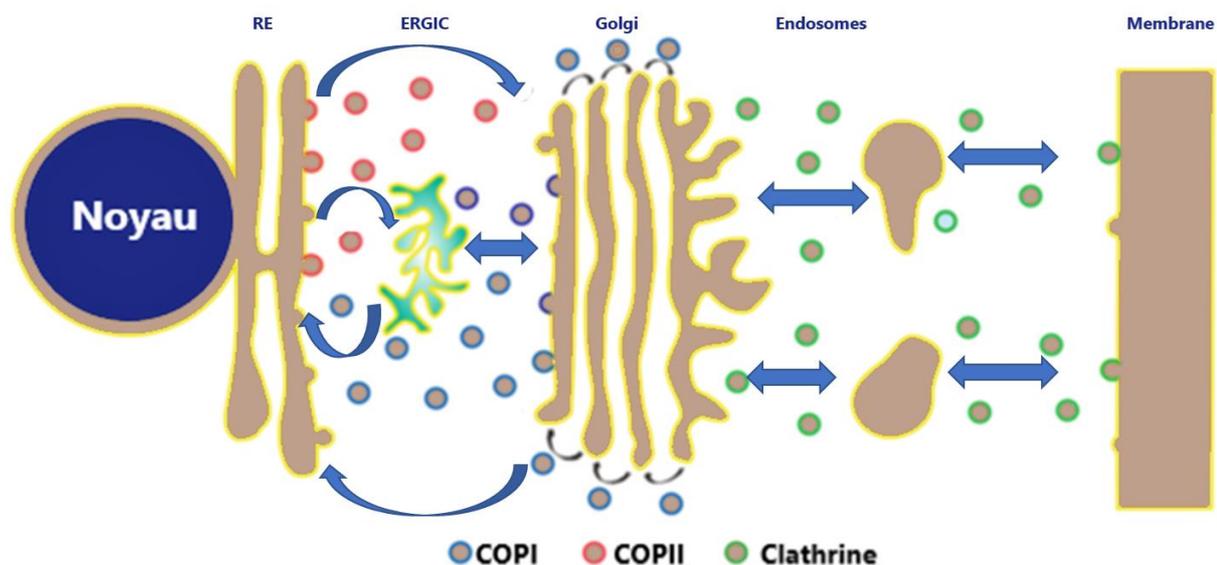
### 2.1. Généralités

La cellule eucaryote contient de nombreux organites possédant des fonctions spécialisées. Bien que ces organites soient spatialement séparés, il existe une interaction dynamique entre eux par différents mécanismes de trafic, dont certains sont médiés par le transport de vésicules impliquées dans différentes étapes de la voie de sécrétion (Martínez & Arias, 2020). Ce transport permet d'acheminer correctement les protéines et les lipides vers leurs compartiments spécifiques. Il est donc essentiel dans le maintien de la structure et de la fonction des organites cellulaires (Martínez & Arias, 2020). Cet équilibre intracellulaire est permis par la présence de quatre types de transport: (i) un transport

antérograde allant du RE vers l'appareil du Golgi réalisé par des vésicules recouvertes par la protéine coatomère de type II (COPII) (Lee et *al.*, 2004), (ii) un transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE médié par des vésicules recouvertes avec la protéine coatomère de type I (COPI), (iii) un transport de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique par des vésicules recouvertes de clathrine et (iv) un transport de la membrane plasmique vers les endosomes aussi assuré par des vésicules recouvertes de clathrine (Martínez & Arias, 2020) (**Fig.21**).

Récemment, il a été démontré que la machinerie COPI participe à la maturation des endosomes précoces, au recyclage des protéines de la membrane plasmique et à la maturation des phagosomes et des peroxysomes. Le mécanisme de transport COPI peut être divisé en 7 étapes avec la protéine GBF1 indispensable pour l'initiation de la formation des vésicules COPI. C'est un facteur d'échange de nucléotide guanine qui permet l'activation de certaines protéines Arfs impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le transport vésiculaire (Martínez & Arias, 2020).

De nombreuses études ont montré que de nombreux virus à ARN appartenant à différentes familles, y compris les virus à ARN sb (+) utilisent GBF1 pour différentes étapes de leur cycle infectieux (Martínez & Arias, 2020).



**Figure 21 : Représentation schématique des rôles de COPI, COPII et de la clathrine dans la voie de sécrétion vésiculaire.**

ER : réticulum endoplasmique, ERGIC : compartiment intermédiaire de Golgi

## 2.2 Implication de GBF1 dans le cycle infectieux des virus à ARN sb (+)

La protéine GBF1 est impliquée dans la répllication de nombreux virus à ARN sb (+) incluant le DENV (Hafirassou et *al.*, 2017), le PV (Belov et *al.*, 2008), le HCV (Goueslain et *al.*, 2010 ; Ferlin et *al.*, 2018) et

l'entérovirus 71 (Wang et *al.*, 2014a). Ce facteur d'échange nucléotidique semble également impliqué dans la formation des complexes de réplication dans le cas de virus Kunjin (Hall et *al.*, 1999).

Notre équipe a montré que GBF1 joue un rôle crucial dans la réplication du HEV en utilisant soit la Brefeldine A (inhibiteur non spécifique de GBF1), soit la Golgicide A (inhibiteur spécifique de GBF1) (Farhat et *al.*, 2018). Ces données suggèrent donc que la réplication du HEV pourrait induire un remaniement des membranes cellulaires par des mécanismes régulés par GBF1.

La protéine GBF1 a aussi été montrée impliquée dans l'expression de certaines protéines virales du HCV (Goueslain et *al.*, 2010), ainsi que dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales (pour revue Martínez & Arias, 2020).

### **3. Les lipides cellulaires**

#### **3.1. Généralités**

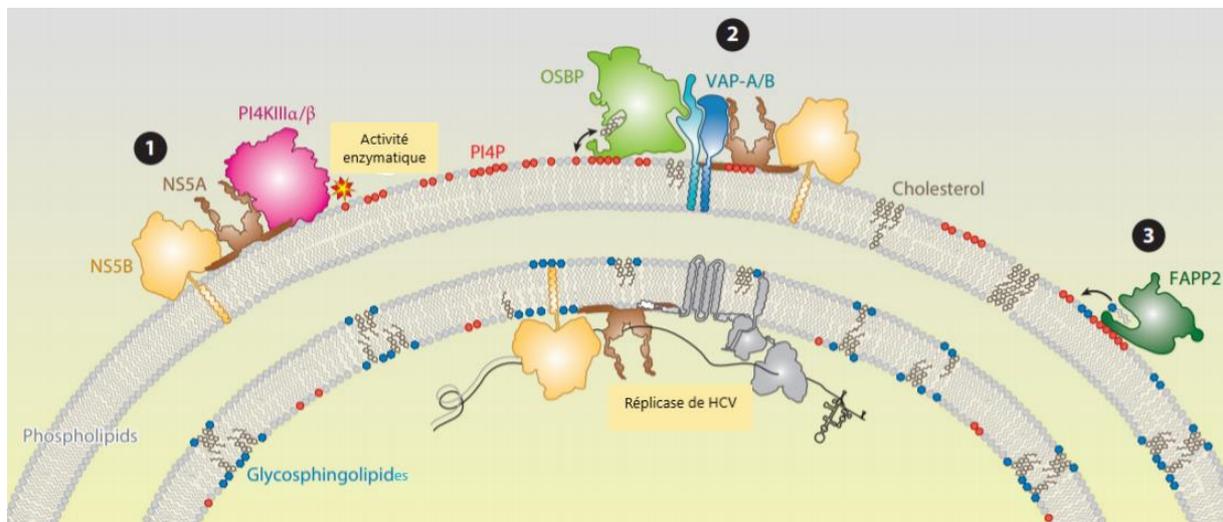
Dans les cellules eucaryotes, environ 5% des gènes sont dédiés à la biosynthèse des lipides. Les lipides représentent un groupe très diversifié de molécules amphipathiques ou non polaires essentielles avec 3 principales fonctions : (i) composants cellulaires indispensables des membranes, (ii) source d'énergie pour les lipides stockés sous forme de gouttelettes lipidiques et (iii) molécules de signalisation dans de nombreux mécanismes cellulaires (Neumann & Van Meer, 2008 ; Zhang and *al.*, 2019).

De nombreuses études ont montré une implication des lipides dans la formation et le fonctionnement des VFs induites par les virus à ARN sb (+). De manière intéressante, il a été découvert que des virus nécessitent non seulement des membranes sur lesquelles se répliquent, mais ont également une préférence ou un besoin spécifique en termes de composition lipidique membranaire (Zhang and *al.*, 2019). Parmi les nombreux lipides cellulaires impliqués dans la réplication virale des virus à ARN sb (+), on retrouve la phosphatidylcholine (PC), des phospholipides tels le phosphatidylinositol-4-kinase (PI4P), des stérols tels que le cholestérol, des sphingolipides et des acides gras. De plus, afin de créer un environnement favorable à leur réplication, les virus à ARN sb (+) peuvent modifier au moins localement la composition des membranes cellulaires en recrutant des lipides ou des protéines cellulaires et/ou en induisant l'activité enzymatique d'enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique (Zhang and *al.*, 2019). Nous prendrons comme exemple dans cette partie les lipides impliqués dans la réplication virale du HCV.

- **Implication de certains phospholipides**

Le phosphatidylinositol (PI) est un précurseur de divers phosphoinositides qui jouent des rôles clés dans les voies de signalisation intracellulaire et dans le trafic de membranes vésiculaires (Zhang et *al.*, 2019). La phosphatidylinositol-4-kinase (PI4P) est formée suite à l'estérification du groupement -OH présent en position 4 de l'anneau inositol avec un groupement phosphate. Cette réaction d'estérification est catalysée par une enzyme appelée phosphatidylinositol-4 kinase, enzyme présente chez l'être humain sous deux types différents (II, III) contenant chacun deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) localisées dans des organites distincts. La PI4P $\alpha$  est retrouvée au niveau du RE et représente un facteur cellulaire essentiel pour la réplication du HCV (Harak & Lohmann, 2015). La PI4P $\beta$  est, quant à elle, présente au niveau des membranes de l'appareil de Golgi et est impliquée dans la réplication de certains génotypes de HCV (Reiss et *al.*, 2011). Différentes études ont montré que les protéines NS5A et NS5B du HCV interagissaient avec la PI4P (interaction nécessitant sept aa présents dans le domaine 1 de NS5A) (Reiss et *al.*, 2013), la recrutait au niveau des compartiments de réplication virale et activaient sa fonction enzymatique, menant ainsi à la production de PI4P (Berger et *al.*, 2009; Reiss et *al.*, 2011 ; Tai & Salloum, 2011 ; Harak et *al.*, 2016 ). Ceci explique que la PI4P a été retrouvée en plus grande quantité non seulement au niveau des complexes de réplication du HCV en culture cellulaire (Reiss et *al.*, 2011 ; Berger et *al.*, 2011) mais aussi au niveau des biopsies hépatiques de patients infectés par ce virus (Reiss et *al.*, 2011).

La manière dont la PI4P est impliquée dans la réplication virale du HCV n'est pas clairement définie. La première hypothèse a été émise par McMahon and Gallop en 2005 et suggère qu'elle serait capable d'induire les réarrangements membranaires (McMahon & Gallop, 2005). Une autre possibilité serait que la PI4P agirait comme un « pont » pour recruter d'autres facteurs proviraux de l'hôte voire même des composants viraux vers les sites de réplication virale (Zhang et *al.*, 2019). Il a été rapporté que la PI4P peut se lier spécifiquement à de nombreuses protéines cellulaires telles que la protéine de liaison à l'oxystérol (OSBP) (Wang et *al.*, 2014b), la protéine adaptatrice à quatre phosphate (FAPP2) (Khan et *al.*, 2014), la Golgi phosphoprotein 3 (Bishé et *al.*, 2012) et la protéine de transfert de céramide (Amako et *al.*, 2011) qui sont étroitement impliquées dans la réplication/sécrétion du HCV. Ainsi, suite à la synthèse de la PI4P, une modification de la composition membranaire des sites de réplication de HCV est réalisée par des protéines de transfert de lipides (**Fig.22**) (Paul & Bartenschlager, 2015).



**Figure 22 : Modification de la composition membranaire des sites de réplication du HCV suite à l'action des protéines de transfert de lipides.**

(1) Les protéines NS5A et NS5B recrutent la PI4KIII $\alpha$  (voire  $\beta$ ) induisant la synthèse de la PI4P au niveau de ce site. (2) La protéine de transfert des lipides fixant l'oxystérol (OSBP) est alors recrutée, recrutement facilité par les interactions avec VAP-A/B et NS5A. La protéine OSBP délivre du cholestérol (membre de la famille des stérols) en échange de la PI4P. (3) La protéine adaptatrice à quatre phosphate 2 (FAPP2) peut aussi être recrutée au niveau des microdomaines membranaires contenant la PI4P. FAPP2 serait chargée de délivrer des glycosphingolipides aux membranes réarrangées par le HCV. Adaptée de (Paul & Bartenschlager, 2015).

#### - Implication des sphingolipides

Les sphingolipides (SLs) représentent une autre classe de lipides membranaires structuraux. Ils sont enrichis dans la membrane plasmique (Neumann & Van Meer, 2008) et jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal (Zhang et al., 2019). Ces lipides sont synthétisés à partir de la sérine et de la palmitoyl-CoA présentes au niveau des membranes du RE (Zhang et al., 2019). L'importance des SLs dans la réplication et l'assemblage a été démontrée pour de nombreux des virus à ARN sb (+), avec comme modèle de référence le HCV (Fig.22). De nombreuses équipes ont rapporté une augmentation de la synthèse des SLs dans des cellules hôtes infectées par le HCV (Roe et al., 2011 ; Hirata et al., 2012 ; Khan et al., 2014). D'autres études ont établi la présence d'un motif fixant les SLs (Glu230-Gly263) sur la protéine NS5B du HCV (Sakamoto et al., 2005 ; Hirata et al., 2012). Enfin, l'inhibition de l'activité enzymatique de la sérine palmitoyltransférase, enzyme cellulaire impliquée dans la phase initiale de la synthèse des SLs, réduit les taux de SLs ce qui entraîne une inhibition de la réplication du HCV dans les cellules hôtes *in vitro* (Sakamoto et al., 2005) ou dans des souris au foie humanisé (Hirata et al., 2012).

#### - Implication des acides gras

Les acides gras jouent aussi un rôle crucial pour la réplication de nombreux virus à ARN sb (+) incluant le HCV. Lors d'une infection par le HCV, une augmentation de la production d'acides gras est observée et résulte soit de l'augmentation de la synthèse et de l'activité de la fatty acid synthase (Nasheri et

al.,2013), soit de l'augmentation de l'acetyl-CoA carboxylase (Kapadia & Chisari, 2005), 2 enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras. L'inhibition de l'acetyl-CoA carboxylase, conduisant à une diminution de la production d'acides gras, diminue la réplication virale du HCV (Kapadia & Chisari, 2005), ce qui montre l'implication des acides gras dans sa réplication.

#### IV. Techniques d'étude des usines virales

La découverte et l'étude des VFs ont été permises grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la microscopie (Wolff et *al.*, 2020).

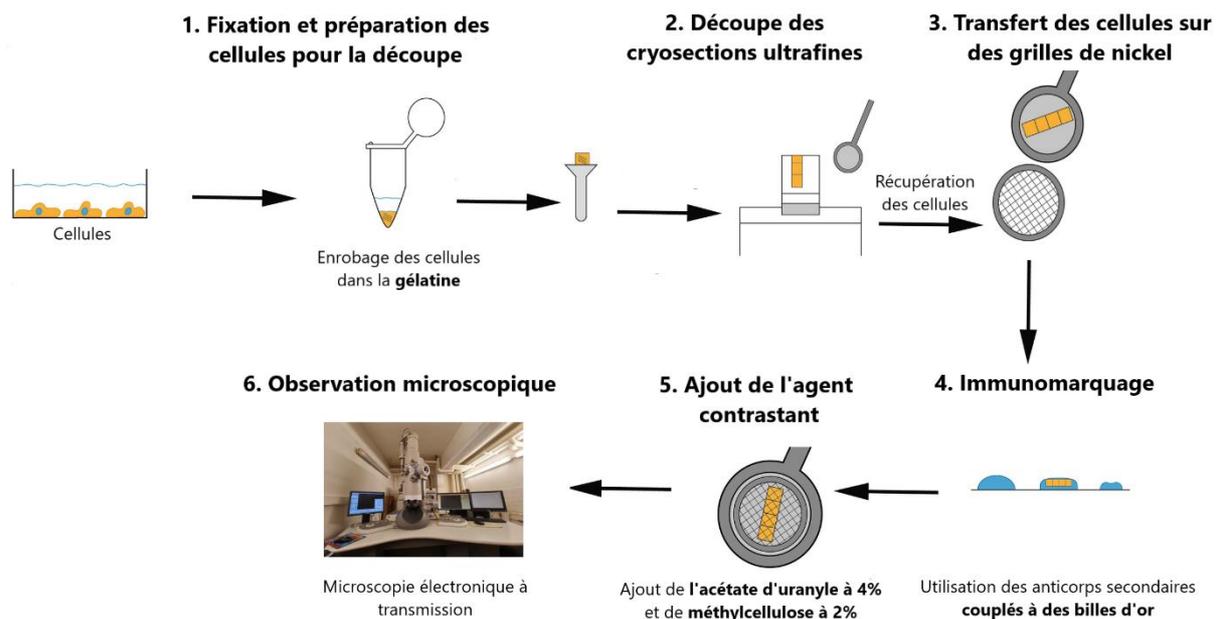
L'étude des VFs comprend non seulement la caractérisation de leur biogenèse, structure et fonction mais aussi leur évolution au cours du cycle infectieux. Les premières analyses des VFs ont été faites par microscopie électronique ou optique. La première mise en évidence de l'existence de VFs a été réalisée grâce à la microscopie électronique à transmission (MET) sur des coupes minces de cellules infectées. Ces premières observations ont montré la présence de particules virales associées à des macrostructures issues d'organites qui ont été remodelées et transportées vers des emplacements intracellulaires particuliers. La microscopie optique a ensuite permis d'observer comment les virus changeaient l'organisation générale des cellules infectées pour construire leurs VFs. Le développement de nouveaux outils technologiques a permis par la suite d'apporter de nouvelles informations sur la formation et la fonction des VFs (Fernández de Castro et *al.*, 2020).

Une vue d'ensemble de la progression d'une infection peut être obtenue en combinant l'immunofluorescence et la microscopie confocale. Pour cela, des cellules à différents temps post-infection sont marquées avec des anticorps primaires spécifiques des protéines virales et des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores, puis analysées par microscopie confocale. Quand des virus fluorescents peuvent être produits et utilisés, la microscopie de la cellule vivante en temps réel permet d'avoir une vue précise des différentes étapes du cycle infectieux, y compris la formation des VFs. De plus, le marquage simultané des protéines virales ou des virus avec des marqueurs de compartiments cellulaires permet l'identification de l'organite détourné par le virus tout en fournissant une vue dynamique de leur transformation durant l'assemblage des VFs (Fernández de Castro et *al.*, 2020).

L'analyse détaillée des VFs et de leurs composants nécessitent d'utiliser la MET à très haute résolution. L'approche la plus courante est l'étude de coupes suffisamment fines (entre 50 et 100 nm) pour que les électrons puissent les traverser et donc générer une projection d'images en 2D. Les multiples progrès réalisés dans la préparation des échantillons pour la MET permettent de s'approcher de plus en plus de la visualisation de la structure native des VFs. De nombreuses techniques d'imagerie 3D sont désormais disponibles et permettent d'identifier les différents composants des VFs. Parmi celles-

ci, la reconstruction 3D de coupes en série et la tomographie électronique sont les plus fréquemment utilisées (Fernández de Castro et *al.*, 2020).

La microscopie corrélative allie la puissance des approches en microscopies photonique et électronique en combinant les images obtenues à partir d'un même échantillon. Cette technique permet donc d'étudier à une résolution nanométrique les différentes étapes du cycle infectieux des virus dans leur cellule hôte, y compris la formation des VFs (Fernández de Castro et *al.*, 2020). Une autre technique de microscopie électronique à transmission avec un marquage des métaux lourds permet l'identification et la localisation de protéines intracellulaires avec non seulement une spécificité élevée mais aussi une sensibilité exceptionnelle avec une résolution à l'échelle moléculaire (Fernández de Castro et *al.*, 2017 ; Fernández de Castro et *al.*, 2020). Cette technique se base sur la fusion de protéines d'intérêt avec la métallothionéine (MT). Il s'agit d'une petite protéine de 61 aa dont 20 résidus cystéine, ayant la capacité de se lier très efficacement aux atomes d'or moléculaire. Après traitement des échantillons par des sels d'or, la fixation de l'or sur la protéine fusionnée conduit à la formation d'une nanoparticule d'or dense aux électrons d'environ 1nm de diamètre, la rendant ainsi facilement visualisable par microscopie électronique (Diestra et *al.*, 2009 ; Risco et *al.*, 2012 ; Mercogliano & DeRosier, 2007).



**Figure 23 : Principe de la technique d'immunomarquage selon Tokuyasu.**

Adaptée à partir de (Tokuyasu, 1973) et (Sachse et *al.*, 2018).

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé la technique de Tokuyasu qui permet d'étudier la localisation ultra-structurale de protéines par immunomarquage à l'or sur des cryo-coupes. Cette technique consiste à fixer les cellules avec du paraformaldéhyde puis à les enrober dans de la gélatine

qui préserve l'antigénicité des épitopes. Après ajout de sucrose (cryo-protecteur), les culots cellulaires enrobés de gélatine sont congelés puis des cryo-coupes ultrafines de 90nm sont réalisées à une température de -110°C grâce à un cryo-ultramicrotome. Les cryo-coupes sont ensuite enrobées dans un mélange de méthylcellulose à 2% et de saccharose à 2,3M puis déposées sur des grilles de nickel recouvertes de formvar/carbon. Un immunomarquage est alors réalisé à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et d'un anticorps secondaire couplé à des billes d'or colloïdal. Un agent de contraste, mélange d'acétate d'uranyle à 4% et de méthylcellulose à 2%, est ensuite utilisé afin d'analyser les sections au microscope électronique à transmission à 100kV. En fonction de la masse des atomes présents au niveau de l'échantillon, les électrons projetés sont plus ou moins déviés. L'or étant un atome lourd, il provoque une importante déviation des électrons ce qui se traduit par des points noirs correspondant donc aux protéines marquées. L'acétate d'uranyle présent dans l'agent de contraste ne se fixe pas sur les lipides des membranes cellulaires, permettant alors le passage des électrons au travers de ces membranes. Ainsi, les membranes cellulaires apparaissent en blanc et les constituants cellulaires en nuance de gris (Tokuyasu, 1973) (**Fig.23**).

## **Contexte et objectifs de recherche**

## **Partie I : C a r a c t é r i s a t i o n d e s u s i n e s v i r a l e s**

La réplication et l'assemblage de nombreux virus à ARN sb (+) se déroulent dans des compartiments intracellulaires connus sous le nom d'usines virales. Ces structures viro-induites présentent de nombreuses fonctions notamment la concentration des protéines et acides nucléiques viraux mais aussi des facteurs cellulaires nécessaires aux différentes étapes du cycle infectieux de ces virus. La nature et la localisation des usines virales sont très diverses et dépendent de la stratégie de réplication des virus. La biogenèse des usines virales permet au virus de conserver son identité au sein de la cellule hôte et de différencier ce qui le constitue de ce qui lui est extérieur. La découverte et la caractérisation des usines virales ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques telles que l'identification de drogues capables d'inhiber leur formation ce qui pourrait permettre de lutter contre l'infection.

La réorganisation des membranes de la cellule hôte semble être un mécanisme conservé dans le cycle infectieux des virus à ARN sb (+). Jusqu'à présent, aucune étude ne porte sur l'identification et la caractérisation des usines virales du HEV. C'est pourquoi, en collaboration avec la plateforme de microscopie électronique de Tours, nous avons cherché à déterminer si le HEV nécessite l'induction d'une telle réorganisation membranaire pour se répliquer.

**Mon premier o b j e c t i f d e t h è s e é t a i t d ' i d e n t i f i e r e t d e**

## Partie II : Caractérisation de la maturation de la réplicase virale

En comparant la séquence de la réplicase du HEV avec d'autres protéines NS de virus à ARN sb (+), 7 domaines ont été identifiés dans l'ORF1. Bien que de nombreuses polyprotéines virales soient généralement clivées par des protéases virales et cellulaires, l'ensemble des données publiées sur l'ORF1 du HEV ne permet pas de dégager une conclusion quant à l'existence d'une maturation de cette protéine virale. Jusqu'à présent, les tentatives de caractérisation de l'ORF1 se sont heurtées aux difficultés d'amplification du HEV en culture cellulaire, au faible niveau d'expression de l'ORF1 par rapport aux deux autres protéines virales et à l'absence d'anticorps commercial spécifique pour détecter cette protéine. De ce fait, la localisation subcellulaire précise de l'ORF1 ainsi que le compartiment cellulaire où a lieu la réplication du génome viral restent à définir.

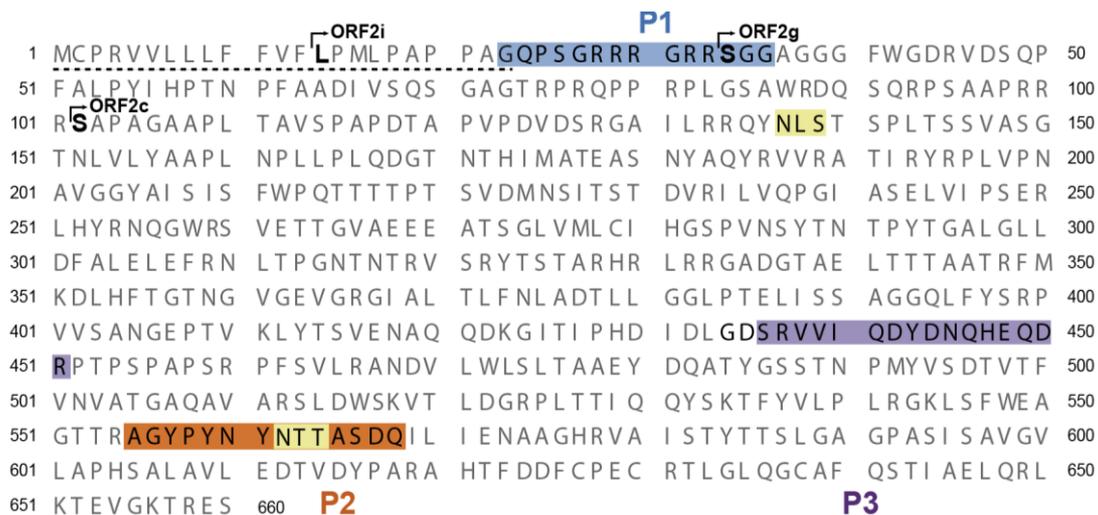
**Mon deuxième objectif de thèse était de me concentrer sur l'étude de l'ORF1 à l'aide de méthodes de localisation subcellulaires où a lieu la réplication du HEV.**

# Résultats

# Partie I : Caractérisation des usines virales

## I. Contexte scientifique :

L'étude du HEV a longtemps été difficile en raison de l'absence d'un système efficace de culture cellulaire. Un système de culture du HEV, basé sur la transfection de cellules PLC3 avec l'ARN de la souche-p6 de HEV-3, a été mis au point auparavant par notre équipe (Montpellier et *al.*, 2018). Il a ainsi été démontré qu'au cours de son cycle infectieux, le HEV produit au moins trois formes de la protéine de capsid ORF2. La première forme, appelée ORF2i, est associée aux particules virales alors que les deux autres formes, appelées ORF2g et ORF2c, ne sont pas associées à du matériel particulaire et ne sont pas infectieuses. Ces deux formes (ORF2g et ORF2c) sont hautement glycosylées, massivement sécrétées dans le surnageant de culture de HEV et sont les antigènes viraux majeurs dans le sérum des patients infectés. Elles pourraient servir de leurres immunologiques (Montpellier et *al.*, 2018). Au cours de ma thèse, le laboratoire a généré des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les différentes formes de la protéine de capsid (**Fig.24**). Les anticorps dirigés contre les peptides 1 et 2 (P1 et P2) reconnaissent uniquement la forme ORF2i tandis que les anticorps dirigés contre le peptide 3 (P3), comme l'anticorps commercial 1E6, reconnaissent les différentes formes de l'ORF2.



**Figure 24 : Séquence de la protéine ORF2 montrant les différents épitopes cibles des anticorps monoclonaux générés par le laboratoire.**

La ligne en pointillé correspond à la séquence du peptide signal de l'ORF2. Les sites de N-glycosylation sont colorés en jaune. Les peptides P1, P2 et P3 sont respectivement colorés en bleu, orange et violet.

**Ma contribution dans le projet :**

Au cours de ma thèse, j'ai activement participé à ce projet portant sur la génération et la caractérisation des anticorps monoclonaux anti-ORF2 et sur l'identification et la caractérisation des usines virales du HEV. Ainsi, j'ai transfecté par électroporation des cellules PLC3 et des cellules Huh-7.5 avec l'ARN de la souche infectieuse HEV-p6. A différents temps post-transfection, j'ai fixé les cellules électroporées et les ai analysées par immunofluorescence (IF). Grâce à plusieurs séjours dans le laboratoire de Morphogénèse et Antigénicité du HIV et des Virus des Hépatites de Tours, dirigé par le Pr P. Roingeard, je me suis formée aux techniques de préparation d'échantillons et d'analyse par microscopie électronique (EM). Nous avons ainsi visualisé pour la première fois des structures viro-induites par le HEV. J'ai réalisé en EM la caractérisation des anticorps anti-ORF2. De plus, l'analyse approfondie par des approches d'immunomarquages a montré que les structures viro-induites sont probablement dérivées du compartiment endosomal de recyclage (ERC) et constitueraient les usines virales du HEV. En effet, nous avons réussi à visualiser les particules virales du HEV dans des cellules PLC3/HEV. Enfin, j'ai été fortement impliquée dans les études fonctionnelles réalisées grâce à la technique de l'interférence par l'ARN et qui ont permis de définir l'implication de la protéine Rab11 dans le cycle infectieux du HEV.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Culture cellulaire

Les cellules PLC3 (sous-clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5) et Huh-7.5 (sous-clone des cellules Huh-7) ont été gardées en culture à 37°C dans un milieu DMEM (pour Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'acides aminés non essentiels (Life Technology).

### 2. Plasmides et électroporation

Un système efficace de culture du HEV a été mis au point par notre équipe. Il est basé sur la transfection de l'ARN de la souche HEV-p6 de HEV-3 dans des cellules PLC3, qui sont hautement permissives à la réplication du HEV (Montpellier et *al.*, 2018). Pour cela, le plasmide pBlueScript SK(+) abritant l'ADNc total du génome du HEV-3 de la souche Kernow-C1/p6 (Numéro d'accèsion JQ679013) adaptée à la culture cellulaire, nous a été offert gracieusement par le Pr S.U. Emerson (Shukla et *al.*, 2012). Un kit mMMESSAGE mMACHINE® (Ambion) a été utilisé selon les recommandations du fabricant afin d'obtenir des ARN génomiques cappés. D'abord, le plasmide pBlueScript SK(+)-HEV-p6 a été linéarisé en 3' au niveau du site de restriction de l'enzyme MluI (10U/μl). Ensuite, cet ARN linéarisé a été utilisé comme matrice pour la transcription et des aliquots de 10μg d'ARN ont été préparés et conservés à -80°C. Lors de l'électroporation, les cellules PLC3 ont été trypsinées puis lavées deux fois avec du milieu OptiMEM (Life Technology). Trois millions de cellules ont été transfectées par électroporation avec 10μg d'ARN de la souche infectieuse. Des cellules contrôles (PLC3 mock) ont été préparées en parallèle par électroporation avec du PBS. Les électroporations ont été réalisées avec un électroporateur Gene Pulser Xcell™ apparatus (Bio-Rad). Des cellules Huh-7.5 ont aussi été transfectées par électroporation dans les mêmes conditions que les cellules PLC3.

Afin de déterminer l'implication des protéines virales dans la formation des structures viro-induites par le HEV, nous avons utilisé deux mutants : le mutant HEV-ΔORF3 (Graff et *al.*, 2005b) qui est un mutant n'exprimant plus la protéine ORF3 et le mutant HEV-5R/5A qui est déficient pour la formation de particules infectieuses mais qui n'affecte pas la réplication virale (Hervouet, Ferrié, Ankavay et *al.*, 2021). Dans ce mutant 5 résidus arginine ont été remplacés par 5 résidus alanine dans la partie N-terminale de l'ORF2.

### 3. Anticorps

Les anticorps primaires reconnaissant les protéines virales ORF2 et ORF3 ou reconnaissant un certain nombre de marqueurs cellulaires, utilisés dans nos études en western-blot (WB), immunofluorescence (IF) et immunogold (IG) sont présentés dans le **Tableau 2**.

Les anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (Alexa 488 et Cy3) utilisés en IF ont été commandés chez Jackson ImmunoResearch, alors que les anticorps secondaires couplés à des billes d'or (de 6 et 10nm de diamètre) utilisés en EM ont été commandés chez Aurion (Wageningen, Pays-bas).

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents anticorps utilisés en IF et en EM.**

Les marqueurs de cytosquelette sont colorés en vert clair (Tub et MTOC), les marqueurs de la voie de sécrétion (Calnexine et ERGIC-53) sont colorés en gris, les marqueurs des endosomes précoces (EEA1 et Rab5) sont colorés en jaune clair, les marqueurs des endosomes tardifs/MVB (Rab9a, 5A6 et le CD63) sont colorés en bleu clair, les marqueurs du compartiment de recyclage (Rab11, CD71, EHD1, MICAL-L1, PACSIN2) sont colorés en rouge, ceux des péroxysomes (PMP70 et la catalase) sont colorés en bleu, de la mitochondrie (TOM20) en vert plus foncé, le marqueur des lysosomes (LAMP1) est coloré en jaune foncé.

Nom	Cible/ Epitope	Hôte	Isotype	Source	Référence	Ab Registry	WB	IF	IG
<b>P1H1</b>	ORF2i GQPSGRRRRGRRSGG	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
<b>P2H1</b>	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG2a	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
<b>P2H2</b>	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG1	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
<b>P3H2</b>	ORF2i/g/c SRVVIQDYDNQHEQDR	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
<b>1E6</b>	ORF2i/g/c GDSRVVIQDYDNQHEQ DRPTPSPA	Mouse	IgG2b	Millipore	MAB8002	AB_827236	1/2000	1/800	1/100
<b>ORF3</b>	ORF3 ANPPDHSAPLGVTRPSA PPLPHVVDLPQLGPRR	Rabbit	pAb	S. Emerson	[3]	n/a	n/a	1/1000	1/100
<b>Tub</b>	V-tubulin C-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5201	AB_609915	1/1000	1/100	n/a
<b>MTOC</b>	[-tubulin N-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5326	AB_532292	n/a	1/500	n/a
<b>Calnexin</b>	Human Calnexin	Rabbit		Abcam	ab22595	AB_2069006	n/a	1/1000	n/a
<b>ERGIC53</b>	ERGIC 53kDa protein	Mouse	IgG1	Enzo Life Sciences Inc	ALX-804- 602-C100	AB_2051363	n/a	1/100	n/a
<b>EEA1</b>	Early Endosome Antigen 1	Mouse	IgG1	Transduction Laboratories	610457	AB_397830	n/a	1/500	n/a
<b>Rab5</b>	Rab5	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#3547	AB_2300649	1/1000	1/200	n/a
<b>Rab9a</b>	Rab9a	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#5118	AB_10621426	n/a	1/50	n/a
<b>Rab11</b>	Rab11	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#5589	AB_10693925	n/a	1/50	n/a
<b>Rab11a</b>	Rab11a	Rabbit	(pAb)	ThermoFisher	71-5300	AB_2533987	n/a	n/a	1/10
<b>Rab11a</b>	Rab11a	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab128913	AB_11140633	1/20000	n/a	n/a
<b>Rab11b</b>	Rab11b	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab175925	n/a	1/10000	n/a	n/a
<b>5A6</b>	Tetraspanin CD81 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	S. Levy	[4]	AB_627192	n/a	1/300	1/30
<b>CD63</b>	Tetraspanin CD63 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	BD Pharmingen	556019	AB_396297	n/a	1/500	n/a
<b>CD71</b>	Transferrin receptor	Mouse	IgG1	Santa Cruz Biotechnology	sc-65882	AB_1120670	n/a	1/100	n/a
<b>CD71</b>	Transferrin receptor	Rabbit	pAb	Abcam	ab84036	AB_10673794	n/a	1/1000	1/100
<b>EHD1</b>	Eps15 homology domain protein 1	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab109747	AB_10864800	n/a	1/1000	n/a
<b>MICAL-L1</b>	Molecule Interacting with CasL-like1	Rabbit	IgG	Abcam	ab220648	n/a	n/a	1/100	n/a
<b>PACSIN2</b>	Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 2	Rabbit	IgG	MyBiosource	MBS7114698	n/a	n/a	1/1000	n/a
<b>PMP70</b>	70-kDa Peroxisomal Membrane Protein	Mouse	IgG1	Sigma	SAB4200181	AB_10639362	n/a	1/1000	n/a
<b>Catalase</b>	Catalase	Rabbit	IgG	Cell signaling	#12980	AB_2798079	n/a	1/800	n/a
<b>TOM-20</b>	Translocase of the outer mitochondrial Membrane	Mouse	IgG1	BD Biosciences	612278	AB_399595	n/a	1/100	n/a
<b>LAMP1</b>	Lysosomal associated membrane protein 1	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#9091	AB_2687579	n/a	1/200	n/a

#### 4. Immunofluorescence

Les cellules électroporées ont été cultivées sur lamelles dans des plaques 24 puits et fixées avec 3% de paraformaldehyde (PFA) pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS puis perméabilisées avec du méthanol froid pendant 5 min et avec du Triton X-100 0,5% pendant 30 min. Les cellules ont par la suite été incubées pendant 30 minutes avec

10% de sérum de chèvre dilué dans du PBS et incubées avec les anticorps primaires. Les dilutions des différents anticorps sont détaillées dans le **Tableau 2**. Après 3 lavages avec du PBS, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires isotype-spécifiques conjugués à des fluorochromes et dilués au 1/500. Parallèlement, le noyau des cellules a été marqué avec du DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) dilué au 1/500. Enfin, les lamelles portant les cellules fixées et marquées ont été montées sur des lames porte objets en présence de Mowiol (Calbiochem) puis analysées par microscopie confocale LSM (Zeiss) *via* l'objectif à immersion 63X.

Le contrôle d'efficacité d'électroporation a été réalisé à 3 jours post-électroporation. Les analyses de localisation subcellulaire ont été réalisées à 6 ou 12 jours post-électroporation. Les calculs des coefficients de colocalisation de la protéine ORF2 avec les différentes protéines cellulaires ont été réalisés 12 jours post-électroporation en déterminant le coefficient de chevauchement de Mander (MOC) en utilisant le plugin JACoP du logiciel Fiji.

### **5. Immunoprécipitation**

Les immunoprécipitations ont été réalisées en utilisant un kit de billes magnétiques appelé Dynabeads™ Antibody Coupling kit (Thermofisher) selon les recommandations du fabricant. Les anticorps ont été incubés avec les billes pendant une nuit à 37°C. Les billes ont ensuite été lavées 6 fois avec du tampon PBS + 0.5% NP-40 et incubées pendant 1h à température ambiante avec des surnageants (soit inactivés par la chaleur soit traités au triton) ou des lysats de cellules PLC3/HEV. Par la suite, les billes ont été lavées, resuspendues dans du tampon Laemmli puis inactivées pendant 20 min à 80°C. Les protéines ont été ensuite séparées par SDS-PAGE puis révélées en WB en utilisant les anti-ORF2 du laboratoire ou l'anticorps commercial anti-ORF2 (1E6) (**Tableau 2**).

### **6. Western blot**

Les cellules ont été lysées pendant 20min à +4°C avec un tampon de lyse contenant 10mM de Tris-HCl (pH=7), 150mM de NaCl, 2mM d'EDTA, 0,5% Triton X-100, 1mM de PMSF et des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Les surnageants ainsi que les lysats cellulaires ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les quantités de protéines ont été déterminées en utilisant un kit de dosage BCA (Sigma). Les surnageants et les lysats ont été inactivés pendant 20min à 80°C en présence de tampon Laemmli en conditions réductrices (DTT). Les protéines ont ensuite été séparées par SDS-PAGE 10% et transférées sur des membranes de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham). Après blocage de la membrane avec du PBS-Tween 20 0,2%-Lait 5 %, les protéines ont été détectées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS- Tween 20 0,2%-BSA 2% (**Tableau 2**) et des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase dilués dans du PBS-Tween 20 0,2%-Lait 5 %. La révélation des protéines a été effectuée par chimioluminescence (ECL, Amersham).

## 7. Analyses en microscopie électronique

### 7.1. Préparation des cellules pour la microscopie électronique

Les cellules électroporées avec l'ARN de la souche p6 sauvage ou mutée ont été cultivées pendant 6 jours à 37°C dans un milieu DMEM puis trypsinées et lavées 3 fois avec du PBS froid. Ensuite, elles ont été incubées pendant au moins 1 heure avec du tampon de fixation (PFA 4%- Glutaraldéhyde 0,05% dans du tampon phosphate 0,1M de pH=7,2). Après, les cellules ont été centrifugées pendant 5min à 800 rpm afin d'enlever la solution de fixation. Un dixième de la solution de fixation a été gardé lors du transport des échantillons afin d'offrir une meilleure préservation de l'architecture cellulaire native. L'étape de préparation des cellules constitue une étape cruciale pour la microscopie électronique puisqu'elle permet le maintien des structures cellulaires. En revanche, une fixation de mauvaise qualité des cellules peut entraîner un blocage de l'accessibilité aux antigènes.

### 7.2. Immunomarquage selon la technique de Tokuyasu

Comme son nom l'indique, la technique de Tokuyasu a été développée par Tokuyasu pour des localisations fines de molécules telles que les protéines et les acides nucléiques à l'échelle nanométrique (Tokuyasu, 1973). Cette technique permet d'obtenir des sections ultrafines de 90nm, sans artefact et sans endommager les cellules. L'immunomarquage en utilisant cette technique est réalisée en plusieurs étapes. Les cellules sont d'abord lavées 3 fois avec du PBS afin de bloquer les effets du glutaraldéhyde contenu dans la solution de fixation. Afin de faciliter la découpe, les cellules sont ensuite enrobées avec de la gélatine à 12% pendant 1h à 37°C puis incubées pendant la nuit à +4°C avec une solution contenant 2% de méthylcellulose et 2,3M sucrose. Des coupes ultrafines de 90nm sont réalisées à une température de -110°C à l'aide d'un cryo-ultramicrotome LEICA FC7. Les cryo-coupes placées sur des grilles sont gardées à +4°C. Pour les immunomarquages, les grilles ont été lavées deux fois pendant 5min avec du PBS afin d'enlever la gélatine puis incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps primaires. La dilution des anticorps est indiquée dans le **Tableau 2**. Les grilles ont été lavées 6 fois avec du PBS puis incubées avec les anticorps secondaires conjugués à des billes d'or. Enfin, les grilles ont été incubées avec une solution contenant 2% d'acétate d'uranyle/2% méthylcellulose dilué au 1/10 afin d'améliorer le contraste. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM-1011 (100kV).

## 8. Endocytose de la transferrine

Les cellules PLC3/HEV et PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 ont été incubées en présence de 25 $\mu$ g/ml de transferrine couplée à l'Alexa633 (TrF) à 37°C puis fixées à différents temps (0, 1, 5, 10, 15, 30 et 45min). Des IF ont été réalisées par la suite avec le P1H1 et les cellules ont été analysées par microscopie confocale. Les coefficients de Mander ont été également calculés afin d'étudier la co-distribution de l'ORF2 avec la transferrine marquée.

### 9. Interférence de Rab11

L'interférence par l'ARN ou le RNA silencing est une technique qui consiste à réguler négativement l'expression d'un gène cible grâce à l'utilisation de petits ARN interférents ou siRNA pour « small interfering RNA ». Les siRNA induisent l'inhibition d'un gène en dirigeant le clivage des ARN qui leur sont complémentaires ou en inhibant la traduction d'une séquence bien définie (Reynolds et *al.*, 2004).

Dans le cadre de notre projet et afin d'étudier l'implication de la GTPase Rab11 au cours de cycle viral du HEV, une inhibition de l'expression du gène Rab11 a été réalisée en utilisant des siRNA dirigés contre les 2 isoformes de Rab11, Rab11a (ON-TARGET plus human Rab11a, gene 8766, siRNA SMART pool) et Rab11b (ON-TARGET plus human Rab11b, gene 9230, siRNA SMART pool) de la société Horizon. Trois jours après électroporation, des cellules PLC3/HEV ou PLC3 mock ont été transfectées avec les siRNA Rab11a et Rab11b. Des cellules transfectées avec des siRNA dirigés contre l'épitope Flag (Dharmacon) ont été utilisées comme contrôles. Les transfections ont été réalisées avec du RNAiMax selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). L'inhibition d'expression dans les cellules transfectées a été contrôlée trois jours post-transfection en IF et en WB. De même, les quantifications de l'ARN viral extracellulaire dans les surnageants des cellules transfectées, ont été réalisées par RT-qPCR et par qIP à l'aide du P1H1. L'effet de l'interférence sur la production virale a été analysé par titrage viral des surnageants des cellules transfectées.

### 10. Quantification de l'ARN viral

Les ARN viraux extracellulaires ont été extraits des surnageants cellulaires en utilisant le kit Qiamp ARN viral (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. Parallèlement, les ARN viraux extracellulaires provenant des IP avec le P1H1, ont été extraits en utilisant le tampon de lyse du kit d'extraction de l'ARN (NucleoSpin RNA plus, Macherey-NAGEL). Des réactions de transcription *in vitro* ont été faites comme décrites dans la **partie 1** puis des réactions de PCR quantitatives ont été faites en utilisant des sondes Taqman (ThermoFisher) ciblant des séquences spécifiques de la protéine ORF2 (**Tableau 2 de la partie 2**).

### 11. Quantification des titres infectieux

Le surnageant des cellules PLC3/HEV, des cellules transfectées avec les siRNA et des cellules contrôles ont été prélevés 72h après la transfection et utilisés pour infecter des cellules Huh7.5 dans des plaques 96 puits platées 24h avant l'infection. Les cellules ont été fixées trois jours post-infection et la protéine ORF2 a été détectée par IF comme décrit précédemment. Le nombre de cellules positives pour l'ORF2 pour chaque dilution a été par la suite quantifié à l'aide d'un analyseur confocal InCell 6000 (GE Healthcare) et du logiciel d'analyse d'images Columbus (Perkin Elmer).

### III. Résultats obtenus

#### 1. Génération d'antic-ORF2ps monoclonaux anti

La protéine ORF2 est constituée de 660aa. Le premier aa de chacune des trois formes de l'ORF2 a été identifié auparavant. Il s'agit de la L14 pour l'ORF2i, de la S34 pour l'ORF2g et de la S102 pour l'ORF2c (Montpellier et *al.*, 2018 ; Ankavay et *al.*, 2019) (**Fig.24**). En se basant sur ces données, deux peptides immunogènes (P1 et P2) spécifiques de la forme ORF2i ont été identifiés. En effet, le peptide **P1** couvre l'extrémité N-terminale de l'ORF2i qui n'est pas présente dans les séquences des formes ORF2g/c. Le peptide **P2** couvre le 3<sup>e</sup> site de N-glycosylation de la protéine ORF2 qui est hautement N-glycosylé dans le cas des formes ORF2g/c lors de leur passage dans la voie de sécrétion. Le troisième peptide correspond à un épitope commun aux trois formes de l'ORF2. Afin de vérifier la spécificité inter-génotypes de chacun de ces épitopes ciblés, des alignements de séquences des 4 génotypes du HEV ont été réalisés (données non montrées). Les trois peptides produits ont été utilisés pour immuniser des souris. Suite au criblage d'environ 2000 hybridomes, un clone provenant de l'immunisation par le P1 (**P1H1**), deux clones provenant de l'immunisation par le P2 (**P2H1** et **P2H2**) et un clone provenant de l'immunisation par le P3 (**P3H2**) ont été sélectionnés et caractérisés.

#### 2. Caractérisation des anticorps monoclonaux anti-ORF2

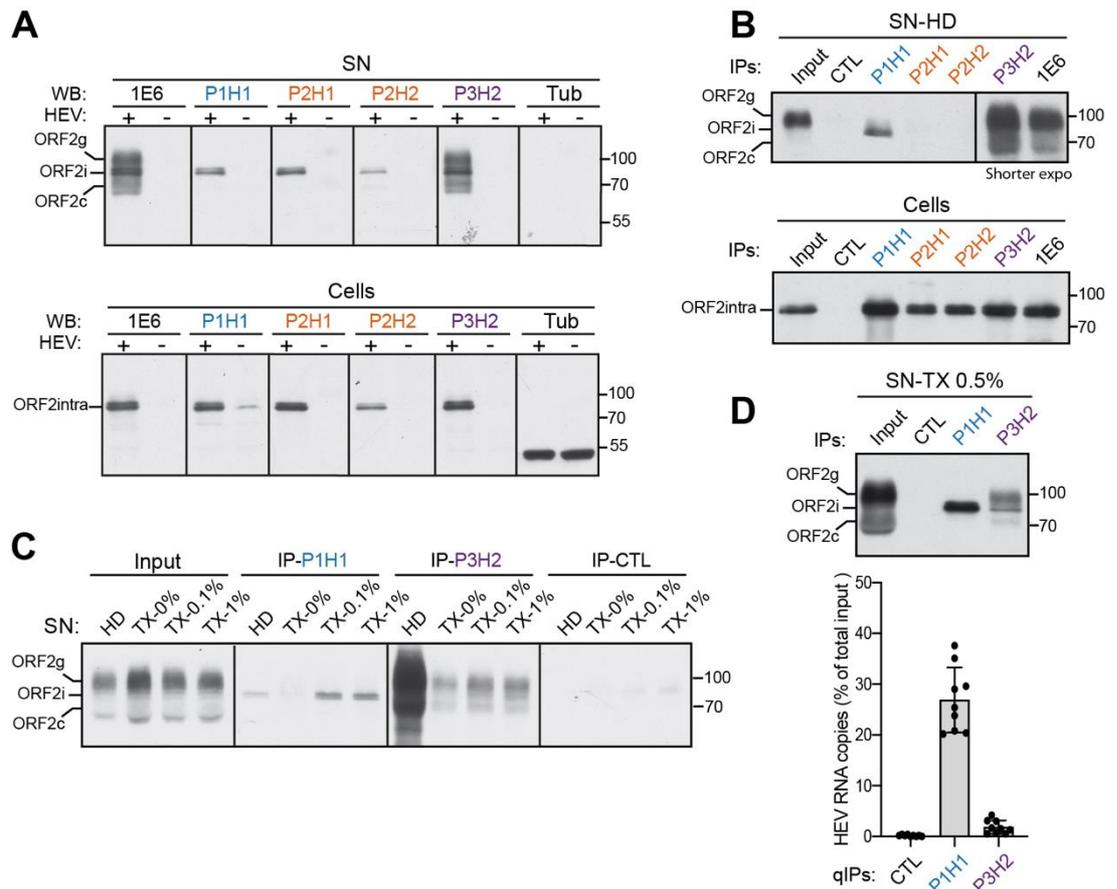
##### 2.1. Caractérisation des anticorps par WB

La spécificité de chacun des anticorps a été d'abord déterminée par WB en analysant leur réactivité vis-à-vis de surnageants et lysats cellulaires de cellules PLC3 électroporées avec l'ARN de la souche infectieuse HEV-p6 (PLC3/HEV) (**Fig.25A**). Des surnageants et des lysats de cellules PLC3 non électroporées ont été utilisés comme contrôles négatifs. L'anticorps commercial 1E6, reconnaissant les trois différentes formes de la protéine de capsid (Montpellier et *al.*, 2018), a été utilisé comme contrôle. Les analyses par WB ont révélé une haute spécificité des trois anticorps P1H1, P2H1 et P2H2 vis-à-vis de la forme ORF2i sans cross-réaction avec les deux formes glycosylées de l'ORF2 (ORF2g/c). De même, une reconnaissance des trois différentes formes a été montrée en utilisant les anticorps P3H2 et 1E6. Il a été auparavant démontré par notre équipe que les surnageants des cellules PLC3/HEV contiennent des particules infectieuses quasi-enveloppées (ORF2i) accompagnées d'une grande quantité de protéines ORF2g/c. En revanche, la forme intracellulaire de l'ORF2i (ORF2intra) est la forme majoritaire dans les lysats des cellules PLC3/HEV (Montpellier et *al.*, 2018 ; Ankavay et *al.*, 2019).

##### 2.2. Caractérisation des anticorps par immunoprécipitation

Les différents anticorps anti-ORF2 ont été utilisés pour immunoprécipiter des surnageants et des lysats de cellules PLC3/HEV inactivés à la chaleur (**Fig.25B**). Les immunoprécipitations de lysats avec les différents anticorps ont révélé une bonne reconnaissance de l'ORF2intra. Par contre, aucune forme ORF2 n'a été détectée dans les immunoprécipitations de surnageants en utilisant les anticorps P2H1 et P2H2 alors que les trois formes ont été détectées en utilisant les anticorps P3H2 et 1E6. De manière

importante, le P1H1 a montré une grande spécificité de reconnaissance de la forme ORF2i sans cross-réaction avec les formes ORF2g/c, indiquant que cet anticorps est capable d'immunoprécipiter les particules du HEV inactivées par la chaleur.



**Figure 25: Caractérisation des anticorps monoclonaux générés par WB.**

**A/** Détection de la protéine ORF2 dans les surnageants (SN) et les lysats des cellules PLC3/HEV (+) et les cellules contrôles (-) par WB. **B/** Immunoprécipitation de la protéine ORF2 dans les surnageants et les lysats cellulaires des PLC3/HEV inactivés par la chaleur (20min à 80°C). **C/** Immunoprécipitation des surnageants traités ou non pendant 30min avec du triton X-100. **D/** Quantification de l'ARN viral issu des immunoprécipitations faites avec les différents anti-ORF2. Dans B, C et D, les IP ont été analysées par WB en utilisant le 1E6.

### 2.3. Etude de la fonctionnalité des anticorps anti-ORF2 en présence d'un détergent

Les particules HEV produites dans le surnageant des PLC3/HEV sont entourées de lipides qui masquent les épitopes ORF2. C'est pourquoi nous avons ensuite analysé la capacité des anticorps P1H1 et P3H2 à immunoprécipiter des particules HEV délipidées. Pour cela, les surnageants de PLC3/HEV ont été traités (TX-0,1% et TX-1%) ou non (TX-0%) avec du Triton X-100 avant d'être immunoprécipités avec les anticorps P1H1 (**IP-P1H1**) et P3H2 (**IP-P3H2**) (**Fig. 25C**). Du surnageant dénaturé par la chaleur (HD) a été utilisé comme contrôle positif. Dans les échantillons TX-0%, aucune forme ORF2 n'a été détectée dans les IP-P1H1 alors que les formes ORF2g/c étaient immunoprécipitées par le P3H2. Par contre, dans les échantillons TX-0,1% et TX-1%, les IP-P1H1 ont montré une reconnaissance spécifique de la

protéine ORF2i sans cross-réactivité avec les deux autres formes alors que les IP-P3H2 ont révélé les 3 formes ORF2. Ces analyses indiquent que l'anticorps P1H1 permet d'immunoprécipiter spécifiquement les particules HEV non associées à des lipides.

#### 2.4 Etude de la capacité des anticorps P1H1 à capturer les particules infectieuses

Afin de confirmer la capacité de l'anticorps P1H1 à immunocapturer des particules virales dans des surnageants de PLC3/HEV traités avec du Triton X-100 (TX-0,5%), nous avons réalisé sur ceux-ci des IP-P1H1 et IP-P3H2 (**Fig.25D**, panel haut) suivies d'une quantification des ARN viraux par RT-qPCR (**Fig.25D**, panel bas). Le pourcentage d'immunocapture des génomes viraux par rapport à l'échantillon initial a été calculé. Seulement 2% d'ARN viral a été retrouvé dans les échantillons provenant de l'IP-P3H2 alors que 27% d'ARN a été quantifié dans les échantillons issus de l'IP-P1H1. Ainsi, ces résultats confirment la spécificité et la capacité de l'anticorps P1H1 à reconnaître les particules HEV infectieuses non enveloppées. De plus, ces résultats suggèrent que l'épitope reconnu par le P1H1, à savoir l'extrémité N-terminale de l'ORF2i, est exposée à la surface des particules HEV délipidées.

Il est à noter que des tests de neutralisation de particules non-lipidées ont été réalisés afin de mieux caractériser les différents anticorps anti-ORF2. Néanmoins, aucun de ces anticorps n'a montré une activité neutralisante indiquant que, même si l'épitope P1H1 est exposé à la surface des particules virales, celui-ci n'est pas impliqué dans l'entrée virale du HEV.

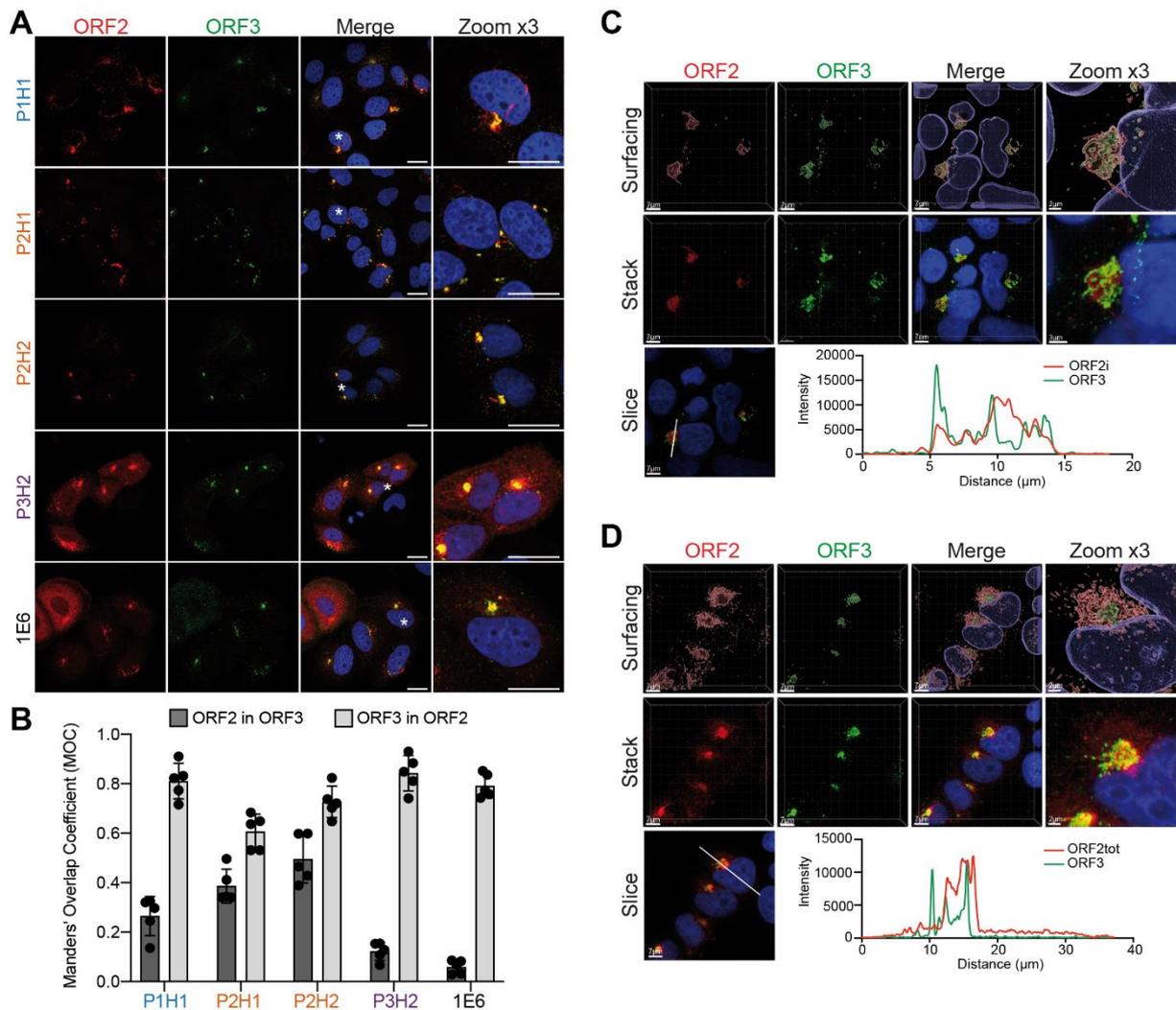
### 3. Etude par IF de l'expression et la localisation des protéines virales du HEV en système infectieux

Nous avons ensuite analysé en microscopie confocale des cellules PLC3/HEV marquées avec les différents anticorps anti-ORF2 et un anticorps dirigé contre la protéine ORF3 (**Fig.26A**). Les cellules marquées avec l'anticorps 1E6 ou l'anticorps P3H2 ont montré à la fois un marquage périmoléculaire condensé (nommé «pépité» au laboratoire) qui correspond à un regroupement de protéines ORF2i et un marquage réticulaire correspondant aux formes ORF2g/c empruntant la voie de sécrétion (**Fig.26A**). Par contre, les cellules marquées avec les anticorps P1H1, P2H1 et P2H2, spécifiques de l'ORF2i, n'ont montré que le marquage périmoléculaire de type « pépité » souvent associé à une déformation nucléaire.

Pour chaque anticorps, nous avons calculé le coefficient de chevauchement de Mander (MOC) du marquage ORF2 dans celui de l'ORF3 (**Fig.26B**, ORF2 in ORF3) ou du marquage ORF3 dans celui de l'ORF2 (**Fig.26B**, ORF3 in ORF2). Nous avons constaté que le marquage ORF3 recouvrait fortement avec celui de l'ORF2 de tous les anticorps, indiquant que la protéine ORF3 colocalise fortement avec les protéines ORF2 (**Fig.26B**, ORF3 in ORF2). De plus, les anticorps P1H1, P2H1 et P2H2 ont montré un MOC de l'ORF2 dans l'ORF3 plus élevé que celui de P3H2 et 1E6, indiquant que la protéine ORF3 colocalise principalement avec la protéine ORF2i (**Fig. 26B**, ORF2 in ORF3).

Des analyses plus poussées par microscopie confocale à super-résolution de cellules PLC3/HEV marquées avec le P1H1 (ORF2i, **Fig.26C**) ou le P3H2 (ORF2tot, **Fig.26D**) et l'anti-ORF3, ont montré un recouvrement total des intensités de fluorescence de l'ORF2i avec l'ORF3 (**Fig.26C**) alors qu'un décalage des intensités de fluorescence a été observé entre les protéines ORF2 totales et ORF3 (**Fig. 26D**).

Ensemble, ces résultats indiquent que les anticorps anti-ORF2, et plus spécifiquement les anticorps anti-ORF2i comme le P1H1, reconnaissent dans les cellules PLC3/HEV des structures périmoléculaires enrichies en ORF2 qui sont à proximité de la protéine ORF3.



**Figure 26 : Etude de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV en système infectieux par IF.**

**A-** Des cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN du clone infectieux HEV-p6. Après 12 jours, les cellules ont été fixées (PFA, 3%) et perméabilisées avec du méthanol froid et du Triton X-100 à 0,5%. Les marquages ont été réalisés avec les différents anticorps anti-ORF2 indiqués et un anticorps dirigé contre l'ORF3, suivis d'anticorps secondaires. Parallèlement, des cellules PLC3 mock ont été utilisées comme contrôles pour les différents marquages avec les anticorps anti-ORF2. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale. **B-** Calcul des chevauchements de Manders du marquage ORF2 dans celui de l'ORF3 (ORF2 in ORF3) ou du marquage ORF3 dans celui de l'ORF2 (ORF3 in ORF2). **C-D** Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec le P1H1 (C) ou le P3H2 (D) et l'anticorps anti-ORF3. En haut (Surfacing) est montré le rendu volumique des z-stacks en utilisant le logiciel Imaris afin de mieux visualiser les sous-structures colorées. Au milieu (Stack), les z-stacks sont montrés. En bas (Slice), les graphes montrent les intensités de fluorescence des marquages ORF2i / ORF2tot et ORF3 mesurées tous les 50 nm dans la région d'intérêt mise en évidence par la ligne blanche dans l'image montrée à gauche. Les barres d'échelle indiquent la longueur indiquée sur chaque image. L'ORF2 est en rouge, l'ORF3 est en vert, et les noyaux en bleu.

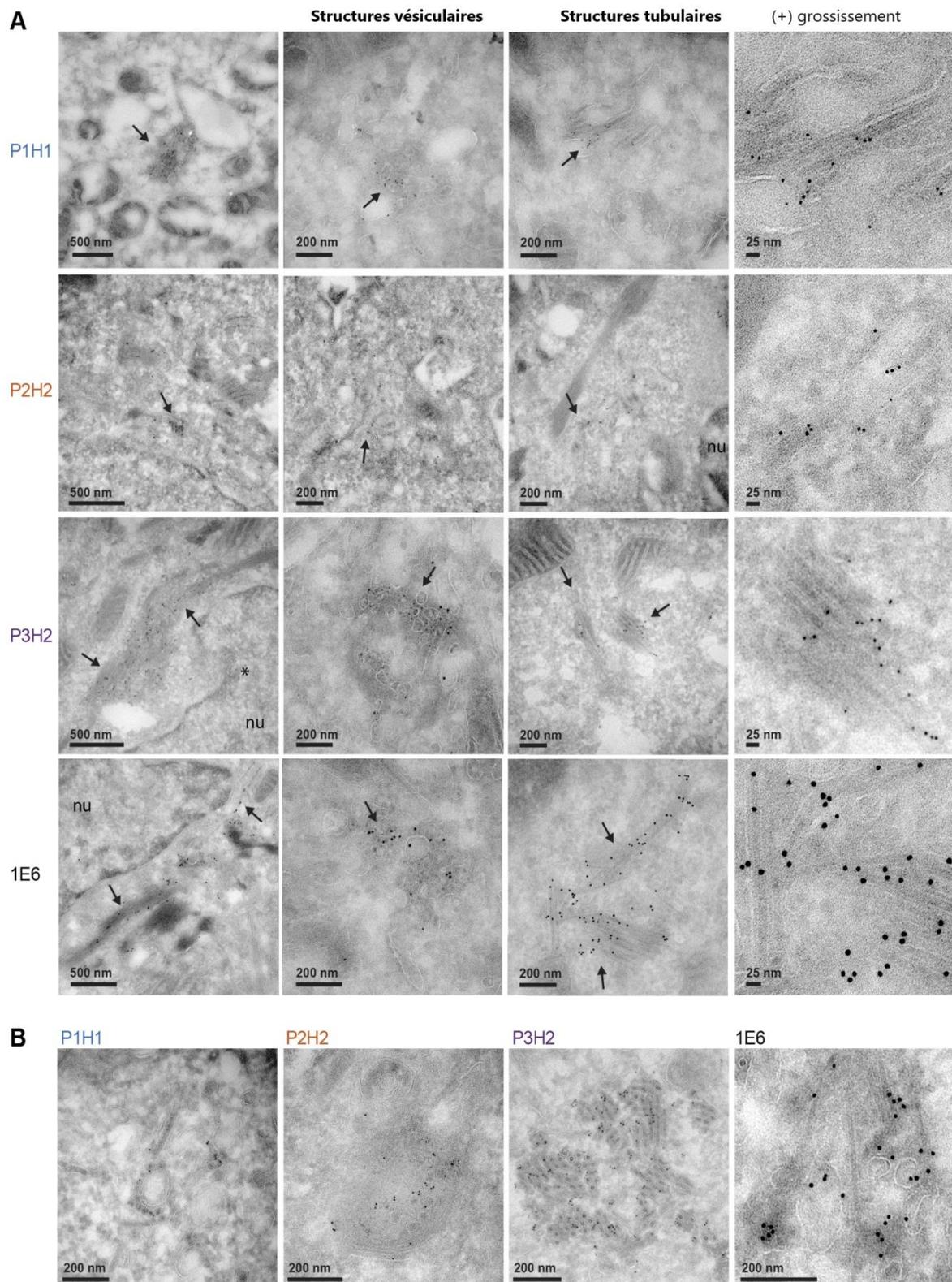
#### 4. Caractérisation des usines virales induites par le HEV

##### 4.1. Identification des usines virales induites par le HEV

Nous avons ensuite réalisé des analyses par EM. Pour cela des cryo-coupes de cellules PLC3/HEV ont été marquées avec les différents anticorps anti-ORF2 et des anticorps secondaires anti-souris couplés à des billes d'or de 6 nm de diamètre et analysées par EM.

L'analyse comparative des immunomarquages avec les différents anticorps anti-ORF2 des cellules PLC3/HEV a révélé la présence de protéines ORF2 au niveau de structures tubulaires et vésiculaires à proximité du noyau (**Fig.27A**). Le diamètre des structures tubulaires viro-induites a été estimé à 20-25 nm. Ces tubes forment des structures géométriques hautement organisées alors que les structures vésiculaires sont plus larges et présentent une grande hétérogénéité de diamètre. En effet, le diamètre des structures vésiculaires a été estimé à 50-250nm. Dans la majorité des cellules observées, un réseau de structures à la fois tubulaires et vésiculaires très développé a été retrouvé (**Fig.27B**, P1H1, P2H2 et 1E6). De même, des coupes transverses et des coupes longitudinales des structures tubulaires ont été observées dans les même sites (**Fig.27B**, P3H2). Il est à noter que ces structures sont bien des structures viro-induites puisqu'elles n'ont pas été observées dans les cellules PLC3 mock (données non montrées). En outre, ces résultats d'immunomarquages sont en accord avec ceux d'IF montrant la présence d'ORF2 sous forme d'une pépite périnucléaire associée à une déformation du noyau (**Fig.27A**, P3H2, \*).

Ainsi, ces résultats suggèrent que le HEV induit la formation de structures tubulaires et vésiculaires proches du noyau qui sont enrichies en protéine de capsid ORF2.

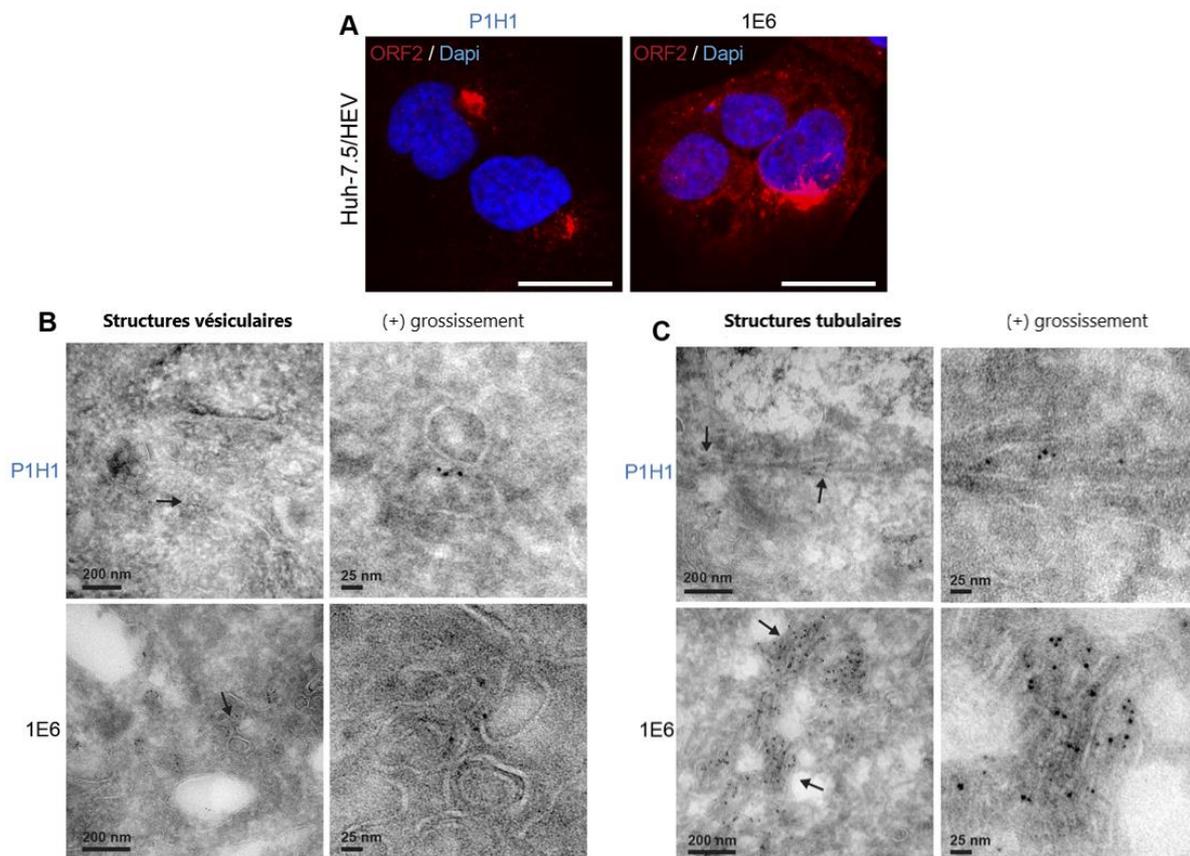


**Figure 27: Immunomarquage des cellules PLC3/HEV à l'aide des anticorps anti-ORF2.**

**A**-Des cryo-coupes de cellules PLC3/HEV ont été marquées avec les anticorps anti-ORF2 indiqués et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or de 6nm de diamètre, et analysées par EM. En **B** sont montrés des exemples de réseaux de structures à la fois tubulaires et vésiculaires (P1H1, P2H2 et 1E6) ainsi que de coupes transverses et longitudinales des structures tubulaires (P3H2).

#### 4.2 Validation des résultats dans un autre système de culture cellulaire

Des cellules Huh-7.5 ont été électroporées avec l'ARN du clone infectieux HEV-p6 (Huh-7.5/HEV) dans les mêmes conditions que les PLC3 et maintenues 6 jours en culture. Ensuite, ces cellules ont été fixées (PFA) puis perméabilisées avec du méthanol et du Triton X-100. Un marquage avec l'anticorps commercial anti-ORF2 (1E6) a été effectué afin d'évaluer l'efficacité d'électroporation. Ces IF ont montré que plus de 98% des cellules électroporées exprimaient la protéine ORF2 (données non montrées). De manière intéressante, les cellules Huh-7.5/HEV marquées avec l'anticorps 1E6 et l'anticorps P1H1 ont montrées les mêmes types de marquages observés dans les cellules PLC3/HEV à savoir un marquage périnucléaire condensé (avec le **1E6** et le **P1H1**) qui correspond à un regroupement de protéines ORF2i et un marquage réticulaire (observé seulement avec le **1E6**) correspondant aux formes ORF2g/c empruntant la voie de sécrétion (**Fig.28**).



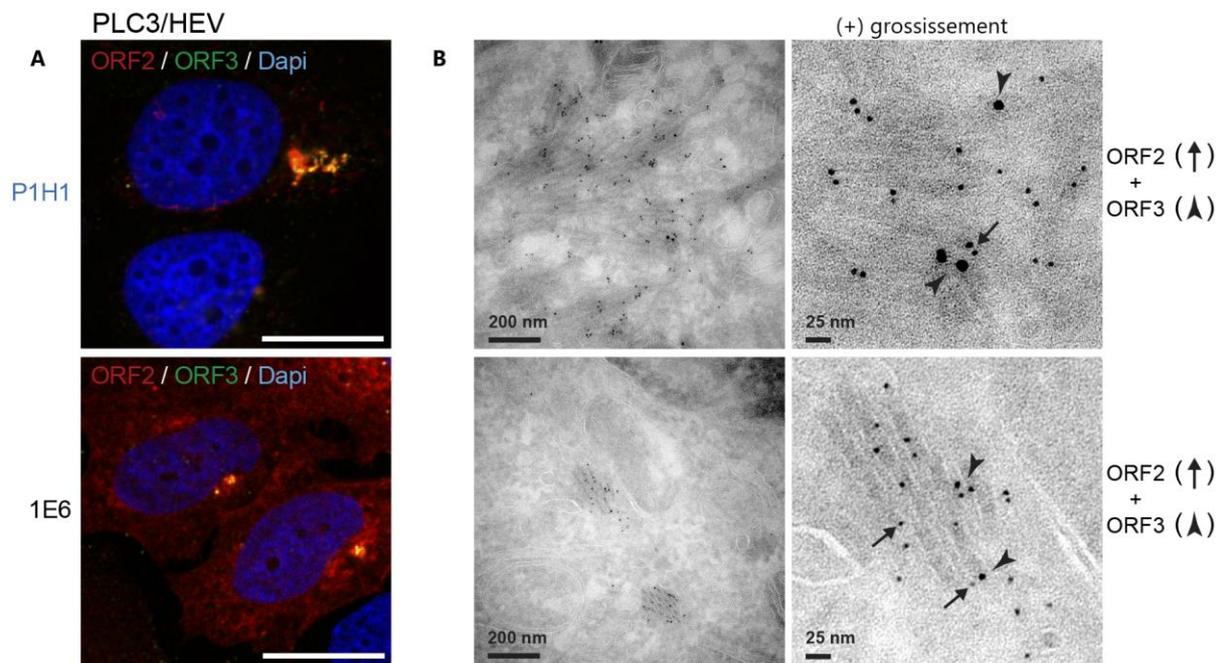
**Figure 28 : Identification de structures tubulaires et vésiculaires viro-induites dans les cellules Huh-7.5/HEV.**  
**A**-Des cellules Huh-7.5/HEV ont été marquées avec le 1E6 ou le P1H1 et analysées par microscopie confocale. **B** et **C**-Des cryo-coupages de cellules Huh-7.5/HEV ont été marquées avec le 1E6 ou le P1H1 et analysées par EM. En **B** sont montrées les structures vésiculaires et en **C** les structures tubulaires.

De manière importante, les mêmes types de structures viro-induites ont été retrouvées dans les Huh-7.5/HEV à savoir des structures tubulaires ayant un diamètre qui varie entre 20 et 25 nm et des structures vésiculaires de diamètre hétérogène.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats d'immunomarquages obtenus à la fois dans les cellules PLC3/HEV et les Huh-7.5/HEV indique que le HEV est capable d'induire deux types de réarrangements membranaires représentés à la fois par des structures tubulaires et vésiculaires.

#### 4.3 Analyse de la codistribution des deux protéines dans les usines virales

Des co-immunomarquages ont ensuite été réalisés sur les PLC3/HEV afin de visualiser simultanément la distribution des protéines ORF2 et ORF3 en EM. Pour cela, les cryo-coupes ont été co-marquées avec l'anticorps anti-ORF2 P1H1 et l'anticorps anti-ORF3 puis révélées respectivement avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à des billes d'or de 6 nm de diamètre et avec un anticorps anti-lapin couplé à des billes d'or de 10 nm (Fig.29).



**Figure 29 : Caractérisation de la distribution subcellulaire des protéines virales du HEV.**

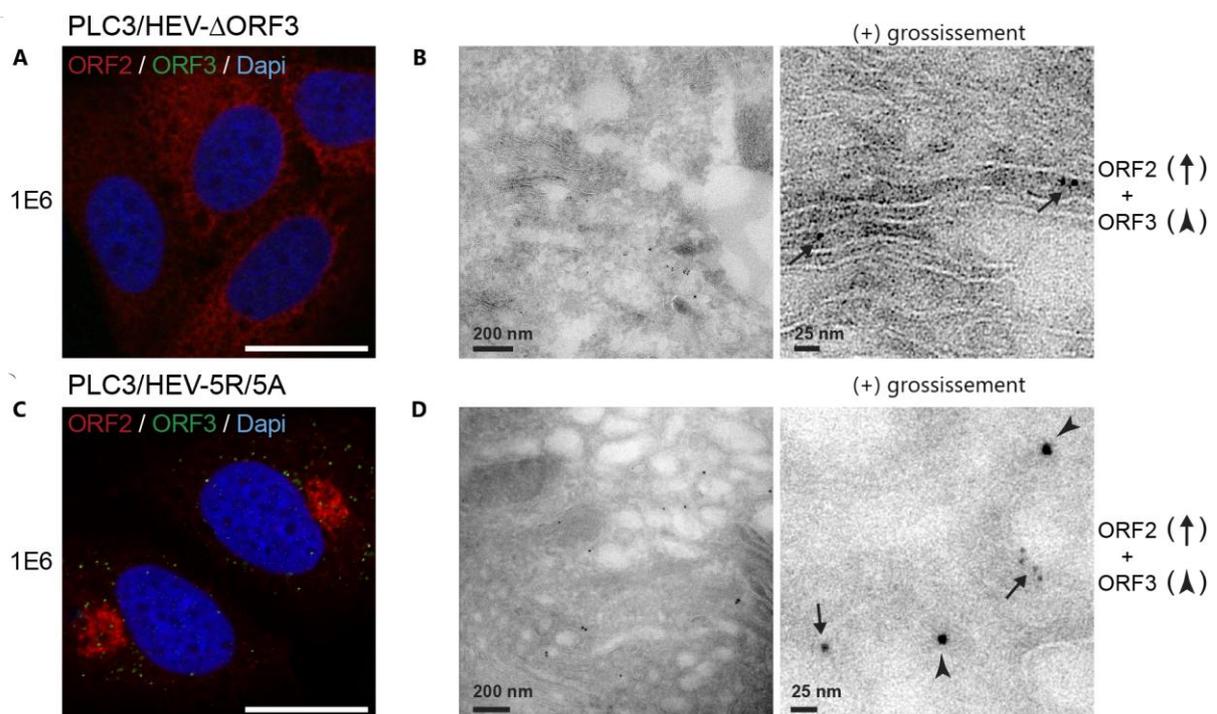
**A**-Etude de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV en système infectieux par IF. **B**-Co-immunomarquage avec un anticorps anti-ORF2 P1H1 et un anticorps anti-ORF3 des cellules PLC3/HEV observées en microscopie électronique. Des cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN de la souche infectieuse HEV-p6 puis fixées et marquées à la fois avec l'anticorps anti-ORF2 P1H1 et avec l'anticorps anti-ORF3 puis révélées respectivement avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à des billes d'or de 6 nm de diamètre et avec un anticorps anti-lapin couplé à des billes d'or de 10 nm.

L'analyse comparative des co-immunomarquages a montré une codistribution des protéines ORF2 et ORF3 dans les structures tubulaires et les structures vésiculaires des cellules PLC3/HEV (Fig.29B). Ces résultats confirment les résultats des IF (Fig.29A) qui montraient une co-localisation de ces deux

protéines virales en zone périnucléaire avec une légère déformation du noyau des cellules PLC3 infectées.

#### 4.4. des structures viro-induites

De manière à déterminer l'implication des protéines virales dans la formation des structures viro-induites par le HEV, nous avons eu recours à l'utilisation de deux mutants. Le premier mutant étant le HEV- $\Delta$ ORF3 (Graff et *al.*, 2005), un mutant n'exprimant plus la protéine ORF3, le deuxième étant le mutant HEV-5R/5A : ce mutant, dans lequel 5 résidus arginines ont été remplacés par 5 alanines dans la partie N-terminale, est déficient pour l'assemblage de l'ORF2 et n'affecte pas la réplication virale (Hervouet, Ferrié, Ankavay et *al.*, 2021).



**Figure 30 : Détermination de l'implication des protéines virales dans la formation des structures viro-induites par le HEV.**

**A+B-** Etude de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV dans les cellules électroporées avec les différents mutants. **C+D-** Co-immunomarquage avec l'anticorps anti-ORF2 1E6 et un anticorps anti-ORF3 des cellules électroporées avec le mutant HEV- $\Delta$ ORF3 (**C**) ou avec le mutant HEV-5R/5A (**D**). L'ORF2 est visualisée par des billes d'or de 6nm et indiquée par des flèches noires alors que l'ORF3 est visualisée par des billes d'or de 10nm et indiquée par des pointes de flèches.

La distribution subcellulaire de chacun des mutants a été analysée par microscopie confocale (**Fig.30A et C**). Les cellules PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 ont révélé un marquage ORF2 réticulaire diffus différent de celui des cellules PLC3/HEV (**Fig. 30A**). Les cellules PLC3/HEV-5R/5A montraient un marquage ORF2 compact correspondant à l'accumulation de la protéine dans l'appareil de Golgi (AG) (Hervouet, Ferrié, Ankavay et *al.*, 2021) (**Fig. 30C**).

Les doubles immunomarquages des cellules PLC3/ HEV- $\Delta$ ORF3 ont évoqué la présence de la protéine virale ORF2 au niveau du RE ou de l'AG mais aucun réarrangement membranaire n'a été observé (**Fig. 30B**). Dans les cellules PLC3/HEV-5R/5A, les protéines ORF2 et ORF3 ont été visualisées à proximité de vésicules communes non associées à des réarrangements membranaires (**Fig. 30B**).

L'ensemble de nos résultats d'analyses par la ME est en accord avec nos résultats obtenus en IF suggérant que le HEV, comme d'autres virus à ARN sb (+), est capable d'induire une réorganisation des membranes de sa cellule hôte. Ce processus est dépendant de l'expression de l'ORF3 et de l'assemblage de la protéine ORF2. Il est important de noter qu'aucune structure viro-induite n'a été identifiée dans des cellules PLC3 transfectées avec un réplicon du HEV marqué avec un épitope V5 (voir Partie 3), indiquant que les structures tubulaires et vésiculaires ne sont pas induites par la réplication du génome HEV mais dépendent uniquement des protéines ORF2 et ORF3. Par ailleurs, l'ORF1 exprimée seule est incapable d'induire un tel réarrangement.

## 5. Etude de la nature des structures membranaires induites par le HEV

### 5.1. Etude par IF des co-marquages cellulaires

Afin de mieux caractériser les structures membranaires retrouvées en EM, un nombre important de co-marquages de l'ORF2i avec des marqueurs cellulaires a été réalisé. Des doubles marquages avec l'anticorps P1H1 et des marqueurs de cytosquelette ( $\beta$ -tubuline et MTOC), de la voie de sécrétion (Calnexine et ERGIC-53), des endosomes précoces (EEA1 et Rab5), des endosomes tardifs/MVB (Rab9a, CD81 et CD63), du compartiment de recyclage (Rab11a, CD71, EHD1, MICAL-L1 et PACSINE2), des péroxysomes (PMP70 et Catalase), des mitochondries (TOM-20) et des lysosomes (LAMP1) ont été réalisés (Fig.31). Au moins 30 cellules par type de marquage ont été analysées et les coefficients de Mander ont été calculés (MOC).

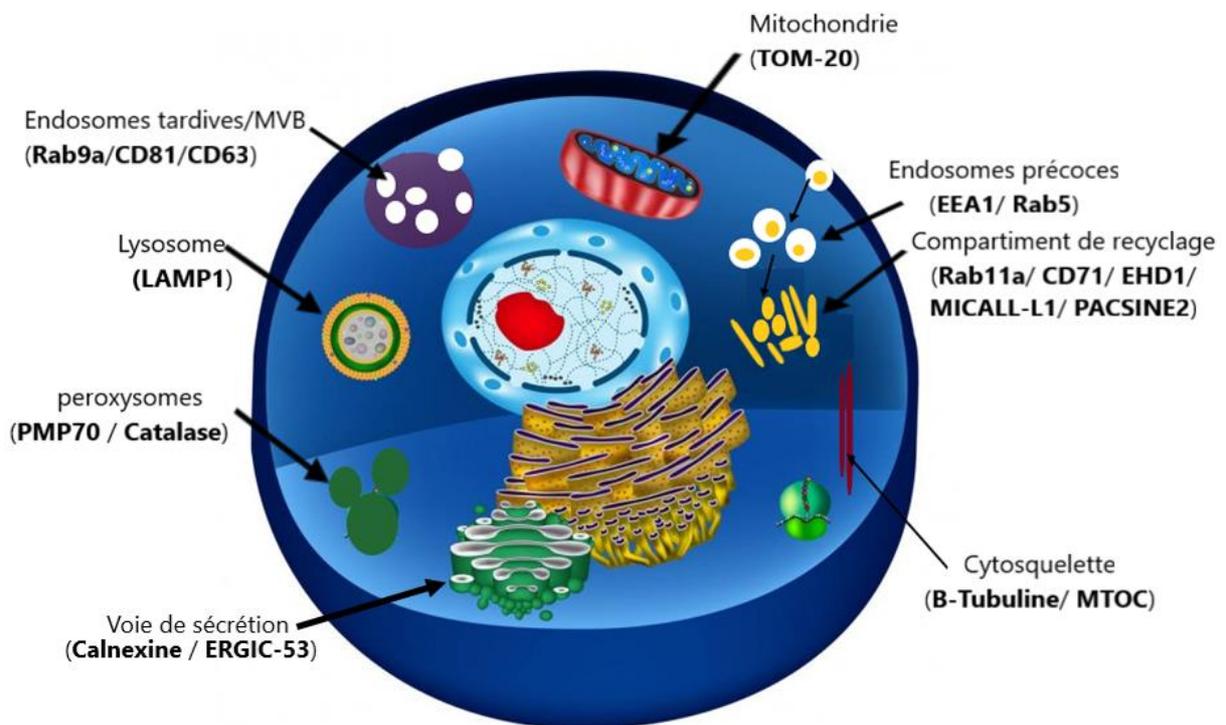
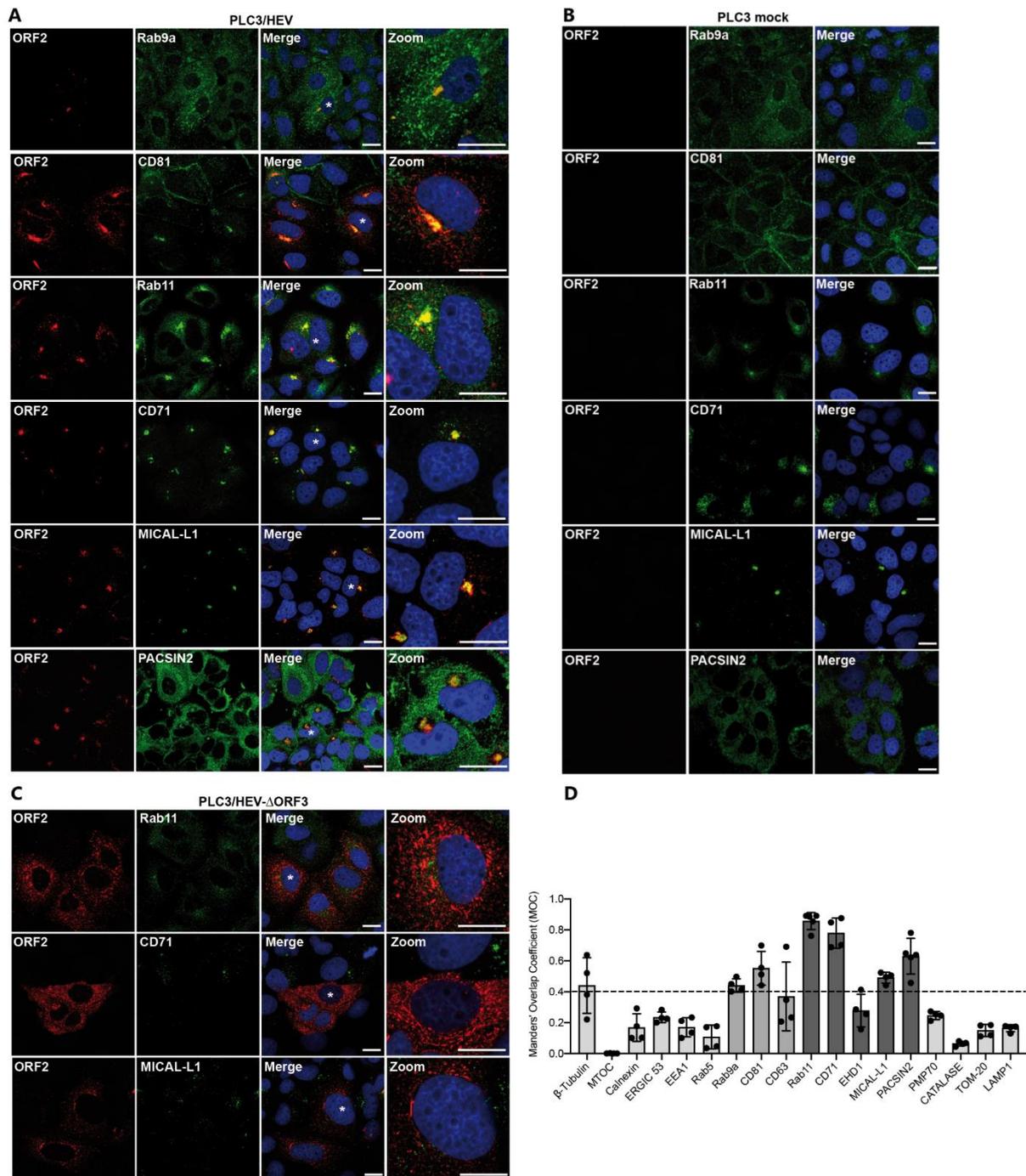


Figure 31 : Représentation des différents marqueurs cellulaires utilisés lors de l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i.



**Figure 32 : Etude de la localisation subcellulaire de la protéine virale ORF2 du HEV par microscopie confocale.** Des cellules PLC3/HEV (A) ont été fixées (PFA, 3%) et perméabilisées avec du méthanol froid et du Triton X-100 à 0,5%. Des co-marquages ont été faits avec les différents marqueurs cellulaires. Les marquages anti-ORF2 ont été réalisés avec le P1H1 au 1/800e. Parallèlement, des cellules PLC3 non électroporées (B) et des cellules PLC3/HEV-ΔORF3 (C) ont été utilisées comme contrôles. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale. D- Coefficients de chevauchement de Manders de l'ORF2i avec les différents marqueurs cellulaires : les MOC faibles sont en gris clair, ceux montrant un MOC moyen sont en gris moyen et les marqueurs présentant des MOC supérieurs à 0,4 sont représentés en gris foncé.

Les résultats obtenus ont montré une colocalisation de l'ORF2i avec différents marqueurs des endosomes tardifs et du compartiment endosomal de recyclage (ERC).

Le Rab11 représente la protéine centrale de recyclage du compartiment de recyclage vers la membrane plasmique. D'ailleurs, l'inhibition de son expression entraîne une altération du recyclage ou une délocalisation de l'ERC (Klumpermant & Raposo, 2014). Un MOC de 0,86 a été déterminé entre l'ORF2i et le Rab11 montrant une forte colocalisation de ces deux protéines. De même, un MOC égal à 0,78 a été illustré entre l'ORF2i et le récepteur à la transferrine qui représente le cargo modèle de l'ERC (**Fig. 32B**).

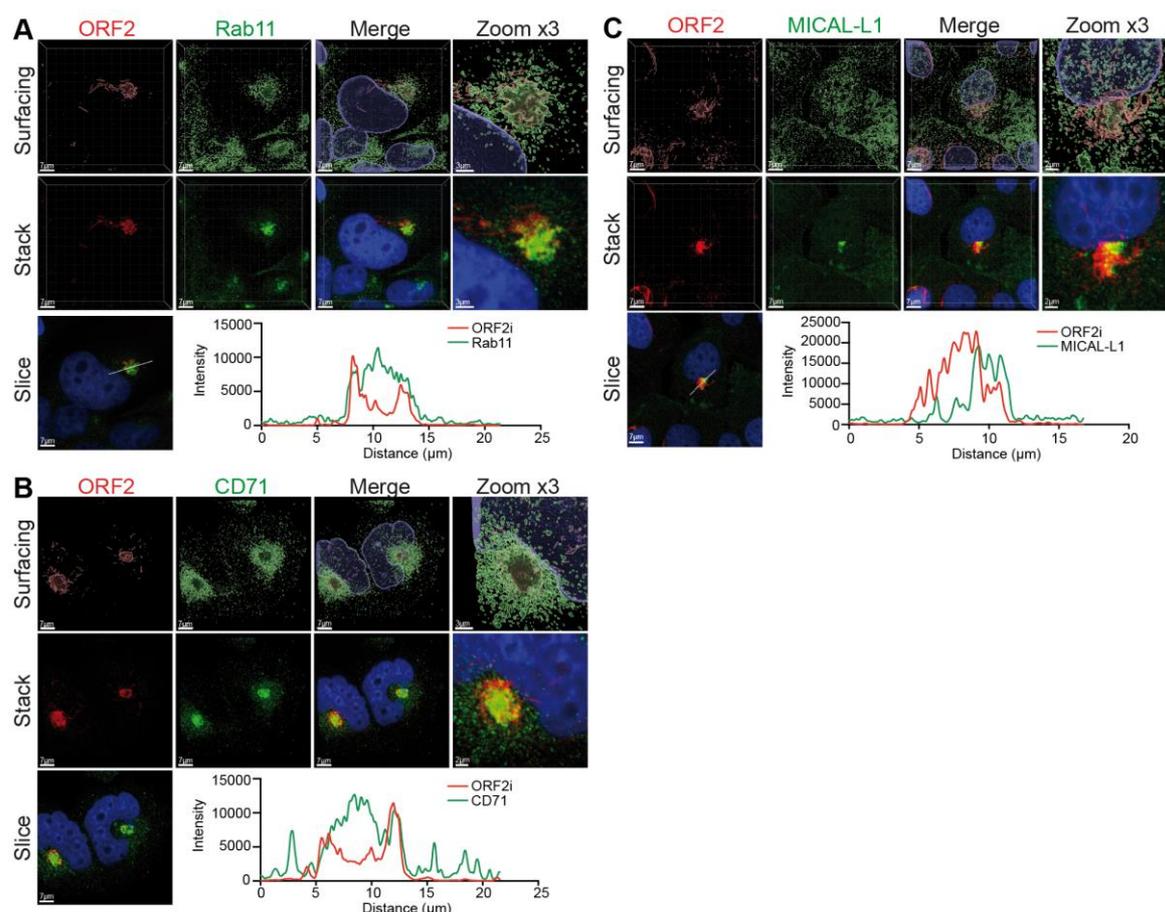
Le processus de recyclage efficace par l'ERC repose sur la formation d'un réseau complexe d'endosomes allongés appelés endosomes tubulaires de recyclage (TRE). Une famille de protéines connues sous le nom de protéine d'homologie au domaine C-terminal d'Eps15 (EHD1-4) ainsi que des partenaires d'interaction EHD tels que MICAL-L1 et PACSINE2, sont impliqués dans la biogenèse des TRE et le maintien de l'ERC. Les MOC de l'ORF2i avec EHD1, MICAL-L1 et PACSIN2 étaient respectivement de l'ordre de 0,28 , 0,49 et 0,63. Nos données suggèrent que le HEV détourne probablement des effecteurs de la machinerie de recyclage cellulaire à des différents degrés. Même si aucune colocalisation n'a été observée avec les marqueurs de cytosquelette (**Fig.32**), le centre organisateur des microtubules (MTOC) a été retrouvé à proximité de regroupement de l'ORF2i en zone périnucléaire (**Fig. 32D**). Il a été montré que le cytosquelette et l'ERC constituent deux entités structurales distinctes étroitement liées au cours du processus de recyclage (Klumpermant & Raposo, 2014).

Une colocalisation intermédiaire de la protéine ORF2i avec les marqueurs Rab9a (MOC= 0,44), CD81 (MOC= 0,55) et CD63 (MOC= 0,37) a également été retrouvée. Rab9a, une petite GTPase, est une protéine effectrice favorisant les échanges entre les endosomes tardifs et le réseau Trans-Golgi (Lombardi et *al.*, 1993 ; Hutagalung & Novick., 2011), tandis que CD81 et CD63 sont des tétraspanines présentes dans les MVB faisant partie du compartiment des endosomes tardifs.

Aucune colocalisation de l'ORF2i avec les différents marqueurs cellulaires n'a été rapportée en analysant les cellules PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3, témoignant ainsi de l'importance de l'ORF3 dans la formation des pépites ORF2. Ceci est en accord avec l'ensemble de nos données de EM et prouve que l'ORF3 joue un rôle crucial dans la biogénèse des usines virales. Une distribution subcellulaire des différents marqueurs cellulaires similaire à celle des PLC3/HEV et PLC3/ HEV- $\Delta$ ORF3, a été observée lors de l'analyse des cellules PLC3 non électroporées (**Fig.32**).

## 5.2 Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution de marqueurs de l'ERC

Une analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec le P1H1 et les anticorps dirigés contre les marqueurs cellulaires de l'ERC (Rab11, MICAL-L1 et CD71) a permis de confirmer les résultats d'IF et montre un recouvrement des intensités de fluorescence de l'ORF2i avec les marqueurs de l'ERC (**Fig.33**).



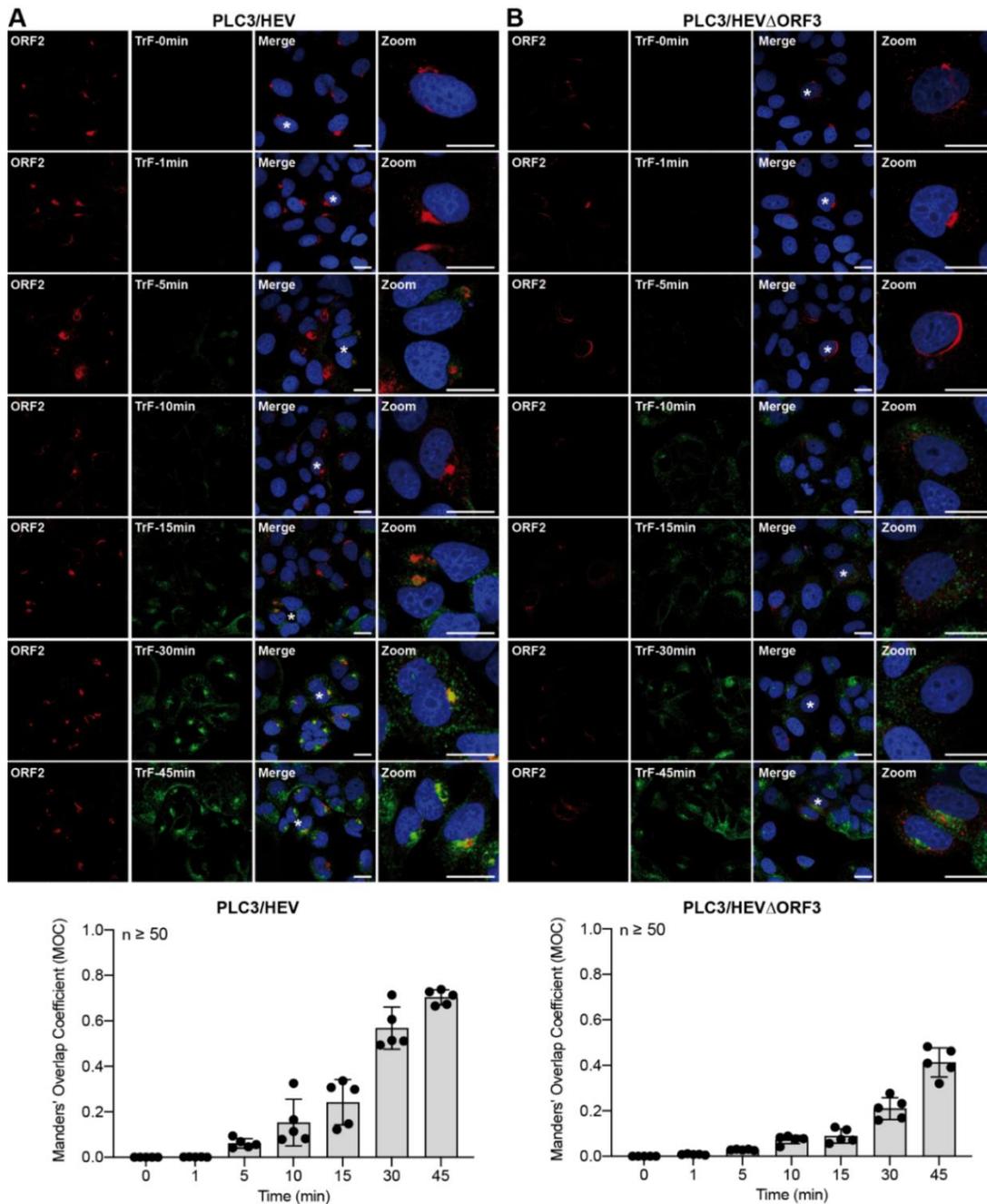
**Figure 33 : Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec l'anticorps dirigé contre Rab11 (A), CD71 (B) ou MICAL-L1 (C).**

En haut (Surfacing) est montré le rendu volumique des z-stacks en utilisant le logiciel Imaris afin de mieux visualiser les sous-structures colorées. Au milieu (Stack), les z-stacks sont montrés. En bas (Slice), les graphes montrent les intensités de fluorescence des marquages ORF2i et Rab11/CD71/MICAL-L1 mesurées tous les 50 nm dans la région d'intérêt mise en évidence par la ligne blanche dans l'image montrée à gauche. Les barres d'échelle indiquent la longueur indiquée sur chaque image. Rouge = ORF2 ; vert = marqueur cellulaire ; bleu = DAPI.

## 5.3 Etude de la cinétique

Afin de conforter nos observations, une cinétique utilisant à la fois l'anticorps P1H1 et de la transferrine couplée à un fluorochrome a été réalisée à différents temps sur des cellules PLC3/HEV et PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3. En effet, il a été démontré auparavant que la transferrine (TrF) se lie à son récepteur spécifique (CD71) au niveau de la membrane plasmique (**Fig.34**). Une fois internalisé par endocytose dépendante de la clathrine, le complexe TrF-CD71 présent dans les endosomes précoces est soit recyclé

directement à la surface cellulaire ou bien emprunte une voie de recyclage plus lente passant par l'ERC (Grant & Donaldson, 2009). Nos analyses ont montré que dans les cellules PLC3/HEV, la colocalisation entre l'ORF2i et la transferrine marquée augmentait au cours du temps pour atteindre un MOC de 0,7 après 45min, indiquant que l'ERC exploité par l'ORF2i est fonctionnel (**Fig.34A**). Dans les cellules PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 (**Fig.34B**) le MOC de l'ORF2i avec la transferrine était beaucoup plus faible, montrant de nouveau l'importance de l'ORF3 dans le processus de détournement de l'ERC par le HEV.



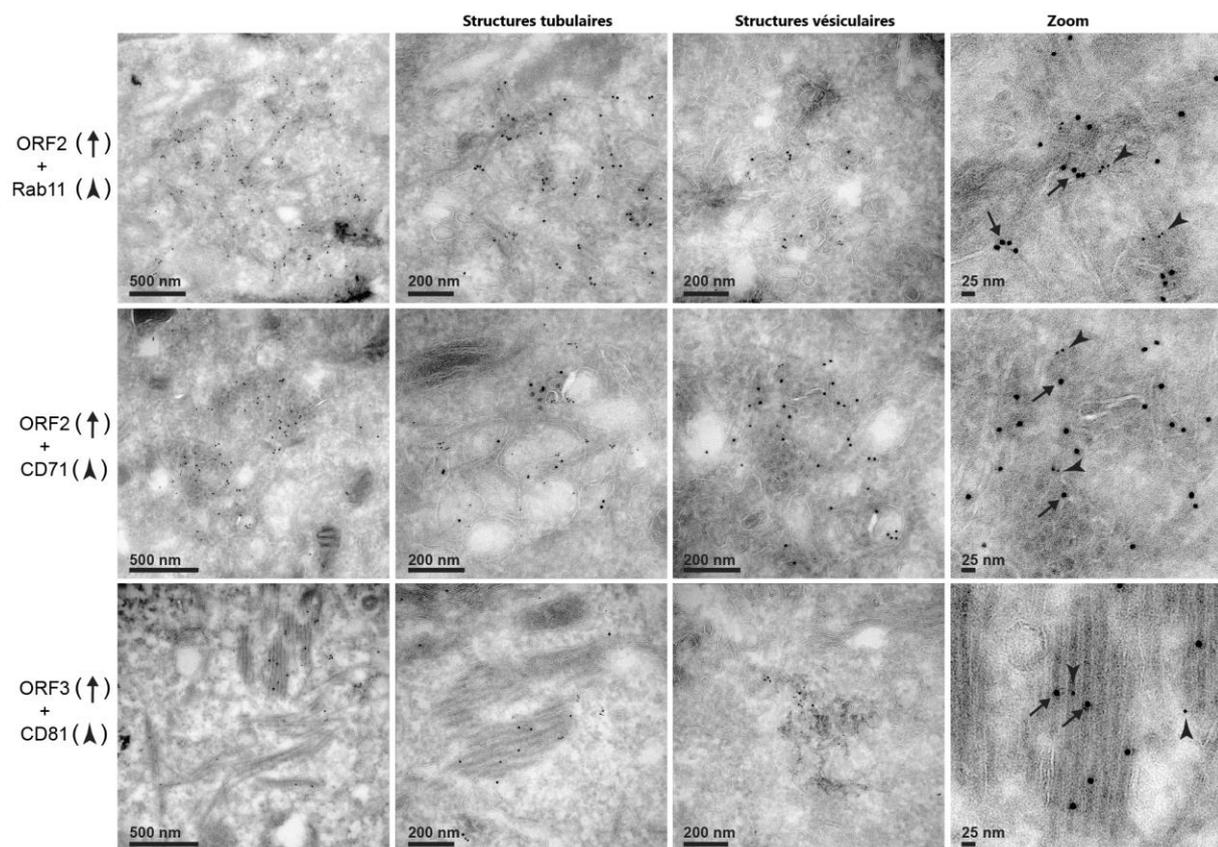
**Figure 34 : C i n é t i q u e d ' i n t e r n a l i s a t i o n d e l a t r a n s f e r r i n e .** Des cellules PLC3/HEV et PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 ont été incubées en présence de transferrine couplée à un fluorochrome puis fixées à différents temps (0, 1, 5, 10, 15, 30 et 45min). Des IF ont été réalisées en utilisant

l'anticorps P1H1. Les calculs de MOC de la protéine ORF2i avec la transferrine ont été réalisés en utilisant le plugin JACoP du logiciel FIJI.

#### 5.4 Analyse de la distribution des facteurs cellulaires dans les usines virales

Afin de valider l'ensemble de nos résultats d'IF montrant une colocalisation de la protéine ORF2 avec les marqueurs de l'ERC et afin de mieux caractériser la nature des usines virales induites par le HEV, différents co-immunomarquages avec des marqueurs cellulaires ont été réalisés et analysés par EM (**Fig.35**).

Les cellules PLC3/HEV ont été co-marquées avec l'anticorps anti-ORF2 1E6 et un anticorps anti-Rab11 puis respectivement avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à des billes d'or de 10 nm de diamètre et avec un anticorps anti-lapin couplé à des billes d'or de 6 nm. L'analyse comparative des co-immunomarquages a révélé une codistribution des deux protéines dans les usines virales induites par le HEV. Ces résultats confirment les données obtenues en IF (**Fig.32**) et suggèrent la présence de la protéine de capsid de HEV dans des structures contenant Rab11 (**Fig.35**).



**Figure 35 : Co-immunomarquage des protéines virales ORF2 et ORF3 avec les marqueurs cellulaires Rab11, CD71 et CD81.**

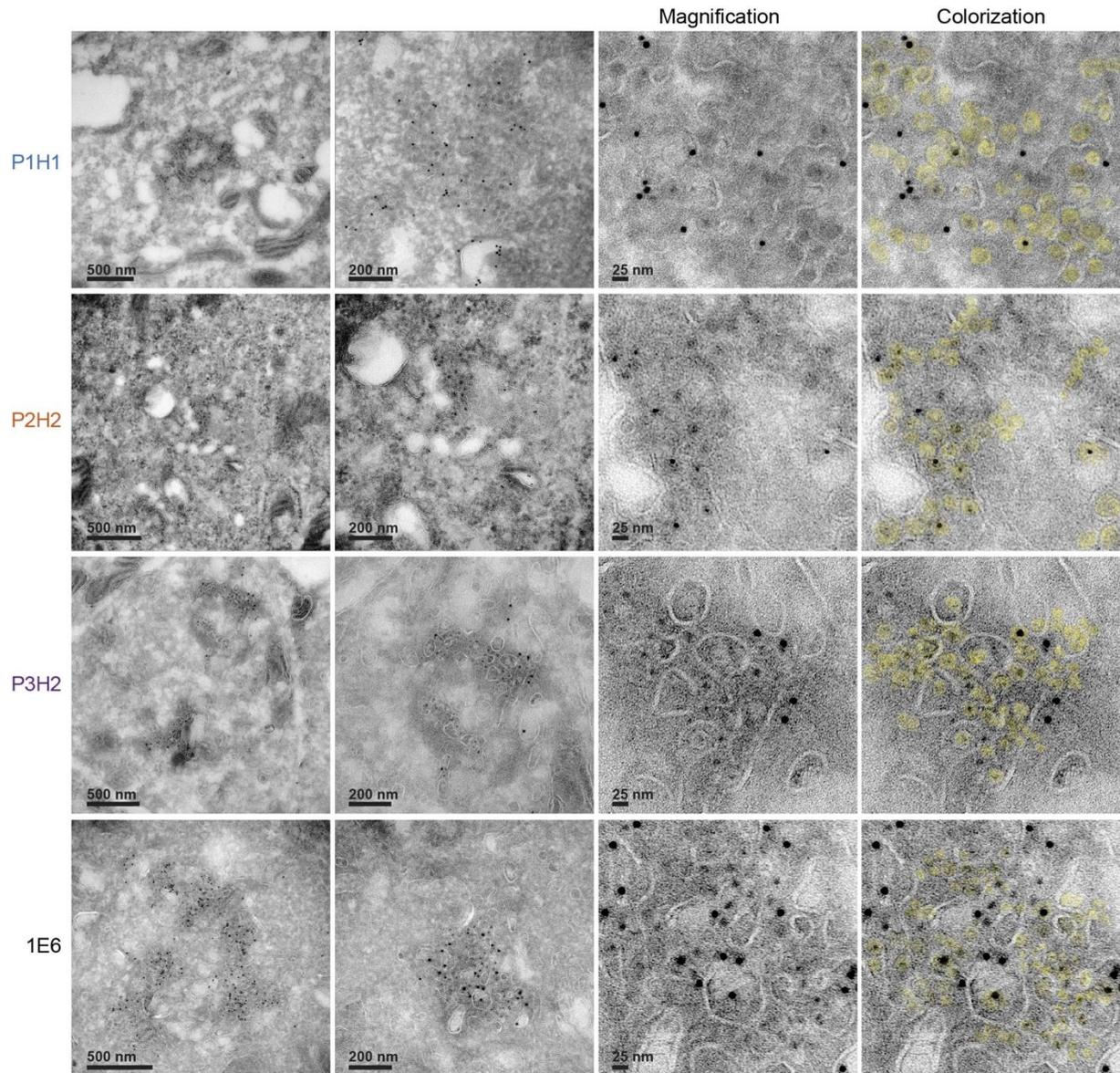
Des doubles immunomarquages avec à la fois des anticorps anti-ORF2 ou anti-ORF3 (visualisés par des billes d'or de 10nm) et des anticorps anti-Rab11, anti-CD71 ou anti-CD81 (visualisés par des particules d'or de 6nm) ont été réalisés sur des cryosections de cellules PLC3/HEV. Ces cryosections ont été ensuite analysées par EM. Les protéines virales sont indiquées par des flèches noires et les marqueurs cellulaires par des pointes de flèches.

Des co-immunomarquages de l'ORF2 et CD71 ont été réalisés de la même manière. L'analyse comparative des co-immunomarquages a montré la présence de l'ORF2 à la fois dans des structures vésiculaires et tubulaires contenant le récepteur de la transferrine (CD71) (**Fig.35**).

Parallèlement, des co-immunomarquages avec l'anticorps anti-ORF3 et un anticorps anti-CD81 ont été réalisés (**Fig.35**). La révélation simultanée des deux protéines a été réalisée grâce à un anticorps anti-souris couplé à des billes d'or de 6 nm de diamètre et avec un anticorps anti-lapin couplé à des billes d'or de 10 nm. La détection de la tétraspanine CD81 confirme la nature membranaire des usines virales induites par le HEV.

#### **6. Visualisation des particules du HEV dans les cellules PLC3/HEV par la microscopie électronique**

Précédemment, notre équipe a visualisé en EM, les particules HEV issues de cultures *in vitro*, de sang et de selles de patients infectés, ceci dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme IBSA de l'Université de Tours. Ceci a été rendu possible grâce à une technique d'immunocapture du virus qui a également permis en 2016, la première visualisation du virus de l'hépatite C. Dans le cadre de notre projet, nos observations ont permis de visualiser pour la première fois les particules de HEV dans des cellules PLC3/HEV (**Fig.36**). Les particules virales présentent une structure particulière, formant des amas de structures membranaires ayant un diamètre de 25 à 50nm et un noyau interne dense. Un nombre très important de ces structures a été marqué avec les différents anticorps anti-ORF2. Cette visualisation représente une avancée qui devrait permettre d'étudier plus en détails l'ultrastructure du HEV.

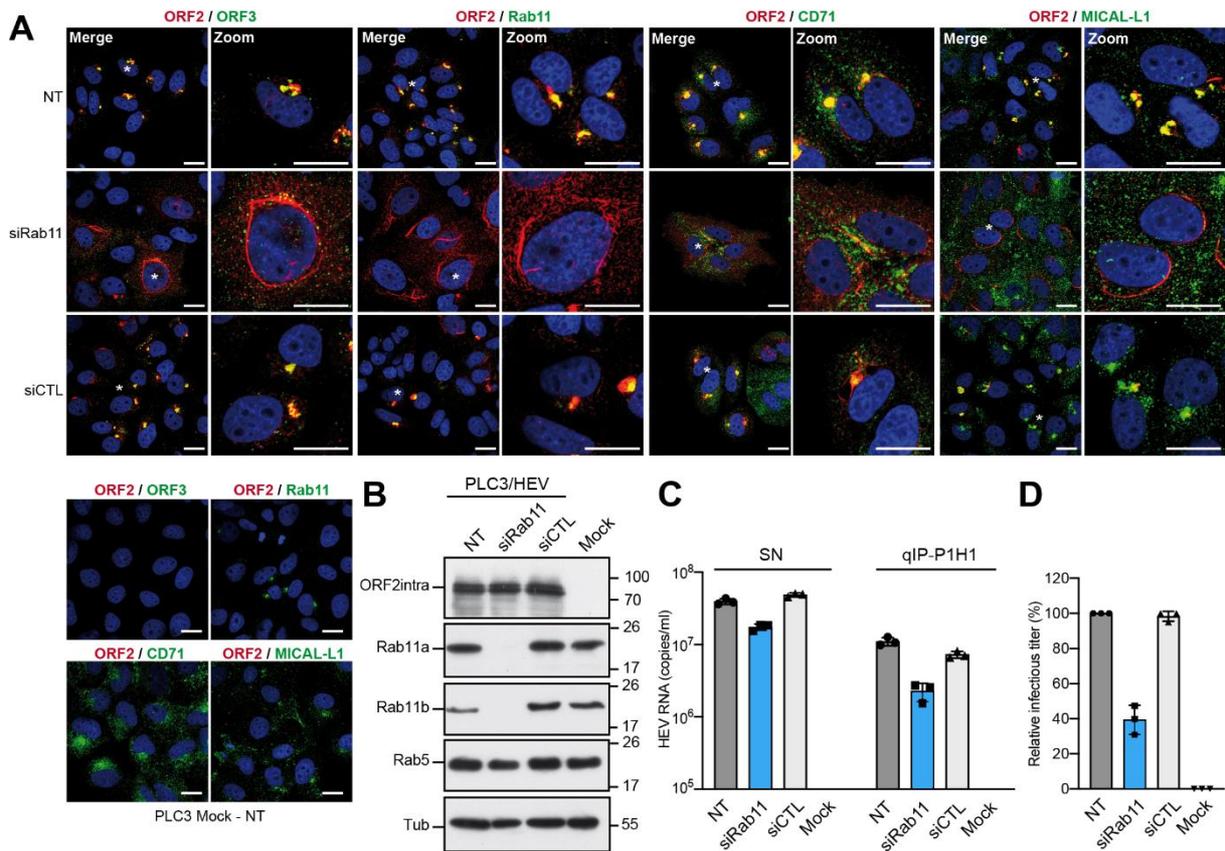


**Figure 36 : Visualisation des particules du HEV dans les cellules PLC3/HEV.**

Des cryosections de cellules PLC3/HEV ont été marquées avec les différents anticorps anti-ORF2 indiqués puis analysées par EM. Des cellules non électroporées ont servi de contrôles (données non montrées). Dans la colonne de droite, les particules sont mises en évidence par colorisation en jaune.

## 7. Etude de l'implication cyclotriale de l'ORF2 sur la Pase Rab11 technique de l'interférence par l'ARN

Pour confirmer que l'ERC joue un rôle central dans le cycle viral du HEV, des études fonctionnelles ont été également menées. Les cellules PLC3/HEV ont été transfectées trois jours post-électroporation avec des siRNA ciblant des isoformes Rab11a et Rab11b (siRab11) ou avec des siRNA sans cible spécifique (siCTL). Des cellules PLC3/HEV (NT) et des cellules PLC3 mock non transfectées (PLC3 Mock-NT) par les siRNA ont été également utilisées comme des contrôles.



**Figure 37: Etude de l'effet de la silencing du gène Rab11 sur l'expression d'ORF2 et la sécrétion de particules virales.**

Trois jours post-électroporation, des cellules PLC3/HEV ont été transfectées avec des siRNA ciblant le gène codant pour le Rab11a et le Rab11b (siRab11) ou avec un contrôle siRNA ne ciblant aucun gène. Des cellules PLC3/HEV non transfectées et des cellules Mock ont été utilisées comme contrôle. A 72h post-transfection, les cellules ont été analysées en IF (**A**) et en WB (**B**) en utilisant les anticorps indiqués. Les marquages ont été analysés par microscopie confocale. La barre d'échelle est de 20µm. L'ORF2 a été marquée avec le P1H1 (rouge). L'ORF3 ou les marqueurs cellulaires sont en vert. (**C**) Quantification de l'ARN viral dans les surnageants des cellules transfectées par RT-qPCR (SN) ou par qIP avec le P1H1 (qIP-P1H1). (**D**) Quantification des titres infectieux dans le SN des cellules transfectées par les siRNA. Les résultats sont présentés sous forme de titre infectieux relatif (en %) par rapport au titre infectieux présents dans les cellules non transfectées par les siRNA.

L'effet du silencing du gène Rab11 sur l'expression d'ORF2 a été analysé en IF (**Fig.37A**) et en WB (**Fig.37B**). Des quantifications de l'ARN viral dans les surnageants des cellules transfectées par RT-qPCR et dans les échantillons issus des IP-P1H1 ont été également réalisées (**Fig.37C**). De même, les titres

infectieux ont été déterminés (**Fig.37D**) afin d'évaluer l'importance de Rab11, donc de l'ERC, au cours du cycle infectieux du HEV.

Bien que le niveau d'expression intracellulaire de la protéine ORF2 n'a pas été affecté par le silencing de Rab11 (**Fig.37B**), les résultats d'IF ont montré la présence de structures filamenteuses enrichies en ORF2 principalement localisées autour du noyau, alors que comme observé précédemment les cellules PLC3/HEV non transfectées montraient la présence d'ORF2i sous forme d'une pépite périnucléaire associée à une déformation nucléaire (**Fig.37A**). Les doubles marquages de l'ORF2 avec l'ORF3 n'ont pas montré de colocalisation dans les cellules transfectées avec les siRab11. De même, aucune colocalisation n'a été observée avec les marqueurs de l'ERC (CD71 et MICAL-L1). Ces observations indiquent que la perturbation de l'ERC, suite à l'inhibition de l'expression du Rab11, induit un changement drastique de la localisation subcellulaire de l'ORF2i. De plus, les niveaux d'ARN extracellulaires (**Fig.37C**) et les titres infectieux (**Fig.37D**) étaient réduits dans les cellules PLC3/HEV transfectées par les siRab11 par rapport aux cellules témoins (NT et siCTL).

Ainsi, ces études fonctionnelles confirment l'importance et le détournement de l'ERC lors de cycle viral de HEV.

#### IV. Conclusion

Lors de ce projet, nous avons généré et caractérisé quatre anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid ORF2 du HEV: les anticorps P1H1, P2H1 et P2H2 reconnaissent l'ORF2i qui est associée aux particules virales et l'anticorps P3H2 reconnaissant les différentes formes de l'ORF2. La caractérisation de ces différents anticorps a montré que les anticorps P1H1, P2H1 et P2H2 reconnaissent spécifiquement la forme infectieuse de l'ORF2 sans aucune réaction croisée avec les deux autres formes d'ORF2 glycosylées. De plus, nous avons pu démontrer que l'anticorps P1H1 reconnaît les particules HEV délipidées. Par conséquent, cet anticorps pourrait être utilisé à des fins diagnostiques. En outre, les anticorps que nous avons générés dans cette étude représentent des outils uniques permettant de décrypter les mécanismes de biogenèse des différentes isoformes de l'ORF2 et ainsi de mieux comprendre leurs fonctions précises dans le cycle viral du HEV. Sur base de l'ensemble des résultats obtenus, la caractérisation de nos différents anticorps monoclonaux générés a montré leur fonctionnalité dans différentes approches expérimentales comme le WB, l'IP, l'IF et l'EM.

Des analyses ultrastructurales par EM de cryosections de cellules PLC3/HEV, en accord avec des analyses en microscopie confocale, ont montré la présence de structures enrichies en ORF2/ORF3 sous forme d'un réseau de structures vésiculaires et tubulaires retrouvé en zone périnucléaire et induisant une déformation du noyau de la cellule infectée. Les structures vésiculaires possédaient des tailles très variables allant de 50 jusqu'à 250nm de diamètre alors que les structures tubulaires formaient des réseaux parallèles réguliers et présentaient un diamètre constant allant de 20 à 25nm, semblable à celui des particules HEV intracellulaires. Ceci suggère que les structures tubulaires pourraient correspondre à des précurseurs de virions néoformés. Le réseau de structures vésiculaires et tubulaires a été retrouvé à la fois dans des cellules PLC3/HEV mais aussi dans des cellules Huh-7.5/HEV, indiquant qu'indépendamment de la lignée cellulaire, le HEV est capable d'induire principalement deux types de remaniements membranaires : des structures en forme de vésicules et des structures en forme de tubes. Dans l'ensemble des cryocoupes analysées, un réseau membranaire très étendu a été retrouvé contenant les deux types de structures enrichies en protéines virales.

Fait intéressant, en l'absence d'assemblage de la protéine ORF2i ou en l'absence d'expression de l'ORF3, aucune forme de type pépite périnucléaire n'a été observée en microscopie confocale, ni de structures vésiculaires et tubulaires en EM. Bien que la protéine ORF3 ne soit pas impliquée dans l'assemblage des virions, elle joue un rôle essentiel dans l'acquisition de la quasi-enveloppe autour des particules virales néosynthétisées ainsi que dans leur sécrétion par la voie exosomale. En se basant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse que les structures observées en EM représentent

probablement des usines virales dans lesquelles des particules virales néosynthétisées assemblées acquièrent leur enveloppe suite à une interaction entre la protéine ORF2 et la protéine ORF3.

Grace à la spécificité de nos anticorps générés, notamment le P1H1, nous avons réalisé une étude approfondie de la colocalisation de la protéine ORF2i avec différents marqueurs cellulaires. C'est ainsi que nous avons identifié une forte colocalisation de l'ORF2i avec plusieurs marqueurs de l'ERC. Cette colocalisation a été abrogée lors du silencing de Rab11. Les études fonctionnelles réalisées dans ce projet ont ainsi montré qu'une infection par le HEV s'accompagne d'un détournement de l'ERC. Ce détournement se traduit par une codistribution des protéines virales avec les marqueurs de ce compartiment dans des structures périnucléaires, retrouvées lors des analyses ultrastructurales, sous forme d'un réseau très développé de structures vésiculaires et tubulaires. A ce jour, ce type de structures n'a jamais été décrit et pourrait être caractéristique d'une infection par le HEV.

C'est ainsi que tous ces outils nous ont permis et pour la première fois, d'identifier un site cellulaire, enrichi en membranes cellulaires et en protéines virales ORF2 et ORF3, probablement impliqué dans l'acquisition de l'enveloppe présente autour des particules virales HEV néosynthétisées.

## V. Discussion

Ce projet portant sur la caractérisation des usines virales induites par le HEV a été réalisé grâce à des anticorps monoclonaux reconnaissant notamment la forme ORF2i associée aux particules virales et à l'utilisation de cellules productrices de HEV. Ce projet a apporté de nombreuses connaissances notamment sur les interactions du HEV avec sa cellule hôte.

### Génération et caractérisation des anticorps anti-ORF2 monoclonaux :

Un système de culture cellulaire efficace du HEV a été mis en place dans notre laboratoire en combinant la souche infectieuse p6 de génotype 3 (Shukla et *al.*, 2012) avec des cellules PLC3 qui sont un sous-clone des cellules PLC/PRF/5 et répliquent efficacement le HEV (Montpellier et *al.*, 2018). C'est ainsi que nous avons identifié différentes formes de l'ORF2 remplissant des fonctions distinctes lors du cycle viral du HEV. Nous avons identifié et caractérisé la séquence en acides aminés, les modifications post-traductionnelles et la localisation subcellulaire des différentes formes de l'ORF2. La forme ORF2i ou forme infectieuse, est la forme associée au génome viral, elle est non glycosylée. La forme ORF2g ou forme glycosylée et la forme ORF2c ou forme clivée sont deux formes glycosylées qui sont produites massivement dans le surnageant de culture cellulaire et ne sont pas associées à des particules infectieuses. Cependant, elles représentent les antigènes viraux majeurs présents dans le sérum des patients infectés par le HEV (Montpellier et *al.*, 2018) et pourraient servir de leurres immunologiques qui inhibent la neutralisation par les anticorps (Yin et *al.*, 2018). Il a également été démontré qu'une fraction de l'ORF2i subit 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 (Ankavay et *al.*, 2019 ; Lenggenhager et *al.*, 2017).

La séquence primaire de l'ORF2 est constituée de 660 acides aminés et possède un peptide signal de 23 acides aminés à son extrémité N-terminale. Il a été montré que la forme ORF2i et la forme ORF2intra, qui est la forme intracellulaire de l'ORF2i, possèdent la même séquence en aa. Leur extrémité N-terminale correspond à la Leu14, située au milieu du peptide signal de l'ORF2, et leur extrémité C-terminale à la Ser660 (Montpellier et *al.*, 2018). L'extrémité N-terminale de l'ORF2g et de l'ORF2c correspond à la Ser34 et la Ser102, respectivement, et leur extrémité C-terminale à la Ser660. Bien qu'il ait été démontré que l'ORF2i pourrait être produite à partir d'un codon d'initiation supplémentaire (Yin et *al.*, 2018), notre équipe a très récemment démontré que la présence d'un motif riche en arginine (ARM) situé au niveau de la région N-terminale de l'ORF2 régule la production des différentes isoformes de l'ORF2. En effet, ce motif régule la topologie ainsi que la fonctionnalité du peptide signal de la protéine ORF2, soit en conduisant à la production de l'ORF2i infectieuse

cytosolique ou soit à la production des formes ORF2g/c glycosylées non infectieuses réticulaires. L'ARM sert de signal de localisation nucléaire et contrôle la translocation nucléaire de l'ORF2i conduisant à une modulation de la réponse antivirale de l'hôte. L'ARM favorise également l'association membranaire de l'ORF2i qui est probablement essentielle à l'assemblage des particules virales néosynthétisées. Enfin, l'ARM sert de site de clivage de la protéine ORF2g sécrétée qui est clivée par la proprotéine convertase furine (Hervouet, Ferrié et Ankavay, 2021). L'ARM est donc un régulateur central du cycle infectieux du HEV.

En se basant sur ces particularités, nous avons généré quatre anticorps monoclonaux permettant de différencier les différentes formes d'ORF2. Trois anticorps (P1H1, P2H1 et P2H2) sont dirigés contre la forme ORF2i et un anticorps (P3H2) reconnaît les différentes formes de l'ORF2. Des analyses réalisées sur des lysats de cellules infectées par le HEV ont montré la capacité des différents anticorps générés à détecter l'ORF2 intracellulaire. De même, des analyses effectuées sur des surnageants de cellules infectées, contenant non seulement de l'ORF2i mais aussi de grandes quantités d'ORF2g et c, ont démontré que les anticorps P1H1, P2H1 et P2H2 reconnaissent spécifiquement la protéine ORF2i sans réaction croisée avec les autres formes d'ORF2. Fait intéressant, l'ensemble de nos résultats a montré que l'anticorps P1H1 a la propriété unique d'immunocapturer les particules HEV, après délipidation. En effet, le HEV produit en culture cellulaire ou dans le sérum des patients infectés, a la particularité d'être entouré d'une couche lipidique qui masque la capsid virale. Cet anticorps pourrait être d'un grand intérêt à des fins diagnostiques. De manière plus globale, les anticorps que nous avons générés dans cette étude représentent des outils uniques permettant de décrypter les mécanismes de biogenèse et la fonction précise des différentes isoformes de l'ORF2 dans le cycle viral du HEV.

La structure du domaine N-terminal de l'ORF2 n'a pas encore été bien définie. Néanmoins, sur base d'interactions potentielles avec l'ARN, l'hypothèse que ce domaine serait orienté vers la cavité interne des particules virales a été émise. Bien que nous ne puissions pas exclure le fait que le P1H1 pourrait reconnaître des protéines ORF2i partiellement assemblées, le fait que celui-ci reconnaisse les particules HEV délipidées, nous a poussé à émettre l'hypothèse que l'extrémité N-terminale de la protéine ORF2i pourrait être exposée à la surface virale. En effet, en accord avec cette observation, nous avons montré que l'ARM situé dans la région N-terminale de l'ORF2 favorise l'association membranaire (Hervouet, Ferrié et Ankavay, 2021). Cet ARM est probablement un signal essentiel pour l'assemblage des particules infectieuses. Par conséquent, l'extrémité N-terminale de l'ORF2 pourrait être associée aux lipides qui entourent les particules HEV enveloppées et l'élimination de ces lipides par un traitement avec du détergent démasquerait les épitopes N-terminaux de l'ORF2, y compris l'épitope P1H1. Cet épitope serait donc exposé à la surface de la particule virale.

### Etude de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV en système infectieux :

L'étude par IF de l'expression et de la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV a montré que les anti-ORF2, et plus spécifiquement les anticorps anti-ORF2i notamment le P1H1, reconnaissent au sein des cellules PLC3/HEV des structures périnucléaires enrichies en ORF2 qui se retrouvent à proximité de la protéine ORF3. Des analyses quantitatives et de microscopie à haute résolution ont montré que l'ORF2i et l'ORF3 sont étroitement co-distribuées dans des structures de type pépite périnucléaire. De manière intéressante, en l'absence d'expression de l'ORF3 ou en l'absence d'assemblage de l'ORF2, nous avons observé une redistribution de ces deux protéines dans le cytosol, suggérant que ces deux protéines sont intimement liées et entrent potentiellement en interaction durant le cycle infectieux du HEV.

### Caractérisation des usines virales induites par le HEV :

Des analyses ultrastructurales par EM de cryocoupes provenant des cellules PLC3/HEV ont montré pour la première fois que le HEV, comme la plupart des virus à ARN sb (+), est capable d'induire des remaniements membranaires au sein de la cellule hôte. Il s'agit d'un réseau de structures tubulaires et vésiculaires enrichies en protéines virales. Le diamètre des structures tubulaires viro-induites a été estimé à 20-25 nm. Ces tubes forment des structures géométriques hautement organisées alors que les structures vésiculaires sont plus larges et présentent une grande hétérogénéité de diamètre. En effet, le diamètre des structures vésiculaires a été estimé à 50-250nm. Dans la majorité des cellules observées, un réseau de structures à la fois tubulaires et vésiculaires très développé a été retrouvé. Fait intéressant, la taille des structures tubulaires correspond à celui des particules HEV intracellulaires qui ont été observées dans différentes cryocoupes. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que les structures tubulaires pourraient correspondre à des précurseurs de virions. Il serait donc important d'étudier la cinétique des structures viro-induites par le HEV.

### Validation des résultats dans un autre système de culture cellulaire :

De manière importante, les structures vésiculaires et tubulaires ont été observées à la fois dans les cellules PLC3/HEV mais aussi dans des Huh7.5/HEV, indiquant que ces structures induites par le HEV ne dépendent pas d'un type cellulaire spécifique. Bien que difficile à mettre en place, il serait maintenant intéressant de déterminer si le HEV est capable d'induire des réarrangements membranaires dans d'autres modèles infectieux tels que des cellules répliquant le HEV de génotype 1 ou des cellules primaires infectées par le HEV. De même, il serait intéressant d'envisager des analyses

par la microscopie corrélative, qui allie les approches en microscopie confocale et électronique en combinant les images issues d'un même échantillon permettant ainsi de corréler des informations structurales et d'identification sur une même zone d'observation (Van Rijnsoever et *al.*, 2008). Une autre technique connue sous le nom de la tomographie électronique pourrait être également appliquée. Fait intéressant, le principal avantage de cette technique étant qu'elle permet d'étudier les caractéristiques volumiques des structures observées. Les informations acquises suite à l'analyse par cette technique permettent de caractériser la fonctionnalité et l'organisation générale des différentes structures viro-induites. Cette technique a été appliquée dans le cas de nombreux virus à ARN sb (+) tels que le virus DENV (Welsch et *al.*, 2009), le PV (Belov et *al.*, 2012), le RUBV (Fontana et *al.*, 2010) et le HCV (Lee et *al.*, 2019).

#### Etude de la fonction des usines virales induites par le HEV :

L'ensemble de nos résultats a montré qu'en l'absence de l'assemblage de l'ORF2 ou d'expression de l'ORF3, aucune structure en forme de pépite périnucléaire n'a été observée en microscopie confocale ainsi qu'aucune structure vésiculaire et tubulaire n'a été dévoilée en EM. Bien que la protéine ORF3 ne soit pas impliquée dans l'assemblage des virions, elle joue un rôle primordial dans la libération des virions via la voie de sécrétion des exosomes ainsi que dans l'acquisition de la quasi-enveloppe présente autour des particules virales néosynthétisées (Glitscher & Hildt, 2021). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les structures observées en EM pourraient correspondre à des usines virales dans lesquelles les particules assemblées acquièrent leur membrane suite à une interaction entre ORF2 et ORF3.

Nous avons montré une colocalisation de l'ORF2i avec des structures membranaires enrichies en CD81. Ces observations sont en accord avec les données bibliographiques montrant que CD81 est présente sur la quasi-enveloppe du HEV (Nagashima et *al.*, 2017), et indiquent que les structures particulières identifiées en EM dérivent des membranes cellulaires et correspondraient à des usines virales du HEV.

Actuellement, il existe très peu de données précises sur la localisation subcellulaire des protéines virales du HEV et sur les facteurs de l'hôte impliqués dans les différentes étapes du cycle viral du HEV. Les données bibliographiques concernant la localisation subcellulaire de l'ORF1 sont détaillées dans la **Partie 2** de mon projet de thèse. La localisation de la protéine de capsid de HEV a été largement étudiée dans le cadre de systèmes d'expression hétérologue et elle a été retrouvée associée à de nombreux compartiments cellulaires y compris le cytoplasme et le RE (Surjit et *al.*, 2007 ; Zaffrullah et *al.*, 1997).

La caractérisation de la distribution subcellulaire des différentes formes d'ORF2 produites au cours du cycle infectieux a montré l'association des formes glycosylées à la voie de sécrétion. La protéine ORF2i

à son tour a été principalement retrouvée dans le compartiment cytosolique mais est également transloquée dans le noyau des cellules infectées (Yin et *al.*, 2018 ; Hervouet, Ferrié et Ankavay, 2021 ; Szkolnicka et *al.*, 2019 ; Lenggenhager et *al.*, 2017).

L'ORF3, impliquée dans la sécrétion des particules virales, a été retrouvée en association avec des microtubules (Kannan et *al.*, 2009), au niveau des endosomes précoces et de recyclage (Chandra et *al.*, 2008) ainsi qu'au niveau des MVB (Graff et *al.*, 2005). La protéine ORF3 possède un motif PSAP (95-Pro-Ser-Ala-Pro-98) via lequel elle interagit avec la protéine cellulaire Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) (Nagashima et *al.*, 2011). Une étude récente a montré que l'ORF3 est palmitoylée au niveau de résidus cystéine localisés dans la région N-terminale et est exposée du côté cytosolique des membranes intracellulaires (Gouttenoire et *al.*, 2018).

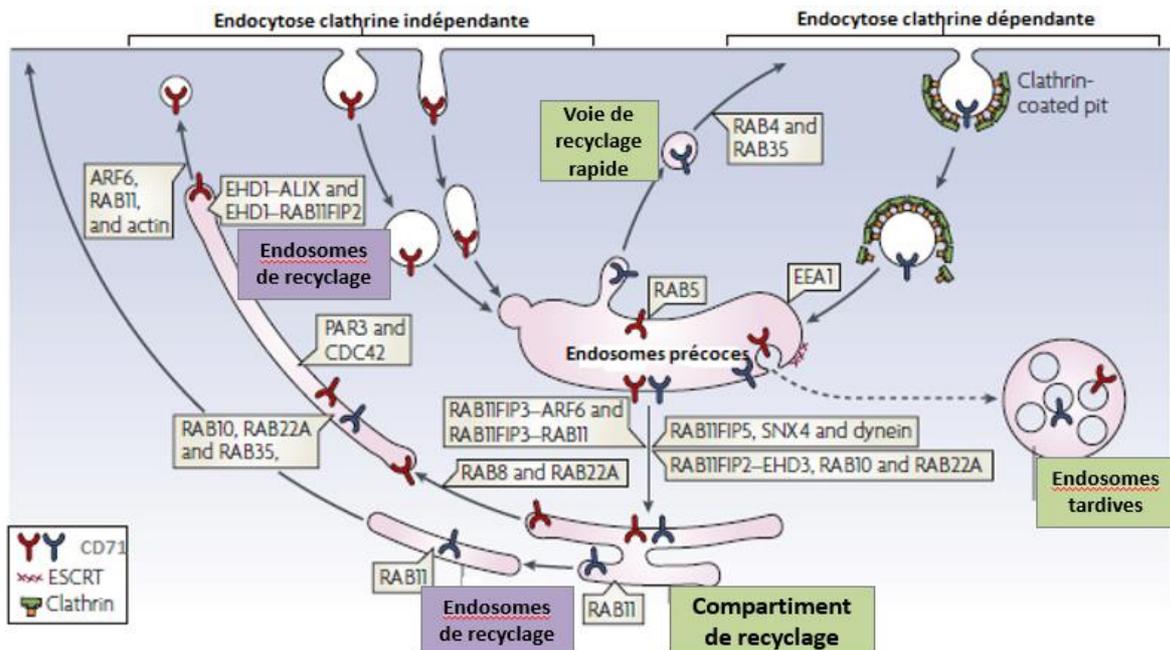
#### Etude de la nature des usines virales induites par le HEV :

Dans le cadre de ce projet et grâce à la spécificité de nos différents anticorps notamment le P1H1, nous avons réalisé une étude approfondie de colocalisation des protéines ORF2i avec différents marqueurs cellulaires. Conformément aux études menées auparavant, nos résultats ont montré une colocalisation partielle de l'ORF2i avec différents marqueurs des endosomes tardifs notamment CD81. Nous avons identifié une forte colocalisation de l'ORF2i avec plusieurs marqueurs de l'ERC qui a été abrogée lors du silencing de Rab11.

L'ERC est un compartiment central permettant le recyclage du matériel cellulaire. Il permet aussi le transport des composants vers différents compartiments cellulaires (Grant & Donaldson, 2009). Ce compartiment, découvert en 2001/2002 par Maxfield et *al.*, permet notamment de réguler la composition en lipides et en protéines de la membrane plasmique, polariser les cellules, maintenir l'intégrité structurale des tissus, maintenir la cohésion cellulaire par l'établissement de contacts cellule-cellule, sécréter les cytokines et participer à la mise en place de la réponse immunitaire. Une grande partie des connaissances actuelles a été découverte grâce au récepteur à la transferrine (CD71) qui représente le cargo modèle pour étudier l'ERC. Il a été proposé que cette machinerie cellulaire de recyclage peut également être détournée au profit de certains pathogènes lors de leur cycle de réplication tels que le virus Herpès simplex 1 (Hollinshead et *al.*, 2012) et le cas de HCV (Coller et *al.*, 2012). Les régulateurs majeurs de l'ERC sont les petites GTPases, les Rabs, les Arfs et leurs effecteurs et il existe deux voies différentes de recyclage (**Fig.38**) : une voie rapide qui correspond au retour de cargos directement à la membrane plasmique et une voie de recyclage lent caractérisée par le passage du cargo, tout d'abord, dans les endosomes de tri, puis dans les compartiments de recyclage, pour enfin rejoindre la membrane plasmique (Klumperman & Raposo, 2014).

Peu d'études ont été focalisées sur ce compartiment et seuls quelques régulateurs de la voie de recyclage rapide ont été identifiés tels que les GTPases Rab4 et Rab35. La fonction exacte de ces régulateurs n'est pas clairement identifiée. McCaffrey et collaborateurs (2001) ont montré que la surexpression de Rab4 favorisait le recyclage de CD71 et augmentait son niveau d'expression au niveau de la membrane plasmique. D'autre part et grâce à l'utilisation de la technique d'ARN interférence, Kouranti et collaborateurs (2006) ont prouvé que Rab35, présent à la fois au niveau des endosomes précoces et à la membrane plasmique, était également impliqué dans le recyclage rapide du récepteur CD71 (Klumperman & Raposo, 2014). En effet, le cargo CD71 emprunte à la fois la voie de recyclage rapide et lente. La voie de recyclage lente a été nommée ainsi par opposition à la voie de recyclage rapide. La distribution et la taille de l'ERC varient selon les types cellulaires. Dans la plupart des cellules, le compartiment de recyclage est proche du centre organisateur des microtubules, proche de l'appareil de Golgi et se condense dans les régions périnucléaires (Maxfield & McGraw, 2004).

L'ERC a été impliqué dans le cycle viral de nombreux virus notamment dans le transport, l'assemblage ainsi que dans la sécrétion des particules virales. Dans le cas de HCV, il a été démontré que l'ERC contribue au transport des virions néosynthétisés vers la membrane plasmique (Coller et al., 2012). Dans le cas de HEV, nous avons pu démontrer que la sécrétion des particules de HEV dépend d'un ERC fonctionnel et qu'une infection par le HEV s'accompagne d'un détournement de ce compartiment cellulaire. A notre connaissance, ce type de détournement n'a jamais été décrit auparavant et pourrait être une caractéristique de l'infection par le HEV.



**Figure 38: Vue globale des voies classiques de recyclage.**

Les voies de recyclage lente et rapide interviennent dans plusieurs fonctions cellulaires. Il existe deux voies principales conduisant les cargos des endosomes de tri vers la membrane plasmique. Certaines molécules sont

adressées directement des endosomes de tri vers la membrane plasmique, tandis que d'autres transitent par un compartiment de recyclage ou ERC. Adaptée de (Klumpermant & Raposo, 2014) et de (Grant & Donaldson, 2009)

De nombreuses équipes ont montré la formation d'endosomes de recyclage de forme tubulaire caractérisés par leur grande surface membranaire. De même, il a été démontré que la fission de ces structures libère probablement des tubules et des vésicules chargées de récepteur à la transferrine (Farmer et *al.*, 2021). Ceci est en accord avec les données de notre étude suggérant que les usines virales induites par le HEV correspondent à un sous-compartiment de la voie de recyclage. De nombreux marqueurs spécifiques de ce compartiment tels que Rab11, CD71, MICAL-L1, PACSIN2 et EHD1 ont été utilisés lors de notre projet.

#### Etude de l'implication de Rab11 dans le cycle viral de HEV :

Dans les cellules humaines, la GTPase Rab11 se présente sous trois isoformes : Rab11A, Rab11B et Rab25. Le Rab11A a été la première isoforme caractérisée ; elle est localisée au niveau des endosomes de recyclage. Cette première isoforme semble être impliquée dans le contrôle du trafic des protéines et des lipides à travers et à partir des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique (Maxfield & McGram, 2004). Sur la base de sa large distribution et ses diverses fonctions, Rab11A a été retrouvée associée à de nombreux processus cellulaires tels que l'autophagie et la phagocytose. Des études récentes ont suggéré l'implication de Rab11A lors de la réplication de virus de la grippe (Redpath et *al.*, 2019 ; Ferro et *al.*, 2021). Contrairement au silencing de Rab11A, le silencing de Rab11B n'altère pas l'accumulation du récepteur à la transferrine au niveau des endosomes de recyclage montrant la présence de fonction non chevauchante pour ces deux isoformes différentes de Rab11 dans le processus de recyclage (Takahashi et *al.*, 2012). La présence de diverses isoformes et leur large distribution confèrent à la protéine Rab11 un niveau très élevé de plasticité (Ferro et *al.*, 2021). De même, de nombreuses études ont montré l'implication de Rab11A (Palmieri et *al.*, 2006 ; D'Agostiano et *al.*, 2019 ; Zhang et *al.*, 2020), Rab11B (Howe et *al.*, 2020) et de Rab25 (Ding et *al.*, 2017b ; Jeong et *al.*, 2018) dans de nombreux cancers. De plus, en raison de son implication dans de nombreux cancers, Rab11A a été utilisée comme cible thérapeutique. En revanche, il est difficile de développer des inhibiteurs sélectifs de Rab11 en raison de sa grande variabilité. Par conséquent, les approches pharmacologiques actuelles sont conçues pour perturber soit la localisation subcellulaire de Rab11, soit pour bloquer son interaction avec ses différents effecteurs spécifiques. De nombreux inhibiteurs ont été d'ailleurs utilisés afin de bloquer l'activité de Rab11A tels que la pitavastatine, la simvastatine et la fluvastatine (Ronzier et *al.*, 2019 ; Howe et *al.*, 2020). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'utilisation de ces différentes molécules sur la réplication du HEV.

Dans le cadre de notre projet, l'effet de silencing du gène codant pour Rab11 sur l'expression des protéines virales et sur la sécrétion des particules virales a été évalué à la fois en IF, en WB, en IP et en quantifiant les titres infectieux. Les résultats de cette analyse ont montré une forte perturbation de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i. Fait intéressant, les doubles marquages de l'ORF2 avec l'ORF3 n'ont pas montré de colocalisation dans les cellules transfectées avec les siRab11. De même, aucune colocalisation n'a été observée avec les marqueurs de l'ERC. Ces observations indiquent que la perturbation de l'ERC, suite à l'inhibition de l'expression de Rab11, induit un changement drastique de la localisation subcellulaire de l'ORF2i. De plus, les niveaux d'ARN extracellulaires et les titres infectieux étaient réduits dans les cellules PLC3/HEV transfectées par les siRab11 par rapport aux cellules témoins. Il serait par la suite intéressant d'analyser les cellules transfectées avec les siRab11 en EM.

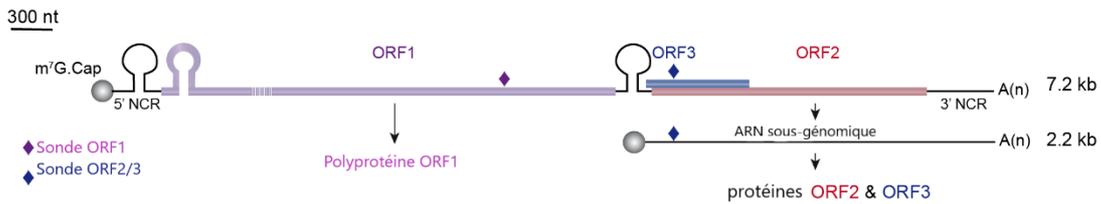
## Partie II : Caractérisation de la maturation de la réplicase virale

### I. Contexte scientifique :

La protéine ORF1, aussi appelée réplicase virale, est une polyprotéine non structurale présentant plusieurs domaines essentiels à la réplication du HEV. Plusieurs équipes ont montré qu'elle pourrait subir une maturation et générer plusieurs polypeptides. Néanmoins, ces données restent encore controversées puisqu'aucune équipe n'a pu mettre en évidence la maturation de la protéine ORF1 en système infectieux (LeDesma et *al.*, 2019). Les essais de caractérisation de l'ORF1 se sont heurtés à des difficultés intrinsèques au cycle viral : le faible niveau d'expression de l'ORF1 et sa régulation précise au cours du cycle viral (Lenggenhager et *al.*, 2017). D'un point de vue pratique, la caractérisation de l'ORF1 est compliquée par l'absence d'anticorps commercial et fonctionnel, spécifique de cette protéine. Une autre difficulté réside dans le fait que le HEV est difficile à amplifier *in vitro* et de nombreux aspects de son cycle restent à ce jour encore inconnus. Ainsi, la localisation subcellulaire de l'ORF1 a été peu étudiée et uniquement à l'aide de systèmes d'expression hétérologues ou de réplicons. Aucune étude n'a encore analysé la localisation subcellulaire de l'ORF1 dans un système de culture reproduisant le cycle infectieux du HEV. Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de la réplication virale du HEV en nous concentrant sur la réplicase virale. L'hypothèse que l'ORF1 subit probablement une maturation dans la cellule hôte a été émise. Nous avons eu recours à l'utilisation de 3 systèmes pour l'étudier : un système infectieux, un système réplicon et un système d'expression hétérologue.

Un système efficace de culture de HEV-3 a été précédemment mis au point par notre équipe permettant de produire massivement toutes les protéines virales et d'atteindre des titres infectieux importants (Montpellier et *al.*, 2018, **Fig. 39A**). Nous disposons également au laboratoire d'un réplicon d'une souche HEV-3 adaptée à la culture cellulaire et exprimant la luciférase (**Fig. 39B**). Ce système nous a permis de sélectionner des sites d'insertion d'épitopes pour lesquels l'efficacité de réplication était préservée. Un système d'expression hétérologue de l'ORF1 a également été mis au point afin de faciliter la caractérisation des formes minoritaires de l'ORF1. L'identification de remaniements membranaires induits par l'ORF1 a été également abordée dans des approches de microscopie électronique en analysant des cellules exprimant de façon stable des réplicons du HEV.

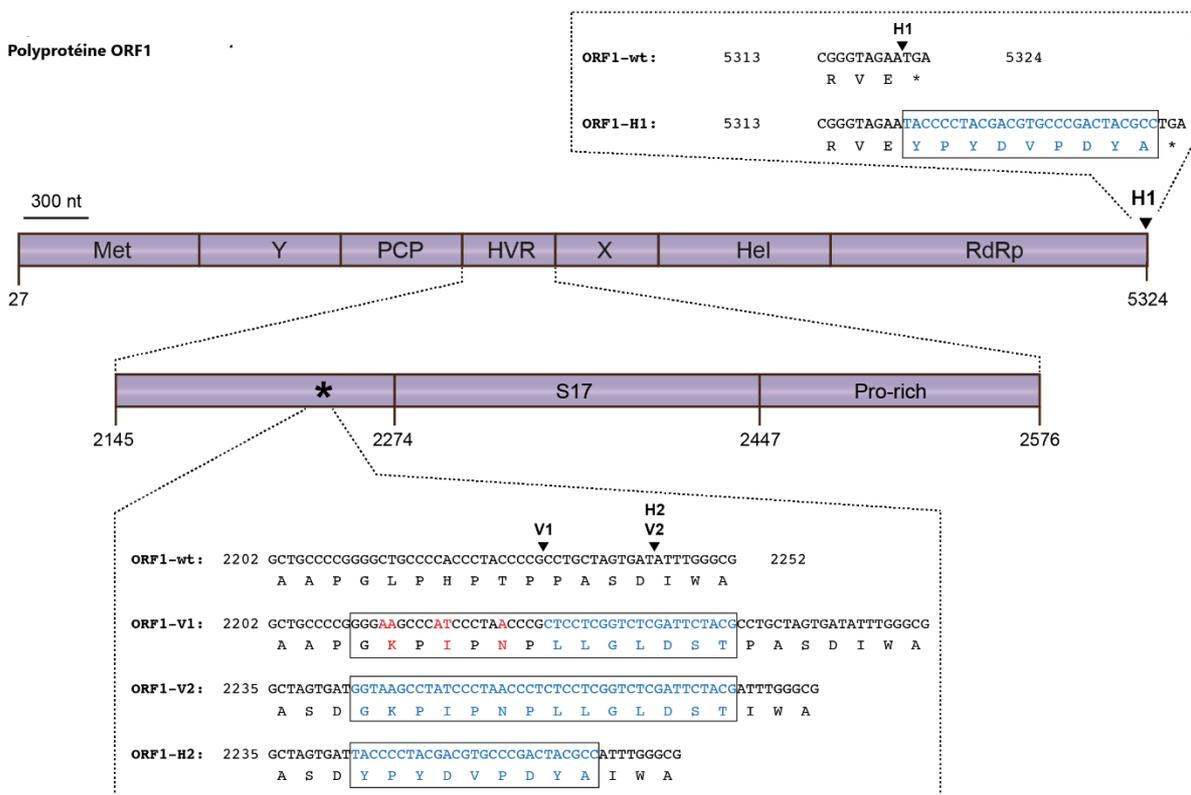
### A Souche HEV p6 infectieuse



### B Réplicon HEV p6-GLuc



### C Polyprotéine ORF1



**Figure 39 : Schéma de l'organisation des gènes du HEV génotype 3 (A), du clone réplicon p6-GLuc (B) et de la polyprotéine ORF1 (C).**

**A-** Le génome viral du HEV code trois protéines virales : l'ORF1 (violet), l'ORF2 (rouge) et l'ORF3 (bleu). Les régions 3' et 5' non codantes (NCR) sont également représentées. **B-** Représentation schématique de la séquence du réplicon p6-GLuc (Shukla et al., 2012 ; Emerson et al., 2013) et ses différentes protéines exprimées. Dans le réplicon HEV p6-GLuc, la luciférase de Gaussia (GLuc, verte) remplace l'ORF3 et l'extrémité N-terminale de l'ORF2. **C-** Schéma de l'organisation des différents domaines fonctionnels de l'ORF1 : Met, Y, PCP, HVR, X, Hel et RdRp. Un agrandissement en dessous présente l'HVR composée de l'insertion de la protéine ribosomale S17 (S17 : 2274-2447) et de la région riche en résidus proline (Pro-rich). Les épitopes HA ont été insérés soit à l'extrémité C-terminale de l'ORF1 (H1) ou dans l'HVR (H2). Deux épitopes V5 ont également été insérés dans l'HVR (V1 et V2). Les épitopes H2 et V2 ont été insérés à la même position. Les différentes insertions des épitopes dans l'HVR ont été réalisées entre les nucléotides 2202 et 2252 dont les séquences sont détaillées dans l'encadré en pointillés. Les différents nucléotides et acides aminés mutés (rouge) ou insérés (bleu) y sont également

précisés. De même, les sondes utilisées dans les expériences de RT-qPCR sont représentées par des losanges : une sonde spécifique de l'ORF1 (violet), de l'ORF2/3 (bleu) et de la Gluc (vert).

### **Ma contribution dans le projet :**

Durant ma thèse, j'ai été fortement impliquée dans ce projet qui porte sur la caractérisation de la réplicase virale du HEV. Au cours de ma première année de thèse et afin de caractériser plus facilement l'expression, la localisation subcellulaire ainsi que la maturation de la réplicase virale, j'ai mis en place un système d'expression hétérologue de la protéine ORF1 contenant les insertions d'épitopes V5 ou HA présentes aux mêmes positions que dans les systèmes infectieux et réplicon. Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai poursuivi la caractérisation de la maturation de l'ORF1 exprimée de manière hétérologue ainsi que sa localisation subcellulaire. J'ai notamment réalisé des fractionnements subcellulaires et des co-marquages de l'ORF1 avec des marqueurs des compartiments cellulaires. Je me suis focalisée également sur l'identification des séquences aminées des formes de maturation de l'ORF1 en réalisant des immunoprécipitations suivies par des analyses en spectrométrie de masse. J'ai également développé des lignées cellulaires PLC3 et Huh-7.5 qui expriment de façon stable des réplicons HEV, ceci afin de définir si la réplicase virale du HEV à elle seule, est capable d'induire des réarrangements membranaires au sein de la cellule hôte.

## II. Matériel et Méthodes

### 1. Lignées cellulaires

Les cellules PLC3 (sous-clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5, Montpellier et *al.*, 2018) et Huh-7.5 (sous-clone des cellules Huh-7, Blight et *al.*, 2002) ont été maintenues en culture à 37°C dans un milieu DMEM (pour Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum de veau foetal et 1% d'acides aminés non essentiels (Life Technology).

Les cellules H7-T7-IZ, dérivées des cellules Huh-7, exprimant constitutivement la polymérase T7 (gracieusement fournies par le laboratoire du Dr R. Bartenschlager, University of Heidelberg, Germany) ont été maintenues en culture à 37°C dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal, 1% d'acides aminés non essentiels et de la zéocine (InvivoGen) à une concentration de 50µg/ml (Romero-Brey et *al.*, 2012).

### 2. Choix des épitopes et des sites d'insertion

L'analyse d'un alignement (Clustal Omega) de séquences aminées de l'ORF1 provenant de 44 souches HEV de différents génotypes a permis d'identifier des régions variables susceptibles de pouvoir tolérer l'insertion d'épitopes. Un site a été choisi à l'extrémité C-terminale de la RdRp et six autres sites ont été identifiés dans la région HVR. Le choix des sites d'insertion et des constructions étiquetées a été basé sur la caractérisation de leur efficacité de réplication, leur profil en Western blot (WB) et en immunofluorescence (IF). En effet, quatre constructions dérivées de la souche p6 Kernow C-1 du HEV dans lesquelles l'épitope V5 ou HA a été inséré à trois positions différentes dans l'ORF1 ont été sélectionnées (**Fig.24C**). Le premier site d'insertion de l'épitope HA se trouve à l'extrémité C-terminale de la région RdRp (H1) et les deux autres sites dans la région hypervariable : V1, V2 pour l'épitope V5 et H2 pour l'épitope HA.

### 3. Mutagenèse dirigée

Afin d'insérer les différents épitopes dans l'ORF1, des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées. Ainsi, les séquences en amont et en aval des sites d'insertion ont été amplifiées à partir de 10ng d'ADN matrice, en présence de 0,4µM d'amorces et de l'ADN Polymérase Q5 High-Fidelity (New England, Biolabs). Initialement, l'ADN a été dénaturé à 98°C pendant 120 secondes (s). Puis, ont suivi 26 cycles d'amplification constitué chacun par une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 s, une étape d'hybridation à 55°C pendant 7s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 14s. Suite à cette PCR, les fragments amplifiés ont été purifiés sur un gel d'agarose grâce à un Kit de purification des produits PCR sur gel (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™) selon les recommandations du fabricant. Après fusion des fragments situés en aval et en amont de l'épitope inséré, une nouvelle réaction de PCR a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment mais en utilisant un couple

d'amorces externes. Les différents couples d'amorces et les enzymes utilisées dans ces réactions sont détaillés dans le **Tableau 3**. Les plasmides pBlueScript SK(+) contenant le génome complet p6 et le génome du réplicon p6-GLuc ainsi que le plasmide pTM-ORF1 ont été digérés avec les mêmes enzymes de restriction (Biolabs) pendant 3h à une température de 37°C. Puis, la ligation de chaque fragment amplifié dans le vecteur correspondant a été réalisée à l'aide de la ligase T4 (Biolabs) dans un volume final de 20µl pendant 2h à température ambiante. Des bactéries *E. coli* (souche TOP10) ont été transformées avec l'ADN des différents plasmides puis, après sélection par l'ampicilline, des clones bactériens ont été cultivés sur la nuit à 37°C afin d'en extraire l'ADN plasmidique en utilisant le kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). Après la confirmation des insertions des épitopes par séquençage, deux clones ont été analysés par construction.

**Tableau 3: Différents couples d'amorces utilisés pour l'insertion**  
 Les amorces sont nommées selon (i) le site d'insertion de l'épitope (H1, H2, V1 ou V2), (ii) la localisation du fragment en amont (**Up**) ou en aval (**Do**) du site d'insertion de l'épitope, (iii) le sens de l'amorce direct (**F**) ou inverse (**R**) et (iv) la position de l'amorce externe (ext) ou interne (int). Premièrement, les fragments en amont et en aval ont été amplifiés séparément pour chaque construction (c'est-à-dire pour p6-H1-GLuc : fragment en amont amplifié à l'aide de H1-Up-F-ext/H1-Up-R-int et fragment en aval amplifié à l'aide de H1-Do-F-int/H1-Do-R-ext). Deuxièmement, les fragments en amont et en aval ont été fusionnés grâce à la région de chevauchement (en gras). Troisièmement, les fragments contenant l'épitope ont été amplifiés à l'aide d'amorces externes. Les sites de restriction ont été soulignés dans les séquences des amorces. Les séquences correspondant aux épitopes HA ou V5 sont représentées en gras.

Nom de l'amorce	Séquence (5' à 3')	Enzyme de restriction / épitope
H1-Up-F-ext	GTCATGCATGGTATTTGAAAATGACTTTTCGG	Nsil
H1-Up-R-int	<b>GGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA</b> TTCTACCCGCTGTATGATGGAATTTG	HA
H1-Do-F-int	<b>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC</b> TGAATAACATGTTTGTTCATCGCCC	HA
H1-Do-R-ext	TGGT <b>CGCGAAGTTGCTGGCCACGGCC</b>	Nrul
H2-Up-F-ext	GCGATATCCAAGGGCATGCGCCGGTTG	EcoRV
H2-Up-R-int	<b>GGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA</b> ATCACTAGCAGCGGGGTAGGG	HA
H2-Do-F-int	<b>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC</b> ATTTGGGCGTTACCACCGCCCTCCG	HA
H2-V1-V2-Do-R-ext	TGCATATGTAGCAGCAACAGGTG	NdeI
V1-F-ext	GAGGGCGCGCCCTGCTTCGGCTGCTGCCCG <b>GGGAAGCCCATCCCTAACCC</b> <b>GCTCCTCGGTCTCGATTCTACG</b> CCTGCTAGTGATATTTGGGCG	NotI / V5
V2-Up-F-ext	AGGCGGCCGCCCTGC	NotI
V2-Up-R-int	<b>CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC</b> ATCACTAGCA GGCGGGGTAGGG	V5
V2-Do-F-int	<b>GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACG</b> ATTTGGGCGTTAC CACCGCCCTCCG	V5

#### 4. Quantification de l'activité luciférase

Dans le cadre de notre projet, la quantification de l'activité luciférase a constitué une mesure directe de l'efficacité de réplication dans les cellules électroporées avec le réplicon p6-GLuc. Des cellules PLC3 électroporées avec l'ARN du réplicon p6-GLuc ont été cultivées pendant 5 jours à 37°C dans des plaques 24 puits. Un volume de 10µL du surnageant a été prélevé quotidiennement et gardé à -20°C. Avant d'effectuer la quantification de l'activité luciférase et afin d'enlever les différents débris cellulaires, les surnageants ont été centrifugés à 14000 rpm pendant 5min. Des dilutions des

surnageants au 1:100 dans le tampon de lyse (Promega) ont été effectuées et un volume de 5µL a été transféré dans des plaques 96puits. Puis, un volume de 20µl de substrat luciférine (Renilla Luciferase Assay System, Promega) a été injecté dans chaque puits. Le signal lumineux a été collecté pendant 10s à l'aide d'un luminomètre (Centro XS<sup>3</sup> LB960, Berthold Technologies). Les résultats ont été exprimés en taux de réplication et ont été normalisés par rapport au jour 1 post-électroporation et par rapport au p6-wt-Gluc.

## 5. Transfection

Des cellules H7-T7-IZ exprimant constitutivement la polymérase T7 ont été transfectées avec l'ADN des constructions pTM où l'ORF1 du HEV-3 (souche p6 Kernow C-1) est sous le contrôle du promoteur T7 : soit avec les constructions ORF1-H1 qui exprime l'ORF1 où est inséré l'épitope HA à l'extrémité C-terminale, ORF1-V1 ou ORF1-V2 qui expriment l'ORF1 où est inséré l'épitope V5 dans la région HVR tels que décrit dans la **Fig.39**. Les cellules transfectées avec le vecteur pTM-ORF1 (contenant la forme complète de l'ORF1 non taguée) ont été utilisées comme des contrôles. Des cellules H7-T7-IZ ont été étalées à raison de  $1,5 \times 10^6$  cellules par P100 dans un milieu DMEM contenant 2% de sérum de veau foetal 24h avant la transfection.

De même, des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec l'ADN des constructions pTM où les deux protéines virales ORF2 et ORF3 du HEV-3 (souche p6 Kernow C-1) sont sous le contrôle du promoteur T7, ceci en même temps que les constructions pTM/ORF1-V1 ou pTM/ORF1.

La transfection a été réalisée avec du TransIT™-LT1 Transfection Reagent (Mirus) selon les recommandations du fabricant. En bref, 1µg de plasmides prédilués dans 100µl d'OptiMEM ont été mélangés avec 5µl de TransIT prédilué dans 95µl d'OptiMEM. Le mélange a été incubé 20 min à température ambiante. Par la suite, les complexes ADN-agent transfectant ont été déposés sur les cellules H7-T7-IZ.

## 6. Immunofluorescence

Des cellules PLC3 électroporées avec l'ARN du HEV-p6 sauvage et portant les différents épitopes ou les cellules H7-T7-TZ transfectées avec l'ADN des différentes constructions pTM ont été cultivées dans des plaques 24 puits, puis fixées pendant 20 minutes à température ambiante avec 3% de paraformaldéhyde (PFA) dilué dans du PBS1X. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS1X puis perméabilisées avec du méthanol froid 100% pendant 5 min puis avec du Triton X-100 0,5% pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes avec 10% de sérum de chèvre dilué dans du PBS1X. Puis, les cellules fixées ont été incubées pendant 30 minutes avec les anticorps primaires (soit avec le V5 (souris) à une dilution de 1/500e ou avec le 3F10 (rat) à une dilution de 1/250e. Une fois lavées trois fois avec du PBS1X, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires dilués au 1/500e, conjugués à des fluorochromes correspondant à chaque anticorps

primaire utilisé. Parallèlement, les noyaux des cellules ont été marqués avec le DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) dilué au 1/500e. A la fin, les lamelles portant les cellules fixées et marquées ont été montées sur des lames porte objets en présence du Mowiol (Calbiochem) puis analysées en microscopie confocale (LSM880, Zeiss), objectif 63X à immersion avec une ouverture numérique de 1,4. L'ensemble des anticorps primaires utilisés en IF sont détaillés dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4: Liste des anticorps primaires utilisés en IF, WB et IP dans le cadre de la caractérisation de la réplicase virale du HEV.**

Nom	Hôte / isotype	Clone	Source	Dilution en IF	Dilution en WB/ IP
V5	Souris/ IgG2a	Monoclonal	Abcam	1:500	
V5	Souris/ IgG2a	Monoclonal	Invitrogen		1:1000
V5	Chèvre/ polyclonal	Polyclonal	Abcam		IP
HA	Rat/ IgG1	Monoclonal	Roche	1:250	1:1000
ORF2 (1E6)	Souris/ IgG2b	Monoclonal	Millipore	1:800	1:1000
ORF3	Lapin/ polyclonal	Polyclonal	S. Emerson Lab	1:1000	
CD63	Souris/ IgG1	Monoclonal		1:100	
CD71	Souris/ IgG1	Monoclonal	Santa Cruz	1:100	
CD81	Souris/ IgG1	Monoclonal	Santa Cruz	1:100	
Rab11	Lapin	Monoclonal	Cell Signaling	1:100	
MICAL-L1	Lapin	Polyclonal	Abcam	1:100	
EHD1	Lapin	Polyclonal	Abcam	1:100	
Tubulin b	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich		1:4000
Lamin B1	Lapin	Polyclonal	Abcam		1:1000
Calnexin	Lapin	Polyclonal	Abcam		1:1000

## 7. Quantification de l'ARN viral

Différents couples d'amorces et de sondes ciblant l'ARN génomique et sous-génomique (**Tableau 5**) ont été désignées afin de quantifier à la fois l'ARN viral intra et extracellulaire. Les ARN viraux ont été extraits des surnageants cellulaires (**ARN extracellulaires**) en utilisant le Kit Qiamp ARN viral (QIAGEN) ou des lysats (**ARN intracellulaires**) en utilisant le tampon de lyse du kit d'extraction de l'ARN (NucleoSpin RNA plus, Macherey-Nagel). L'ARN extracellulaire provenant des surnageants cellulaires a été élué dans un volume de 80µL alors que l'ARN intracellulaire provenant des lysats cellulaires a été élué dans 60µL d'eau exempte de RNAase. Comme l'ARN du HEV possède une queue poly-A, l'ADNc a été synthétisé après hybridation d'une amorce polydT (10 min, 65°C), à partir des différents ARN extraits selon les recommandations de fabricant (AffinityScript Multiple température cDNA Synthetic kit, Agilent). Une gamme de 7 dilutions de l'ADNc du plasmide p6 du HEV a été utilisée afin de tracer la courbe standard permettant ainsi la quantification des ARN extraits. L'étape initiale de la transcription a été faite à 42°C pendant 5min, suivie d'une étape de transcription inverse à 55°C durant 60min et d'une dernière étape réalisée à 70°C pendant 15min. Les amorces et les sondes Taqman (ThermoFisher) utilisées afin de quantifier les ARN viraux extraits sont listées dans le **Tableau 5**. Les réactions d'amplification ont été initiées par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes puis s'ensuivent 40 cycles à 95°C pendant 15 s et une élongation à 60°C pendant 1min. Le signal

fluorescent a été mesuré en temps réel à l'aide d'un Thermocycleur QuantStudio3 (Applied Biosystems).

**Tableau 5: Tableau récapitulatif des différentes amorces et sondes utilisées pour la quantification des ARN viraux du HEV.**

Nom	U g s w g p-@# \$ % & ' ( ) * + , - . / : ; < = > ? @ [ \ ] ^ _ ` {   } ~ " ' " "	Reference
Amorce sens ORF1	AAGACATTCTGCGCTTTGTT	Yin et al., 2017
Amorce anti-sens ORF1	TGACTCCTCATAAGCATCGC	Yin et al., 2017
Sonde ORF1	CCGTGGTTCCGTGCCATTGA	Yin et al., 2017
Amorce sens ORF2	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	Jothikumar et al., 2006
Amorce anti-sens ORF2	AGGGGTTGGTTGGATGAA	Jothikumar et al., 2006
Sonde ORF2	TGATTCTCAGCCCTTCGC	Jothikumar et al., 2006
Amorce sens GLuc	TCTGTGTGTGGACTGCACAA	Ding et al., 2018
Amorce anti-sens GLuc	TGGATCTTGCTGGCAAAGGT	Ding et al., 2018
Sonde Gluc	GGCTTGCCAACGTGCAGTGT	Ding et al., 2018

### 8. Quantification des titres infectieux

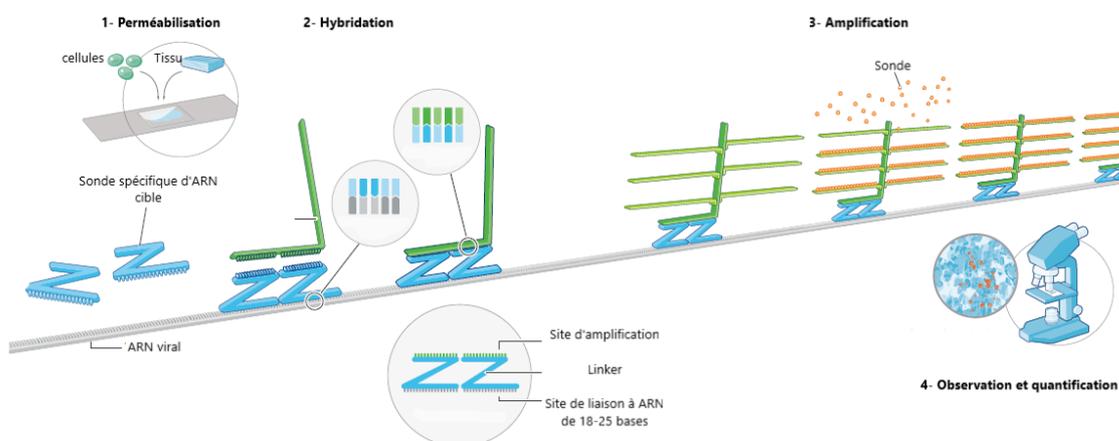
Les surnageants des cellules PLC3 électroporées avec l'ARN du HEV-p6 (PLC3/p6-wt), p6-V1 (PLC3/p6-V1), p6-V2 (PLC3/p6-V2) et p6-H2 (PLC3/p6-H2) ont été utilisés pour infecter des cellules Huh-7.5 dans des plaques 96 puits platées 24h avant infection. Trois jours post-infection, les cellules ont été fixées et la protéine ORF2 a été détectée par immunofluorescence comme décrit précédemment. Les cellules positives pour l'ORF2 ont été comptées en microscopie à épifluorescence comme des cellules infectées. Trois puits ont été infectés par le même surnageant. Enfin, le nombre de cellules infectées pour chaque dilution a été quantifié et utilisé pour calculer les titres infectieux en FFU/ml (Focus Forming Unit/ml).

### 9. Hybridation *in situ* pour détecter les ARN viraux

La RNAscope® est une technique d'hybridation *in situ* qui a été conçue afin de détecter spécifiquement et avec une grande sensibilité des ARNm dans des cellules ou tissus. Cette technique a été utilisée avec succès pour détecter les ARN du HCV et du virus Zika dans des cellules hôtes (Wang et al., 2012 ; Liu et al., 2019). Les sondes ont une forme de Z et se composent de trois parties différentes : un site de liaison à l'ARN (18-25 bases), une zone intermédiaire et un site de liaison du préamplificateur (**Fig.40**). Deux sondes successives doivent se lier l'une à côté de l'autre afin que l'amplificateur se fixe ce qui accroît la spécificité de cette technique. Dans la première étape, les cellules ont été fixées et perméabilisées afin de faciliter l'accessibilité à l'ARN. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques à l'ARN cible ont été hybridées par paires « ZZ » à plusieurs cibles d'ARN (De Biase et al., 2021).

Dans le cadre de notre projet, des sondes ciblant l'ARN génomique et sous-génomique du HEV ont été construites par ACDBio (pour Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne). Cette partie du projet a été mise en place par Karoline Metzger. En effet, des cellules PLC3/p6-wt et des PLC3/p6-V1 comme décrit

précédemment ont été étalées sur des lamelles de verre dans des plaques de 24 puits puis fixées avec 3% de PFA diluée dans du PBS pendant 20min à 4°C, 3 et 6 jours post-électroporation. Afin de poursuivre les différentes étapes de la technique RNAscope®, les lamelles contenant les cellules fixées à la PFA ont été attachées sur une lame de verre puis entourées d'une barrière hydrophobe à l'aide d'un stylo ImmEdge fourni par ACDBio . D'abord, les cellules ont été traitées avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 10 minutes à température ambiante puis lavées deux fois avec du PBS1X. Ensuite, les cellules ont été incubées avec la protéase-III diluée au 1:15 pendant 15 minutes à température ambiante suivie de deux lavages avec du PBS1X. Les ARN ont été marqués en utilisant les fluorochromes Opal 520nm, 570nm et 650nm (Akoya). Enfin, cette technique RNAscope® peut être complétée par une IF ciblant les protéines virales comme décrit précédemment. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un microscope confocal (LSM 880, Zeiss) équipé d'un objectif 63X à immersion avec une ouverture numérique de 1,4. Les images issues de cette analyse ont été traitées en utilisant les logiciels ImageJ et Fiji.



**Figure 40 : Principe de la technique RNAscope®.**

D'abord, les cellules ou les tissus sont fixés et perméabilisés afin de faciliter l'accessibilité des sondes à l'ARN viral. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques à l'ARN cible (Z) sont hybridées par paires (ZZ) à plusieurs cibles d'ARN. Plusieurs molécules d'amplification de signal sont ensuite hybridées. Les cellules sont analysées par microscopie confocale. Adaptée à partir (Wang et *al.*, 2012).

## 10. Western blot

Afin d'étudier la maturation de la protéine ORF1 dans les différents systèmes de culture, les cellules PLC3 électroporées avec la souche p6 ou le réplicon p6-Gluc ont été lysées entre 4 heures et 3 jours post-électroporation en utilisant un kit de fractionnement des protéines intracellulaires (Fisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les différentes fractions ont été inactivées pendant 10min à 70°C en présence de tampon Laemmli en conditions réductrices. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel SDS-PAGE à 8% et transférées sur des membranes de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham). La membrane de nitrocellulose a été ensuite incubée dans la solution de blocage (PBS1X avec 5% de Lait et 0.2% Tween-20) pendant 1 heure à température ambiante, puis pendant la nuit à

4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS1X avec 2% de BSA et 0.2% Tween-20. Puis, la membrane a été lavée trois fois avec du PBS 1X contenant 0,2% de Tween-20 puis incubée avec l'anticorps secondaire conjugué avec l'HRP dilué dans la solution de blocage pendant 45min à température ambiante. Puis, la membrane a été lavée 3 fois. Après ajout du substrat, le signal spécifique des protéines d'intérêt a été révélé par chimiluminescence (ECL, Amersham).

### **11. Immunoprécipitation et analyse par spectrométrie de masse des différentes formes de clivage**

Dans le but de déterminer la séquence en aa par spectrométrie de masse (MS/MS) des protéines immunoprécipitées, une série d'IP à l'aide de l'anticorps anti-V5 a été réalisée à la fois dans le système hétérologue et dans le système infectieux en utilisant de grandes quantités de cellules exprimant l'ORF1 portant l'épitope V5. En fait, un nombre total de 100 à 150 millions de cellules PLC3 ou H7-T7-IZ ont été lysées en présence du tampon B1 contenant 50mM de Tris-HCl (pH 7), 100mM de NaCl, 2mM d'EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1mM de PMSF et des inhibiteurs de protéase (Complete, Roche) pour produire 25mg de protéines totales qui ont été par la suite immunoprécipitées en utilisant 24µg d'anticorps anti-V5. Les IP ont été faites en utilisant des billes magnétiques Dynabeads™ Antibody Coupling kit (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. D'abord, les anticorps ont été incubés avec les billes pendant une nuit à 37°C. Les billes ont ensuite été lavées 6 fois avec du tampon PBS +0.5% NP-40 et incubées pendant 1h à température ambiante avec les lysats cellulaires inactivés par la chaleur. Par la suite, les billes ont été lavées, resuspendues dans du tampon Laemmli puis les protéines ont été dénaturées pendant 20min à 80°C. Une petite fraction des protéines immunoprécipitées a été utilisée pour réaliser un western blot et le reste des protéines immunoprécipitées a été déposé en parallèle sur un gel qui a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.

La coloration au bleu de Coomassie a été faite en deux grandes étapes selon le protocole de Candiano et collaborateurs (Candiano et *al.*, 2005). Premièrement, le gel polyacrylamide a été plongé pendant 2h à température ambiante dans une solution de fixation contenant 50% d'éthanol absolu et 3% d'acide Phosphorique puis lavé 3 fois avec de l'eau MilliQ. Deuxièmement, il a été incubé minimum 1 jour à température ambiante avec une solution de coloration contenant 10% d'acide Phosphorique, 10% du sulfate ammonium, 0,12% de blue brillant G250 et 20% de méthanol. La décoloration a été faite avec de l'eau MilliQ jusqu'à ce que les bandes soient nettement visibles.

Après la séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et suite à un alignement précis du WB et du gel de Coomassie, les bandes d'intérêt ont été découpées et identifiées par MS/MS après digestion trypsique. L'analyse par MS/MS a été initiée par une série de lavages afin d'enlever une partie de la solution de coloration et des sels restant. Les différents échantillons ont été ensuite digérés à l'aide de la trypsine permettant un clivage du côté C-terminal au niveau des acides aminés basiques tels

que la lysine et l'arginine. Le surnageant de digestion a été ensuite analysé par NanoLC-MSMS et à l'aide de bases de données, comme décrit dans Montpellier et al., 2018.

### **12. Génération des cellules exprimant la protéine ORF1 de façon stable**

Un autre objectif de notre projet a été également de définir si la réplicase virale de HEV à elle seule était capable d'induire des réarrangements membranaires au sein de la cellule hôte. Pour ce faire, différents réplicons stables exprimant la protéine ORF1 ont été construits (**Fig.57**). Des cellules PLC3 ou Huh-7.5 ont été électroporées avec chacun de ces réplicons puis maintenues sous pression de sélection avec de la puromycine pendant 15 jours. Les cellules ont été analysées en IF et en microscopie électronique.

### III. Résultats

#### 1. Etude de l'impact de l'insertion d'épitopes dans la réplicase ORF1

##### 1.1.#

---

Dès le lancement du projet, un alignement (Clustal Omega) de séquences aminées de l'ORF1 provenant de 44 souches de HEV de différents génotypes a été réalisé afin d'identifier des régions du génome viral pouvant tolérer l'insertion d'épitopes du fait de leur variabilité. L'HVR a été confirmée comme étant la région la plus divergente du génome viral. Initialement, sept sites ont été choisis pour l'insertion d'épitopes : six sites dans la région HVR et un site à l'extrémité C-terminale du domaine RdRp, formant l'hypothèse que cette insertion ne perturbe pas la conformation de la polyprotéine. Nous avons choisi d'insérer les épitopes HA, V5 ou Myc dans le génome de la souche p6 Kernow C-1 du HEV et du réplicon correspondant. Des analyses approfondies basées sur l'étude de l'efficacité de réplication de chacune des constructions et leur niveau de détection en IF et en WB, nous ont permis de sélectionner deux épitopes (HA et V5) et trois sites d'insertion parmi les 7 initialement testés (données non montrées). Un site d'insertion de l'épitope HA est localisé à l'extrémité C-terminale de la région RdRp (H1). Les deux autres sites sont localisés dans l'HVR : V1, V2 pour l'épitope V5 et H2 pour l'épitope HA (**Fig.39**). Les épitopes HA et V5 ont été insérés à la même position dans les constructions H2 et V2, respectivement.

##### 1.2.-

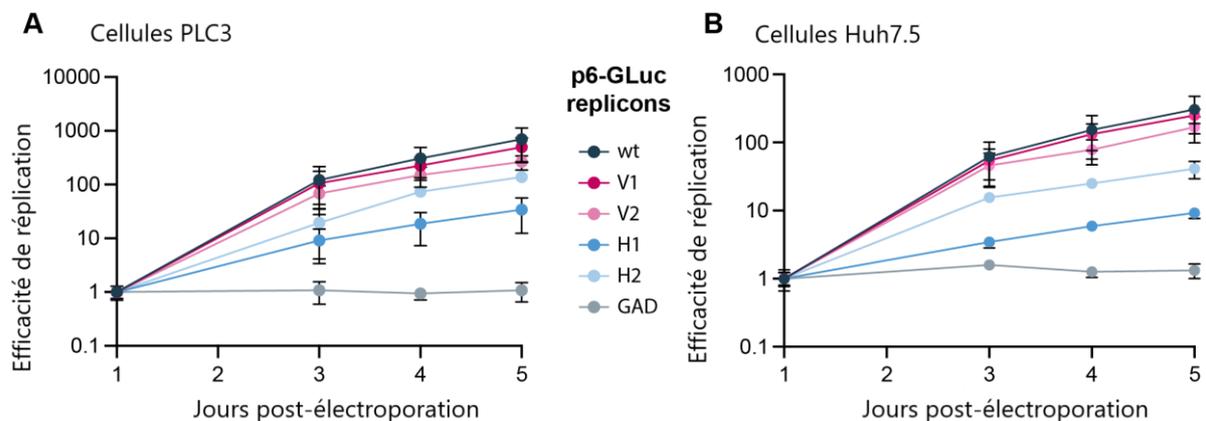
---

##### HEV

#### 1.2.1. Efficacité de réplication des constructions étiquetées en système réplicon et infectieux

L'impact de l'insertion d'épitopes dans l'ORF1 sur la réplication du HEV a été d'abord étudié grâce à l'utilisation d'un réplicon appelé p6-GLuc où les séquences codant l'ORF3 et la partie N-terminale de l'ORF2 ont été remplacées par le gène codant la *Gaussia* luciférase (GLuc, Emerson et *al.*, 2013). A l'aide de ce réplicon, il est possible de mesurer l'activité de l'ORF1 puisque le gène *GLuc* est placé sous le contrôle de l'ORF1 et joue le rôle de gène rapporteur de l'activité de l'ORF1 et donc de l'efficacité de réplication. De plus, dans ce système, la Gluc est sécrétée dans le surnageant des cellules, ce qui facilite la mesure de la réplication en cinétique. Des cellules d'origine hépatocytaire humaine (PLC3 et Huh-7.5) ont été transfectées par électroporation avec l'ARN viral des différentes constructions sauvage (p6-wt-GLuc hébergeant l'ORF1 non étiquetée) et portant l'épitope HA (constructions p6-H1-GLuc et p6-H2-GLuc) ou l'épitope V5 (constructions p6-V1-GLuc et p6-V2-GLuc). A différents temps

post-électroporation, les efficacités de réplication ont été mesurées en quantifiant l'activité luciférase dans le surnageant des différentes cellules. L'ensemble de nos résultats obtenus dans les cellules PLC3 a montré une efficacité de réplication du réplicon p6-GLuc-V1 comparable à celle du réplicon p6-wt-GLuc (**Fig.41A**). Celle du réplicon p6-GLuc-V2 est quant à elle légèrement inférieure à celle du p6-wt. Même si l'épitope H2 est situé à la même position que l'épitope V2, son insertion dans l'ORF1 induit une diminution plus importante de l'efficacité de réplication (21,6% par rapport au p6-wt-GLuc) à 5 jpe. Nos résultats indiquent également que l'insertion d'un épitope HA en position C-terminale de l'ORF1 affecte la réplication virale d'une façon considérable. En effet, l'efficacité de réplication du réplicon p6-GLuc-H1 ne représente que 6,7% de celle du réplicon p6-wt-GLuc à 5 jpe. Les mêmes conclusions ont été tirées des résultats obtenus en utilisant les cellules Huh7.5, ce qui montre qu'indépendamment de la lignée cellulaire utilisée, l'insertion des épitopes induit les mêmes effets sur l'efficacité de la réplication (**Fig.41B**).



**Figure 41 : E t u d e d e l ' e f f i c a c i t é d e GLuc dans les cellules PLC3 (A) et Huh7.5 r é p l i c o n s (B) électroporées.**

Wt = p6-wt-GLuc exprimant l'ORF1 non étiquetée; GAD= p6-GAD-GLuc, mutant déficient pour l'activité RdRp ; V1= p6-V1-GLuc ; V2= p6-V2-GLuc ; H1=p6-H1-GLuc ; H2=p6-H2-GLuc. Les moyennes et écarts types des triplicats de trois expériences menées indépendamment sont présentés pour chaque point de la cinétique.

Afin de confirmer la spécificité des tests de réplication utilisés, le sofosbuvir, un inhibiteur de la réplication du HEV (Thi et *al.*, 2016), a été utilisé à une concentration finale de 20µM pour traiter les cellules PLC3 et Huh-7.5 électroporées avec les différentes constructions. En présence de sofosbuvir, nos résultats ont révélé une inhibition significative de la réplication de tous les réplicons à 5 jpe et ceci dans les deux lignées cellulaires utilisées (**Fig. 42 A et B**). Ces analyses ont permis de confirmer que l'efficacité d'inhibition de la réplication par le sofosbuvir était comparable entre les différents clones infectieux étiquetés. En parallèle, des cellules PLC3 électroporées avec l'ARN de la souche p6 infectieuse ont été traitées avec le sofosbuvir puis analysées en IF après immunomarquage de la protéine ORF2 par l'anticorps 1E6 (**Fig.42 C**). Après traitement, le signal fluorescent correspondant à

l'ORF2 n'était plus détectable dans le cytoplasme des cellules ; seul subsiste un signal fluorescent nucléaire pour le p6-wt et le p6-V1. Pour le p6-V2, aucun signal fluorescent n'était détectable après traitement par le sofosbuvir, ceci pouvant être expliqué par la plus faible efficacité de réplication de cette construction comparée aux p6-V1 et p6-wt.

L'ensemble de ces résultats amène à la conclusion que l'insertion de l'épitope V5 positionné dans la région HVR n'affecte pas (V1) ou peu (V2) la capacité de réplication du HEV. Cependant, l'insertion des épitopes HA diminue de façon drastique l'efficacité de réplication, surtout pour l'insertion en position H1. De ce fait, nous n'avons pas poursuivi la caractérisation des constructions H1 et H2. Par contre, nos résultats prometteurs obtenus avec les réplicons étiquetés avec l'épitope V5 nous ont encouragés à générer, dans la souche infectieuse HEV-p6, les insertions V1 et V2 (p6-V1 et p6-V2).

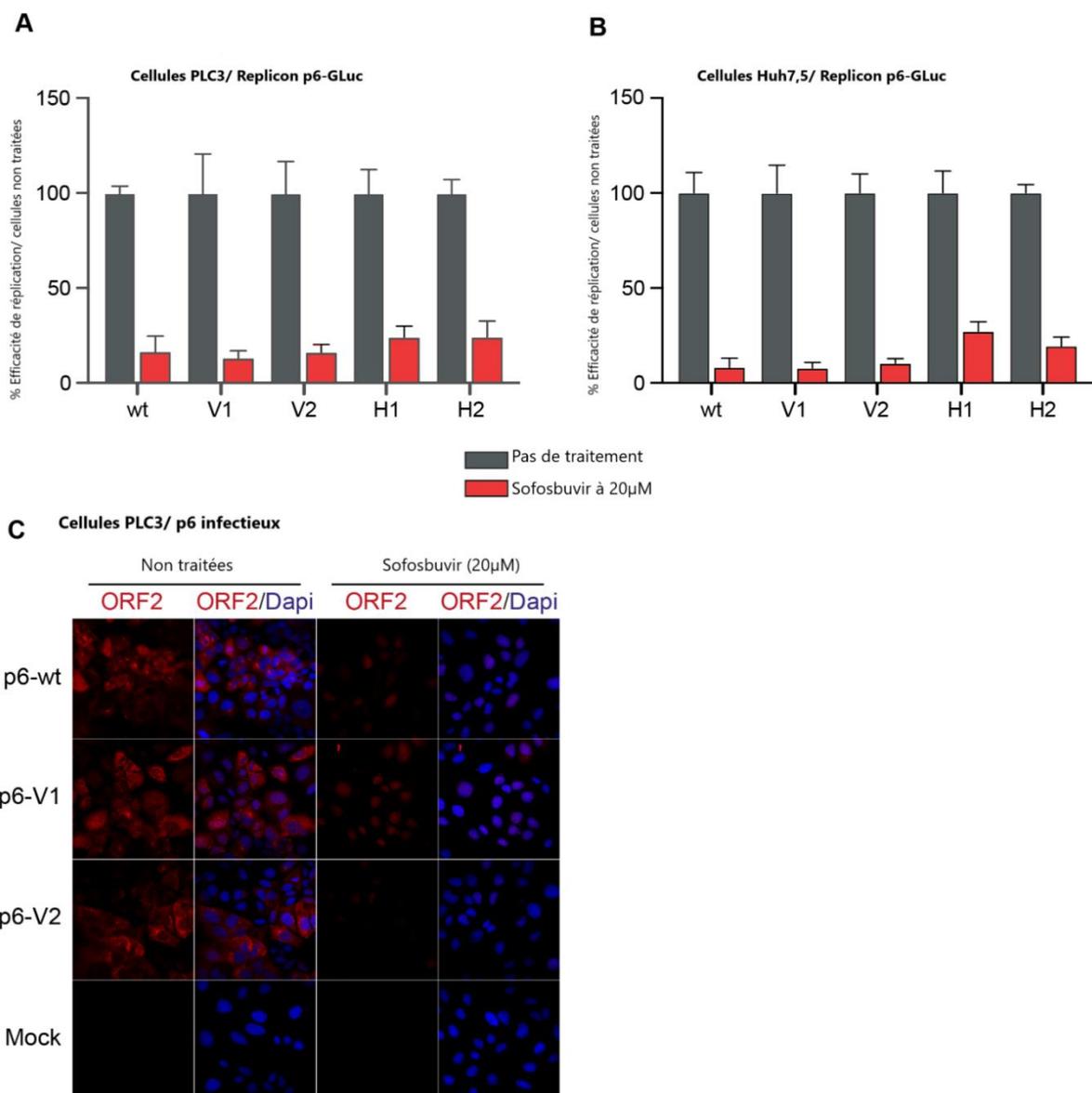
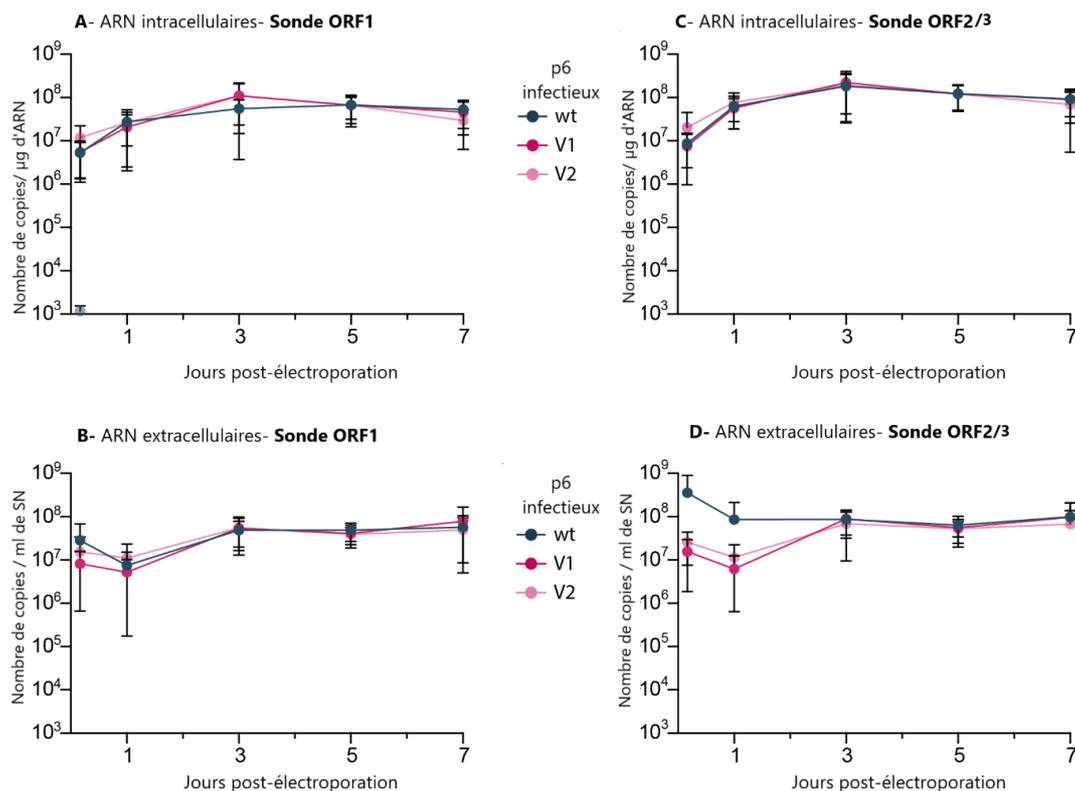


Figure 42: Inhibition de l'efficacité de la souche p6 infectieuse par le non de s sofosbuvir dans les cellules PLC3 et Huh-7.5.

Les cellules PLC3 (A) et Huh-7.5 (B) ont été transfectées par électroporation avec les différentes constructions p6-GLuc (V1, V2, H1, H2) ou le réplicon p6-wt-GLuc dans lequel l'ORF1 n'est pas étiquetée (wt). Quatre heures après électroporation, le sofosbuvir, un inhibiteur efficace de la polymérase, a été ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 20µM. Les activités luciférase ont été mesurées à 5 jpe. Les pourcentages de réplication ont été calculés par rapport à la construction correspondante non traitée. Les différentes expériences ont été menées trois fois avec trois réplicats techniques. (C) Activité inhibitrice du sofosbuvir sur la réplication de la souche HEV p6 en cellules PLC3. Trois jours après électroporation, les cellules PLC3/p6-wt, PLC3/p6-V1 et PLC3/p6-V2 ont été marquées avec un anticorps anti-ORF2 (1E6, Millipore, rouge). Les noyaux des cellules ont été marqués au Dapi (Bleu). Les images des IF ont été réalisées en microscopie confocale. Des cellules non électroporées (Mock) ont été utilisées comme contrôles négatifs.

### 1.2.2. Quantification des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV

L'impact des insertions des épitopes dans l'ORF1 a été évalué en quantifiant par RT-qPCR le nombre de copies des ARN génomiques et sous-génomiques dans les cellules PLC3 électroporées avec les constructions p6-wt, p6-V1 et p6-V2. L'ARN génomique a été quantifié grâce à l'utilisation de la sonde ORF1 qui s'hybride à une séquence spécifique localisée dans le domaine RdRp (Fig.39, Yin et al., 2017). Les ARN génomiques et sous-génomiques ont été quantifiés en utilisant la sonde ORF2/3 qui s'hybride au niveau de la superposition entre les cadres ouverts de lecture des ORF3 et ORF2 (Fig.39, Jothikumar et al., 2006). Les ARN intracellulaires et extracellulaires extraits à partir des cellules PLC3 électroporées avec les différentes constructions ont été quantifiés à différents temps post-électroporation (4h, 1 à 7 jours, Fig. 43).



**Figure 43: Quantification des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV p6 exprimant ou non avec l'épitope V5.**

Des cellules PLC3 ont été électroporées avec les souches p6 exprimant l'ORF1 non étiquetée (p6-wt = wt) ou l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 (p6-V1 = V1 ; p6-V2 = V2). La sonde ORF1 a permis de quantifier les ARN génomiques du HEV en revanche la sonde ORF2/3 s'hybride à la fois sur les ARN génomiques et sous-génomiques. A différents temps post-électroporation, les ARN totaux ont été extraits des cellules PLC3 (ARN intracellulaires) ou de leurs surnageants (ARN extracellulaires) puis quantifier par RT-qPCR. Les moyennes et écarts types des duplicats de 3 expériences menées indépendamment sont présentés pour chaque construction. **A-** Quantification des ARN intracellulaires avec la sonde ORF1. **B-** Quantification des ARN extracellulaires en utilisant la sonde ORF1. **C-** Quantification des ARN intracellulaires avec la sonde ORF2/3. **D-** Quantification des ARN extracellulaires en utilisant la sonde ORF2/3.

Concernant les ARN intracellulaires, le nombre de copies d'ARN génomiques, quantifié par la sonde ORF1, était équivalent pour les cellules PLC3/p6-wt, PLC3/p6-V1 et PLC3/p6-V2 tout au long de la cinétique (**Fig. 43A**). Nous avons fait la même observation pour les ARN génomiques et sous-génomiques, quantifiés par la sonde ORF2/3 (**Fig. 43C**). Néanmoins, le nombre de copies d'ARN génomiques et sous-génomiques (sonde ORF2/3) était globalement plus élevé que le nombre de copies d'ARN génomiques (sonde ORF1).

Concernant les ARN extracellulaires, les quantités d'ARN détectés par les sondes ORF1 et ORF2/3 étaient similaires (**Fig. 43B** et **43D**). De plus, les niveaux d'ARN génomiques et sous-génomiques étaient comparables entre les cellules électroporées avec la souche p6-wt et les constructions p6 étiquetées avec l'épitope V5. L'ensemble de ces résultats de RT-qPCR confirme que l'insertion des épitopes V5 dans la région HVR de l'ORF1 n'affecte pas la réplication virale et ne perturbe pas la sécrétion des ARN extracellulaires.

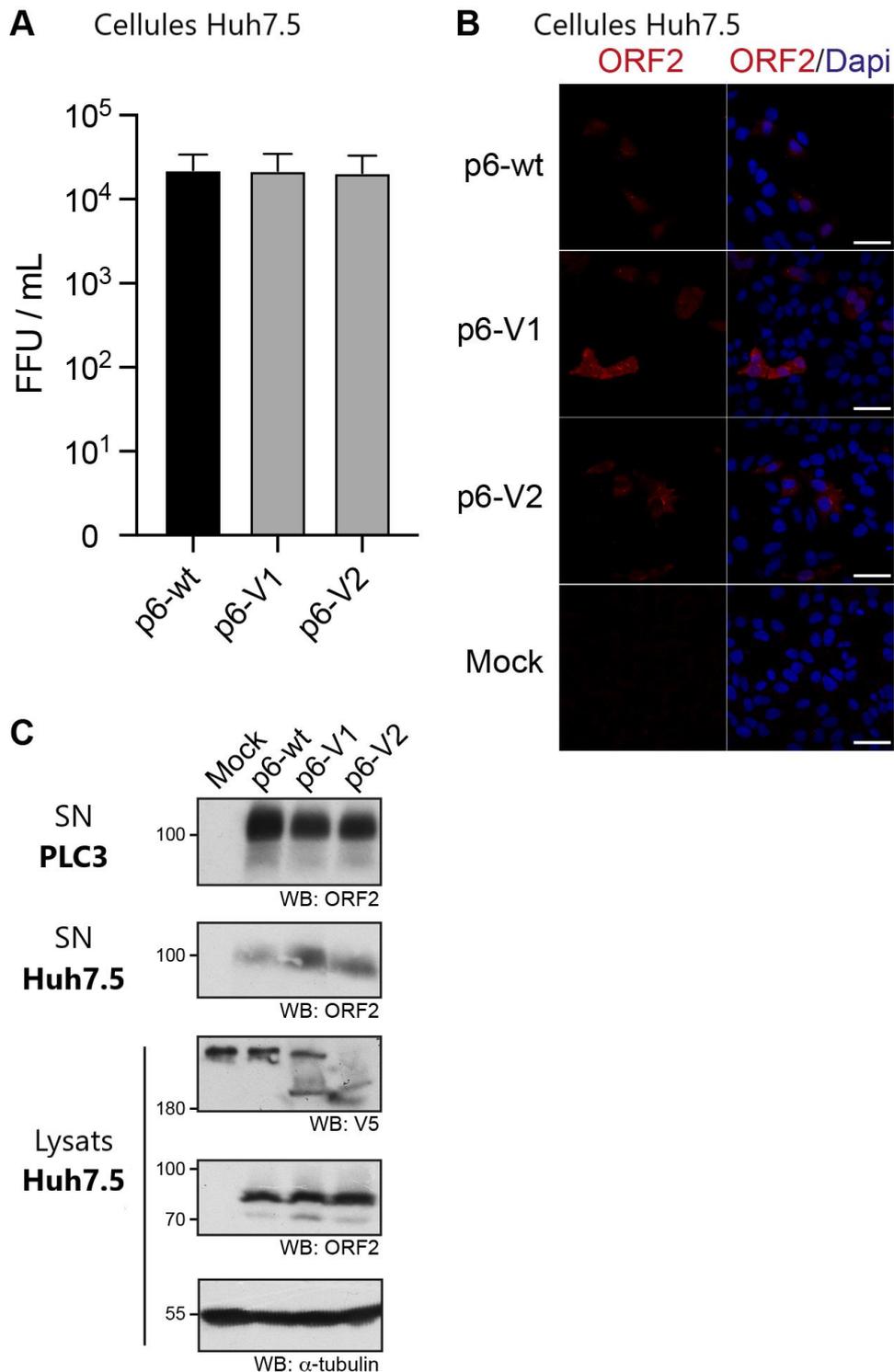
L'ensemble de ces résultats nous a ensuite encouragés à étudier l'infektivité du HEV exprimant l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5.

### 1.2.3. Etude de l'infektivité du HEV exprimant l'ORF1 étiquetée

Pour analyser si l'insertion des épitopes V1 et V2 dans l'ORF1 modifie la capacité du HEV à infecter des cellules, des cellules PLC3 ont été électroporées avec la souche p6 infectieuse sauvage (PLC3/p6-wt) et les souches p6 exprimant l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 (PLC3/p6-V1 ou PLC3/p6-V2). Les surnageants contenant les particules virales infectieuses ont été prélevés dix jpe et ont été utilisés pour infecter des cellules Huh-7.5. Trois jours après infection, les cellules Huh-7.5 ont été fixées puis marquées avec l'anticorps 1E6 qui reconnaît la protéine de capsid ORF2. Les cellules présentant un marquage fluorescent ORF2 ont été comptées pour calculer les titres infectieux. Les titres infectieux sont présentés dans la **Fig.44A**. De manière intéressante, les HEV exprimant l'ORF1 étiquetée avec un épitope V5 (p6-V1 et p6-V2) présentaient des titres infectieux semblables à celui de la souche p6-wt, indiquant que l'insertion des épitopes V5 n'affecte pas l'infektivité du virus.

L'analyse en microscopie confocale des cellules Huh-7.5 infectées par les constructions exprimant l'ORF1 étiquetée V5 a montré un marquage ORF2 similaire à celui de la construction non étiquetée

(Fig.44B). De même, l'analyse en WB de l'expression de l'ORF2 dans les lysats cellulaires (Fig.44C, lysats Huh-7.5) et les SN (Fig.44C, SN Huh-7.5) des cellules Huh-7.5 infectées ainsi que dans les SN de cellules PLC3 électroporées (Fig.44C, SN PLC3) a montré un même niveau d'expression et un même profil de l'ORF2 entre les constructions étiquetées et la souche p6 sauvage.



**Figure 44: Etude de l'infectivité des HEV étiquetés avec I**  
 Les cellules Huh-7.5 ont été infectées avec les surnageants des cellules PLC3/p6-wt, ou des PLC3/p6-V1 (V1) ou des PLC3/p6-V2 (V2). **A-** Quantification des titres infectieux. Les moyennes et les écarts types des triplicats avec

trois expériences menées indépendamment sont présentés. **B-** Analyse par microscopie confocale des cellules Huh-7.5 infectées et marquées avec l'anticorps anti-ORF2 1E6. **C-** Etude de l'impact des insertions V1 et V2 sur l'expression de la protéine ORF2. SN PLC3 : surnageants des cellules PLC3 électroporées avec les différentes constructions. SN Huh-7.5 : surnageants des cellules Huh-7.5 infectées avec les surnageants des cellules PLC3 électroporées.

## 2. Etude de la maturation de la réplicase virale

Une fois que l'ensemble de nos résultats a révélé que l'insertion de l'épitope V5 dans la région HVR ne perturbait ni la capacité répliquative ni l'infectivité du HEV, nous avons continué l'étude de la maturation de la réplicase virale dans trois systèmes différents : le système d'expression hétérologue, le système réplicon et le système infectieux.

### 2.1.#

---

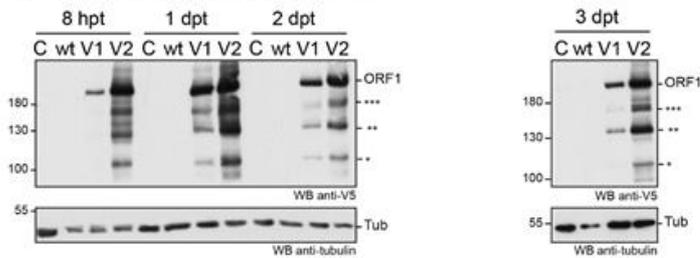
Des cellules H7-T7-IZ exprimant constitutivement la polymérase T7 ont été transfectées avec l'ADN des constructions pTM-ORF1-V1 ou pTM-ORF1-V2, qui hébergent l'ORF1 où est inséré l'épitope V5 dans l'HVR, ou le vecteur pTM-ORF1 contenant l'ORF1 non étiquetée. Les cellules ont été lysées à différents temps post-transfection (8, 24, 48 et 72 heures post-transfection ou hpt) puis les lysats ont été analysés en WB. Une bande majeure migrant à un poids moléculaire supérieur à 180kDa et correspondant à la protéine ORF1 de pleine longueur mais, également d'autres bandes de tailles inférieures comprises entre 95 et 170 KDa, qui pourraient correspondre à des produits de clivage ont été détectées dès 8 hpt (**Fig.45 A**).

Des cellules PLC3 ont été transfectées par électroporation avec les réplicons p6-wt-GLuc, p6-V1-GLuc ou p6-V2-GLuc puis lysées à différents temps post-électroporation (4, 8 et 12 heures (hpe) et 1, 3 jpe). Les résultats de l'analyse des lysats en WB ont révélé la détection d'une bande intense d'un poids moléculaire supérieur à 180KDa, qui correspond à la taille attendue de la protéine ORF1 de pleine longueur (**Fig.45 B**). De plus, cinq autres bandes de poids moléculaires inférieurs (comprises entre 120 et 160kDa) ont été également observées à des temps précoces et pourraient correspondre à des produits de clivage de la réplicase virale.

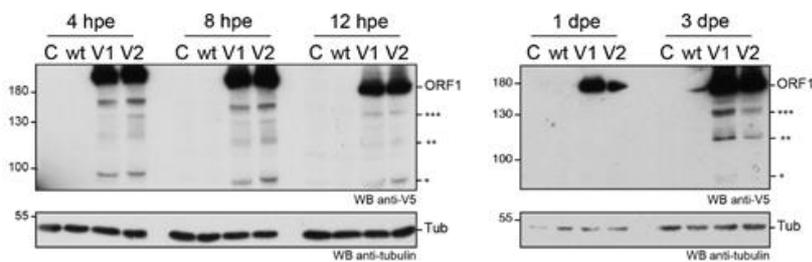
Des cellules PLC3 ont été transfectées par électroporation avec les souches infectieuses p6-wt, p6-V1 et p6-V2 et leurs profils d'expression de l'ORF1 (**Fig. 45C**) ont été comparés avec les profils obtenus en système d'expression hétérologue et système réplicon (**Fig.45 A et B**). Conformément aux précédentes observations, la bande la plus intense a été observée à un poids moléculaire supérieur à 180 kDa tout au long de la cinétique. Par ailleurs, des produits de clivage potentiels ont été également identifiés à des tailles inférieures comprises entre 95 et 180 kDa.

L'analyse de la cinétique d'expression de la protéine ORF1 dans le système infectieux indique que le signal correspondant à l'ORF1 est globalement plus intense à des temps précoces (4 hpe) par rapport aux temps plus tardifs (15 et 25 jpe). Néanmoins, la détection de l'ORF1 à 25 jpe suggère que le HEV exprimant la réplicase étiquetée avec l'épitope V5 est capable d'accomplir un cycle infectieux complet (Fig.45C)

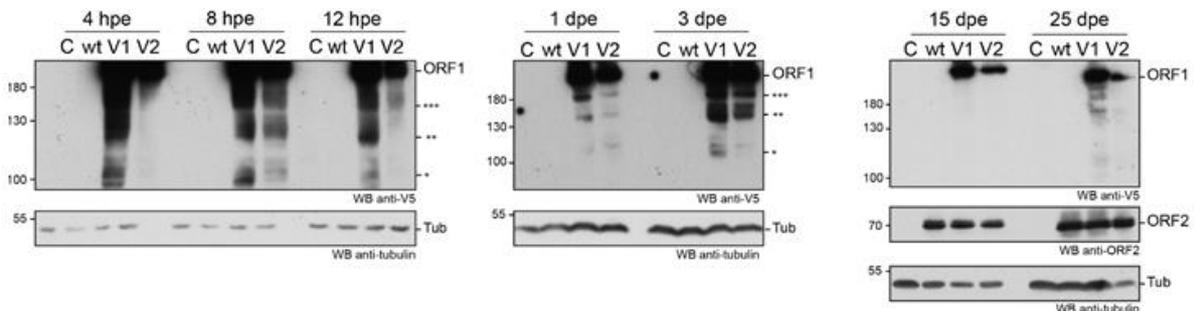
### A Système d'expression hétérologue



### B Réplicon p6-GLuc



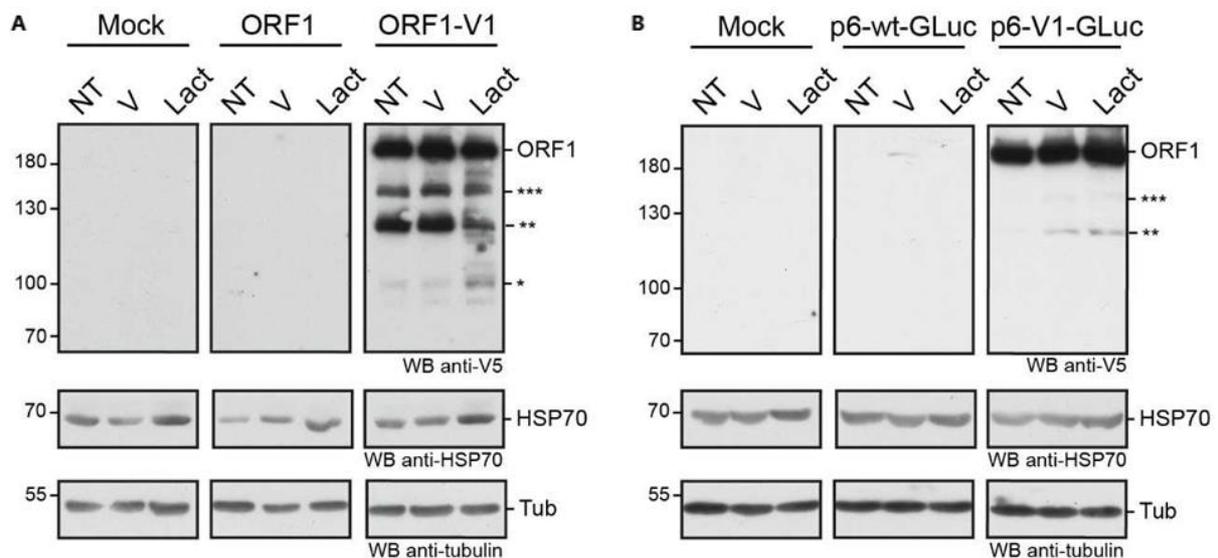
### C Système p6 infectieux



**Figure 45: Cinétique de l'expression de la protéine ORF1 cellulaires.**

**A-** Expression de la protéine ORF1 dans le système hétérologue. Des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec un plasmide exprimant la protéine ORF1 non étiquetée de type sauvage (wt) ou l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 inséré dans 2 sites différents de l'HVR (V1 ou V2). Les cellules non transfectées ont été utilisées comme contrôles (C). Les lysats cellulaires totaux ont été collectés à 8, 24, 48 et 72 heures post-transfection. **B-** Expression de la protéine ORF1 dans le système réplicon p6-GLuc. Des cellules PLC3 ont été électroporées avec un réplicon exprimant la protéine ORF1 non étiquetée (wt) ou l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 (V1 ou V2). Les lysats cellulaires ont été collectés à 4, 8, 12 heures post-électroporation et 1 et 3 jpe. Les cellules non électroporées ont été utilisées comme contrôles (C). **C-** Expression de la protéine ORF1 dans le système infectieux. Les cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN de la souche infectieuse p6 exprimant la protéine ORF1 non marquée de type sauvage (wt) ou l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 (V1 ou V2). Les lysats cellulaires totaux ont été analysés à 4, 8, 12 hpe et 1, 3, 15 et 25 jpe. Les cellules non électroporées ont été utilisées comme contrôles (C).

Afin d'écarter l'hypothèse qu'une dégradation de l'ORF1 soit à l'origine de la formation des bandes mineures observées précédemment, nous avons étudié l'effet de l'inhibition du protéasome à la fois dans le système d'expression hétérologue mais aussi dans le système réplicon (**Fig. 46**). Après un traitement avec la lactacystine (30µM pendant 8 heures), les extraits protéiques totaux des cellules H7-T7-IZ exprimant l'ORF1 non étiquetée ou l'ORF1-V1, et des cellules PLC3 électroporées avec les réplicons p6-wt-GLuc ou p6-V1-GLuc (**Fig.46 B**) ont été analysés en WB. La protéine HSP70 a été choisie pour attester de l'activité inhibitrice de la lactacystine sur le protéasome; en effet, l'HSP70 s'accumule lorsque le protéasome est inhibé (Dooha et *al.*, 1999). De manière générale, l'intensité des bandes mineures de l'ORF1 était la même dans les cellules non traitées et traitées par la lactacystine, alors que l'intensité de l'HSP70 augmentait légèrement (**Fig. 46A et B**). Ces résultats suggèrent que les bandes mineures de l'ORF1 ne sont probablement pas le résultat d'une dégradation de l'ORF1 par le protéasome mais plutôt le résultat d'une maturation de cette protéine au sein de la cellule hôte.



**Figure 46: Traitement des cellules exprimant l'ORF1 du HEV**  
**A-** Des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec le vecteur exprimant l'ORF1 non étiquetée (ORF1) ou l'ORF1 portant l'épitope V5 (ORF1-V1). **B-** Des cellules PLC3 ont été transfectées par électroporation avec les réplicons p6-GLuc exprimant l'ORF1 non étiquetée (p6-wt-GLuc) ou l'ORF1 étiquetée avec l'épitope V5 (p6-V1-GLuc). Après traitement avec un inhibiteur spécifique du protéasome (lactacystine, 30µM) durant 8 heures, les lysats cellulaires totaux ont été collectés puis analysés en WB. L'anticorps anti-V5 a été utilisé pour détecter l'ORF1. Un anticorps anti-HSP70 a permis de vérifier l'inhibition du protéasome par la lactacystine. Un anticorps dirigé contre la tubuline a été inclus pour contrôler qu'une quantité équivalente de protéines ait été déposée dans chaque puits. NT : cellules non traitées ; V : cellules traitées avec du méthanol (utilisé pour diluer la lactacystine) ; Lact : cellules traitées avec la lactacystine.

L'ensemble de nos résultats concernant la maturation de la protéine ORF1 portant l'épitope V5 indique que la réplicase virale de pleine longueur est majoritairement exprimée dans les trois systèmes

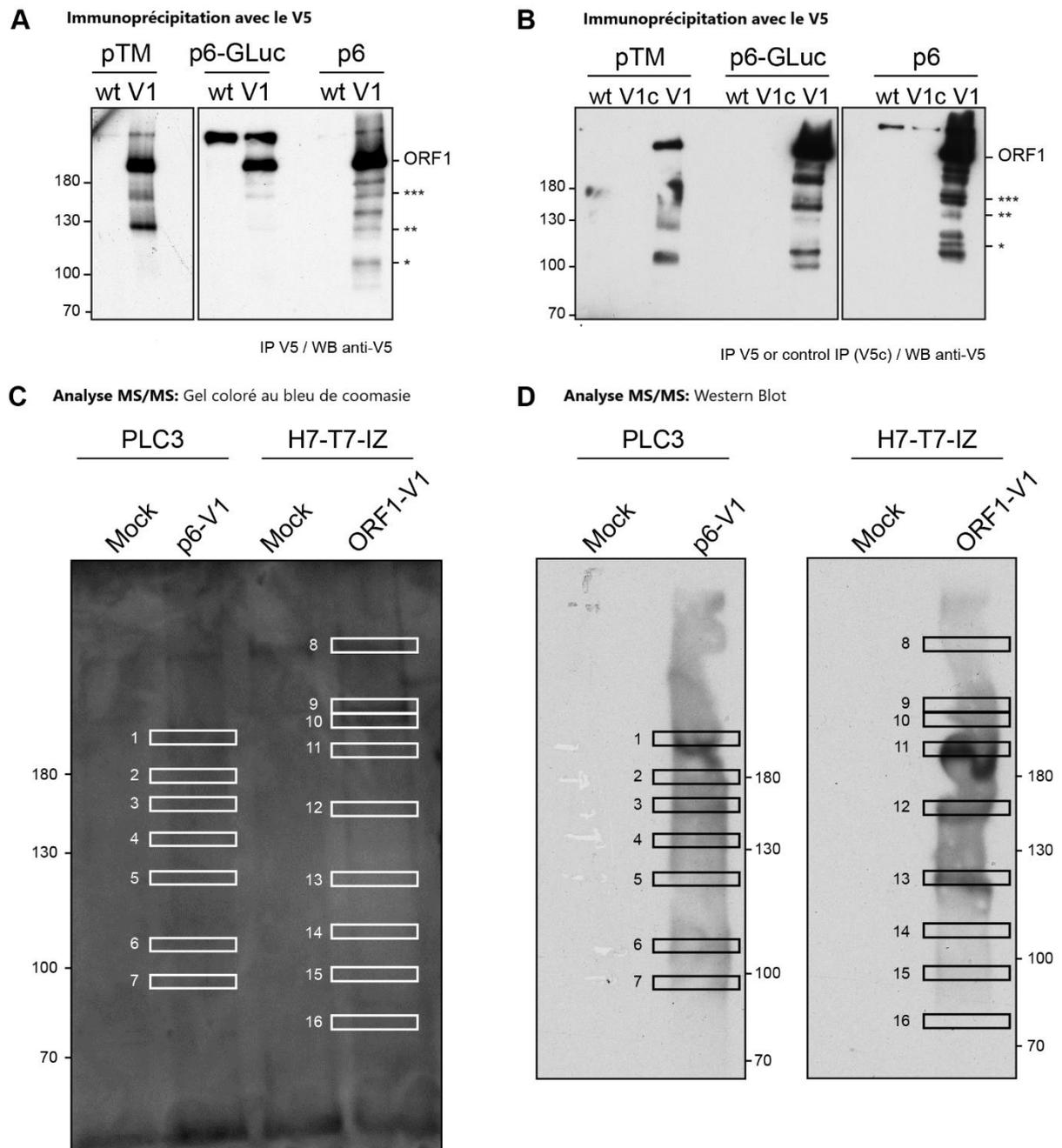
étudiés. Cette protéine complète est accompagnée de nombreuses formes clivées, présentes en quantité plus faible et dont le profil de migration diffère légèrement d'un système à un autre. Le nombre le plus élevé de formes clivées de la réplicase virale a été observé dans le système infectieux.

### 2.3. Analyse par spectrométrie de masse de la réplicase virale du HEV

Puisque l'identification des séquences protéiques des produits de clivage de la protéine ORF1 pourrait ouvrir la voie vers l'identification de protéases virales ou cellulaires potentiellement impliquées dans la maturation de cette protéine, des séries d'immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant le système d'expression hétérologue et le système infectieux. Les premiers essais d'identification de séquences protéiques à partir de protéines immunoprécipitées avec des anticorps anti-V5 ou anti-HA couplés à des billes de protéine-G (données non montrées) n'ont pas permis d'identifier de bandes spécifiques à l'ORF1 du fait d'un fort bruit de fond présent au niveau des gels de polyacrylamide colorés au bleu colloïdal. Par la suite et afin de résoudre ces problèmes, des microbilles magnétiques (Dynabeads) à surface active (Epoxy) permettant une liaison covalente des anticorps, ont été utilisées. Ces microbilles magnétiques réduisent la variabilité et fournissent des résultats plus fiables et reproductibles grâce à leur surface Epoxy qui minimise les liaisons non spécifiques. Des extraits protéiques totaux provenant de cellules H7-T7-IZ transfectées avec la construction ORF1-V1 ou de cellules PLC3 transfectées par électroporation avec la construction p6-V1 ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope V5 (**Fig.47**). Un profil identique à celui obtenu précédemment en utilisant les billes de protéines G a été observé : la bande qui correspond à la forme complète de la réplicase virale et d'autres bandes qui correspondent potentiellement à des produits de clivage de l'ORF1. Le bruit de fond observé antérieurement a été atténué et l'analyse des séquences par spectrométrie de masse a été réalisée (**Fig.47**). L'ensemble des résultats de la spectrométrie de masse a révélé une couverture peptidique de l'ordre de 35% de la protéine ORF1 exprimée dans le système hétérologue et de 38% dans le système infectieux. Cependant, la couverture peptidique des bandes, qui correspondent potentiellement à des produits de clivage, a été très faible dans les différents systèmes de culture et nous n'avons pas réussi à identifier avec suffisamment de robustesse les extrémités des séquences aminées de ces différentes bandes (**Tableau.6**). Néanmoins, l'extrémité N-terminale des produits de clivage semblait plus stable et correspondrait à l'extrémité N-terminale de la protéine de pleine longueur.

La comparaison des profils de détection de la protéine ORF1 portant l'épitope V5 exprimées dans les différents systèmes de culture a été réalisée après immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps dirigé contre l'épitope V5 (**Fig.47A et B**). Plusieurs bandes minoritaires similaires à la fois dans le système

hétérologue, système réplicon et le système infectieux ont été détectées (étoiles). Le nombre de bandes minoritaires était plus important lorsque l'ORF1 était exprimée dans le système infectieux.



**Figure 47: Analyse par spectrométrie de masse de la réplicase virale du H E V immunoprécipitée avec anti-V5.**

Des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec la construction ORF1-V1. De même, des cellules PLC3 ont été électroporées avec la souche p6-V1. Des cellules non transfectées ou non électroporées ont été utilisées comme contrôles (Mock). Les lysats totaux de ces cellules ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-V5 (A+B+C+D). Ensuite, l'éluat a été déposé à la fois sur un gel pour coloration au bleu colloïdal (C) et sur un gel SDS-PAGE pour réaliser un WB (D). Suite à un alignement précis du WB et du gel coloré au bleu colloïdal, les bandes sélectionnées ont été coupées du gel, digérées par la trypsine et analysées en chromatographie liquide à l'échelle nanométrique couplée à la spectrométrie de masse. Des rectangles blancs et noirs mettent en évidence les bandes d'intérêt numérotées qui ont été analysées.

**Tableau 6: Résultat par spectrométrie de masse de la réplicase virale de HEV immunoprécipitée avec l'anticorps anti-V5 dans différents systèmes de culture cellulaire.**

(\*) Les bandes 8 à 10 étaient visibles sur le gel coloré au bleu colloïdal mais n'ont pas été détectées par l'anticorps anti-V5 en WB.

Nombre de bande/ construction	Couverture (%)	Nombre de peptides identifiés
1 / p6-V1	38	129
2 / p6-V1	32	87
3 / p6-V1	31	68
4 / p6-V1	32	83
5 / p6-V1	30	68
6 / p6-V1	20	48
7 / p6-V1	18	41
8* / ORF1-V1	39	125
9* / ORF1-V1	55	321
10* / ORF1-V1	71	672
11 / ORF1-V1	35	195
12 / ORF1-V1	40	185
13 / ORF1-V1	31	102
14 / ORF1-V1	19	75
15 / ORF1-V1	17	63
16 / ORF1-V1	17	66

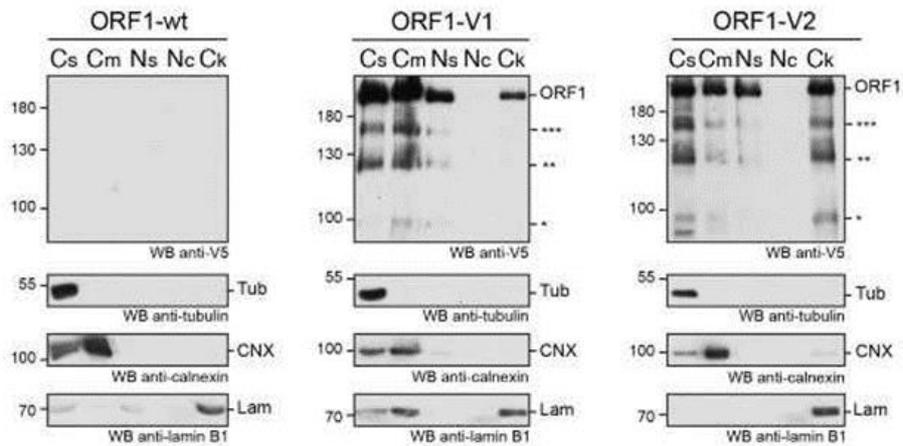
### 3. Localisation subcellulaire de la réplicase virale

#### 3.1. Détection de la réplicase virale dans les fractions subcellulaires

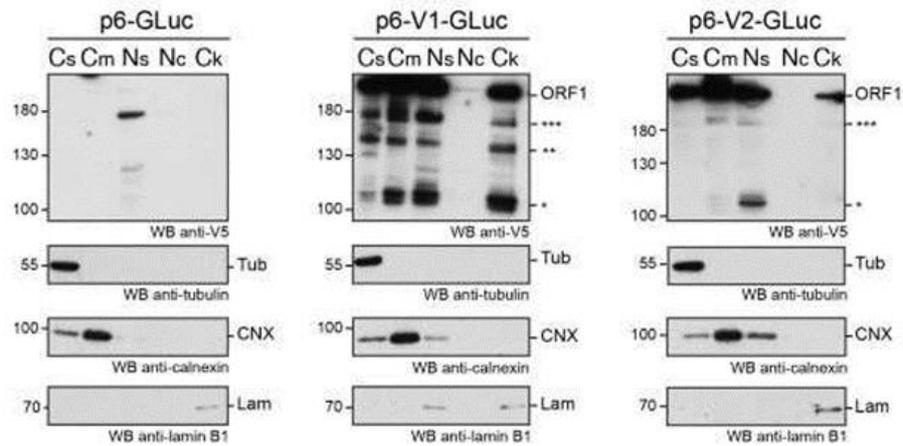
Un fractionnement cellulaire a été réalisé afin d'appréhender la localisation subcellulaire de la réplicase virale du HEV (**Fig.48**) en utilisant un kit de fractionnement des protéines cellulaires (Fisher Scientific) permettant d'isoler et d'enrichir les protéines à partir de compartiments cellulaires spécifiques. Les protéines cytoplasmiques (**Cs**), membranaires (**Cm**), nucléaires solubles (**Ns**), nucléaires liées à la chromatine (**Nc**) et cytosquelettiques (**Ck**) ont ainsi été séparées et extraites. Ces extraits cellulaires provenant des différents systèmes ont été analysés en WB.

Une bande correspondant à la forme complète de l'ORF1 a été retrouvée au niveau des fractions Cs et Cm ainsi qu'au niveau des fractions Ns et Ck et ceux-ci dans les trois systèmes d'expression utilisés : dans les cellules H7-T7-IZ exprimant l'ORF1 étiquetée avec le V5 de manière hétérologue (**Fig. 48A**), dans les cellules PLC3 exprimant les réplicons p6-GLuc (**Fig. 48B**) et aussi dans les cellules PLC3 exprimant la souche infectieuse HEV-p6 (**Fig. 48C**). La fraction liée à la chromatine n'a présenté qu'un faible signal V5 dans tous les systèmes d'expression. De plus, des bandes de plus petit poids moléculaire apparent, migrant entre 100 et 180kDa (déjà détectées dans la **Fig. 45**), qui pourraient correspondre à des produits de clivage potentiels de la polyprotéine ORF1, ont été détectées dans toutes les fractions, à l'exception de la fraction liée à la chromatine nucléaire.

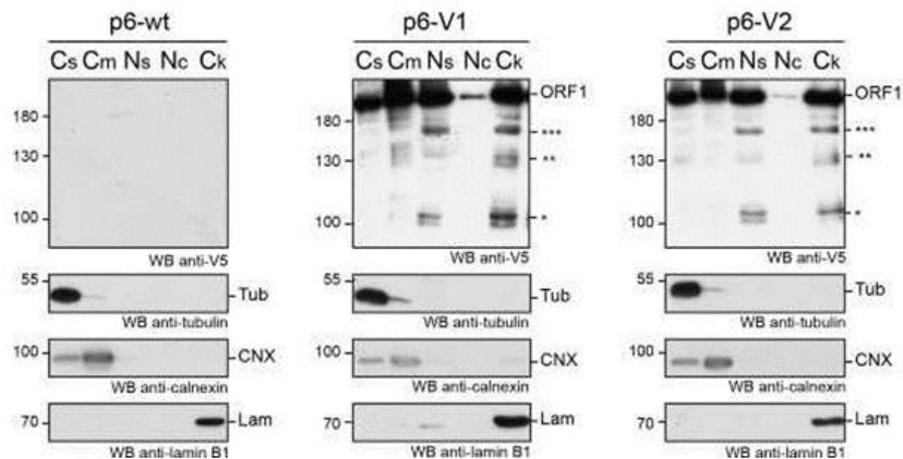
**A Système d'expression hétérologue**



**B Réplicon p6-GLuc**



**C Système p6 infectieux**



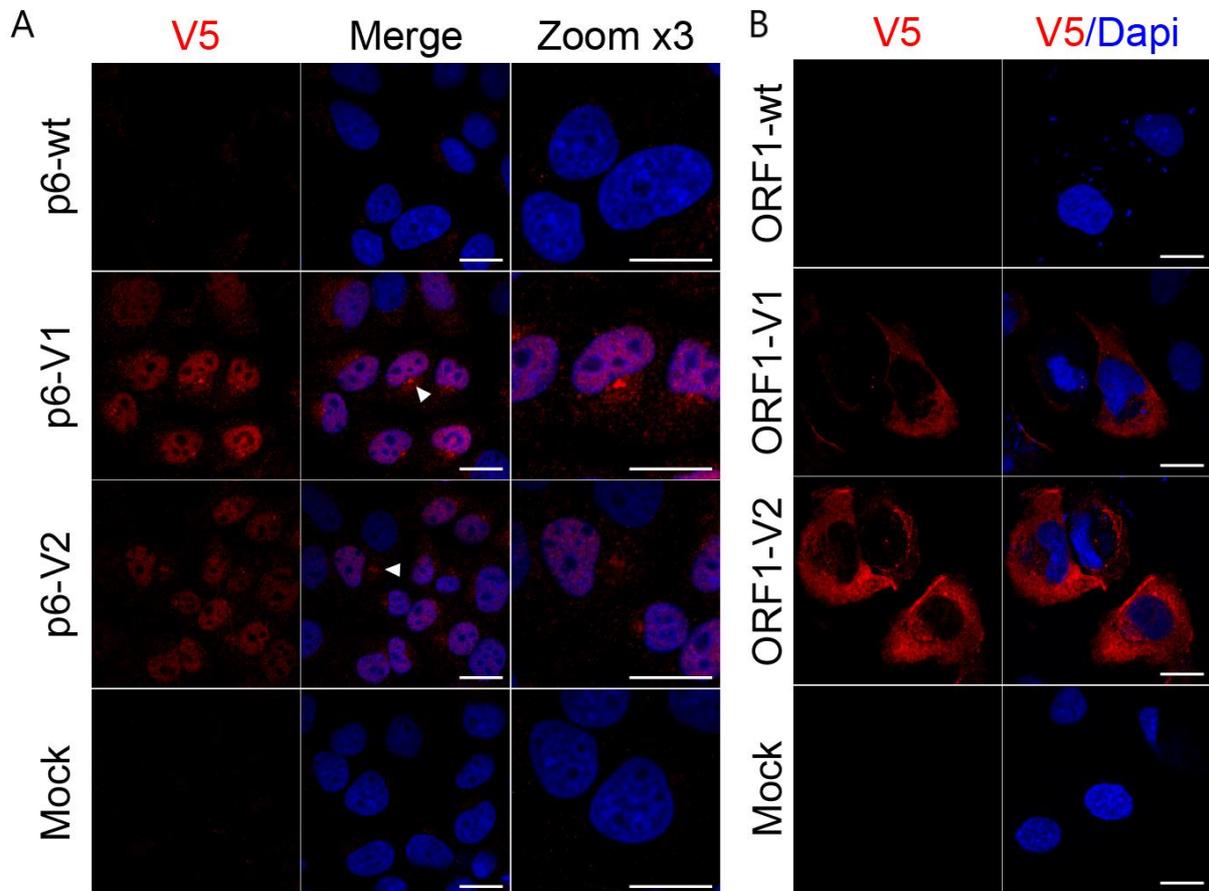
**Figure 48 : Détection de la p6-V5 dans les différentes fractions subcellulaires des épi topes dans différents systèmes de culture.**

**A-** Des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec les constructions ORF1-V1, ORF1-V2 ou ORF1-WT non étiquetée. **B-** Des cellules PLC3 ont été transfectées avec les constructions p6-V1-GLuc, p6-V2-GLuc ou p6-GLuc. **B-** Des cellules PLC3 ont été transfectées avec les constructions p6-V1, p6-V2 ou p6-wt. Cs : extraits cytoplasmiques, Cm : extraits membranaires, Ns : extraits nucléaires solubles, Nc : extraits nucléaires liées à la chromatine, Ck : extraits cytosquelettiques. Les différentes fractions ont été analysées en WB à l'aide des anticorps anti-V5, anti-tubuline (Tub), anti-lamine (Lam) et anti-calnexine (CNX).

### 3.2 Immunolocalisation de la réplicase virale dans la cellule hôte

#### 3.2.1. Localisation nucléaire et cytoplasmique de la réplicase virale

Nous avons ensuite réalisé des analyses d'immunolocalisation de l'ORF1 exprimée en systèmes infectieux et hétérologue, à l'aide de l'anticorps anti-V5 (**Fig. 49**). L'analyse des cellules PLC3/p6-V1 et PLC3/p6-V2 a montré un marquage nucléaire et cytoplasmique de la réplicase (**Fig. 49A**). De plus, dans certaines cellules, le marquage de la réplicase montrait des spots fluorescents intenses situés en périphérie du noyau appelés « pépites » au laboratoire. Dans le système d'expression hétérologue, l'ORF1 a essentiellement montré une localisation cytoplasmique (**Fig. 49B**).



**Figure 49: Immunolocalisation de l'ORF1 dans la cellule hôte.**

Des cellules PLC3 ont été électroporées avec la souche infectieuse exprimant l'ORF1 non étiquetée, les souches p6-V1 ou p6-V2 (A) et des cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec le vecteur ORF1-wt, ou avec les constructions ORF1-V1 et ORF1-V2 (B). Les cellules ont été fixées (PFA 3%) et marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope V5. La barre d'échelle correspond à 20  $\mu$ m. Rouge = V5, Bleu = noyaux

### 3.2.2. Etude de la co-distribution de l'ORF1 avec les autres protéines virales, ORF2 et ORF3, dans la cellule hôte

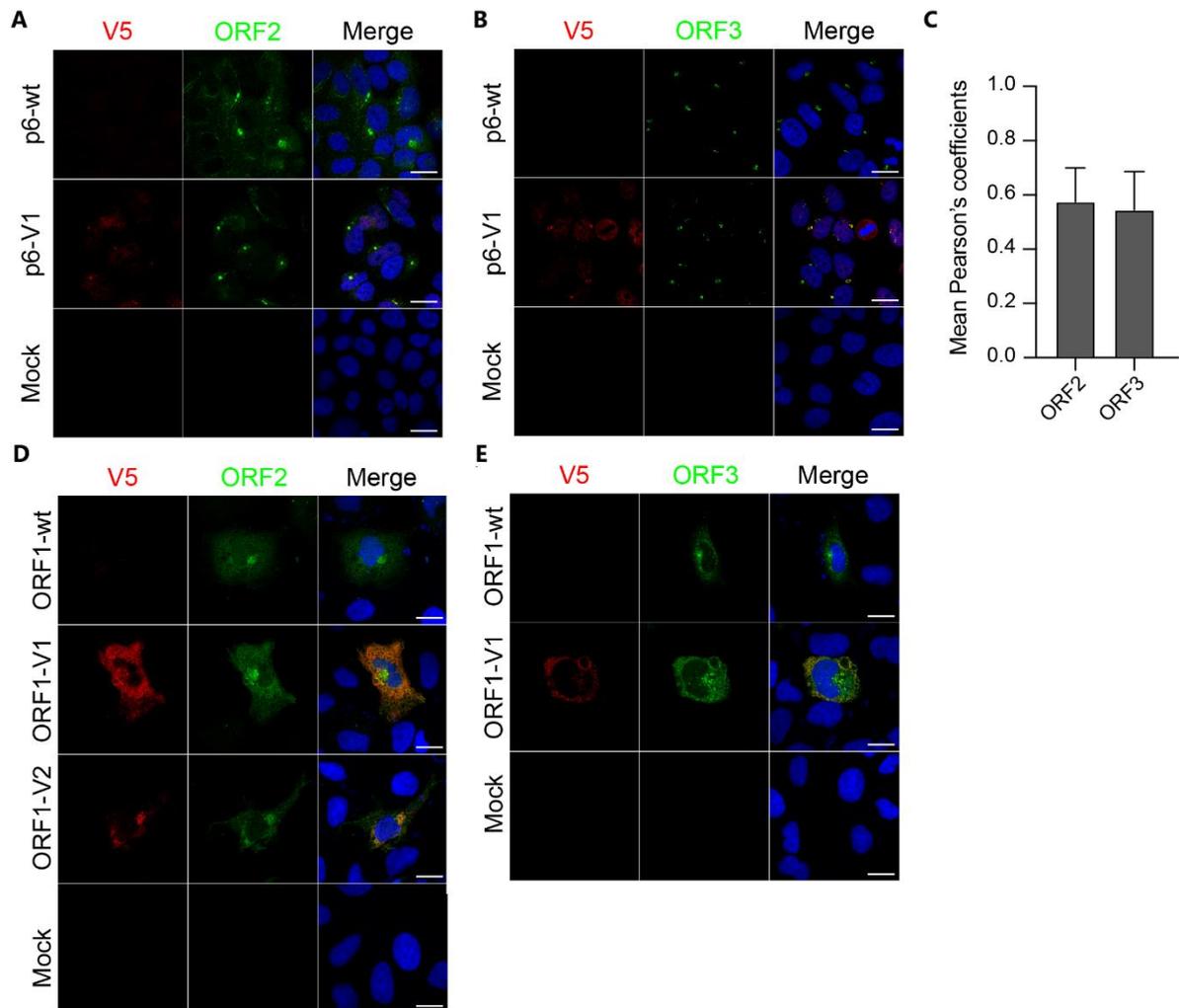
Nous avons ensuite étudié la co-distribution de l'ORF1 avec les protéines ORF2 et ORF3. Pour cela, des cellules PLC3 ont été électroporées avec chacune des différentes constructions (p6-wt, p6-V1, p6-V2). Après trois jours, les cellules ont été fixées et doublement marquées avec l'anticorps anti-V5 et un anticorps dirigé contre l'ORF2 ou l'ORF3, puis analysées en microscopie confocale (**Fig. 51A et B**). Nous avons également transfecté des cellules H7-T7-IZ avec les constructions ORF1 et un plasmide pTM codant l'ORF2 et l'ORF3. Huit heures post-transfection, les cellules ont été fixées et marquées comme décrit précédemment (**Fig. 51D et E**).

Dans le système infectieux et dans les cellules PLC3 exprimant le p6-V1 ou le p6-V2 (**Fig. 51A**), le signal fluorescent correspondant à l'expression de l'ORF1 était à la fois nucléaire et cytoplasmique et particulièrement concentré en une « pépite » très dense qui était aussi marquée avec l'anti-ORF2. Ces pépites étaient également marquées avec l'anti-ORF3 (**Fig. 51B**). Ces sites pourraient correspondre aux sites d'assemblage ou de réplication du HEV. Le calcul des coefficients de corrélation de Pearson (PCC) a été effectué sur la zone périnucléaire « pépite » du marquage V5 avec la protéine ORF2 et la protéine ORF3. Les moyennes des PCC étaient de 0,58 ... 0,10 entre l'ORF1 et l'ORF2 et de 0,55 ... 0,12 entre l'ORF1 et l'ORF3.

Dans les cellules H7-T7-IZ exprimant l'ORF1-V1 ou ORF1-V2 (**Fig. 51D**), le signal fluorescent correspondant à l'expression de l'ORF1 était faiblement nucléaire et aussi cytoplasmique avec une abondance en zone périnucléaire induisant une déformation nucléaire. De plus, dans les cellules H7-T7-IZ co-transfectées avec les constructions ORF1-V1 ou ORF1-V2 et la construction ORF2/ORF3, les deux protéines virales ORF2 et ORF3 ont été retrouvées au niveau de cette zone périnucléaire riche en protéine ORF1.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la protéine ORF1, ORF2 et ORF3 ont été retrouvées à proximité du noyau à la fois dans le système hétérologue et dans le système infectieux.

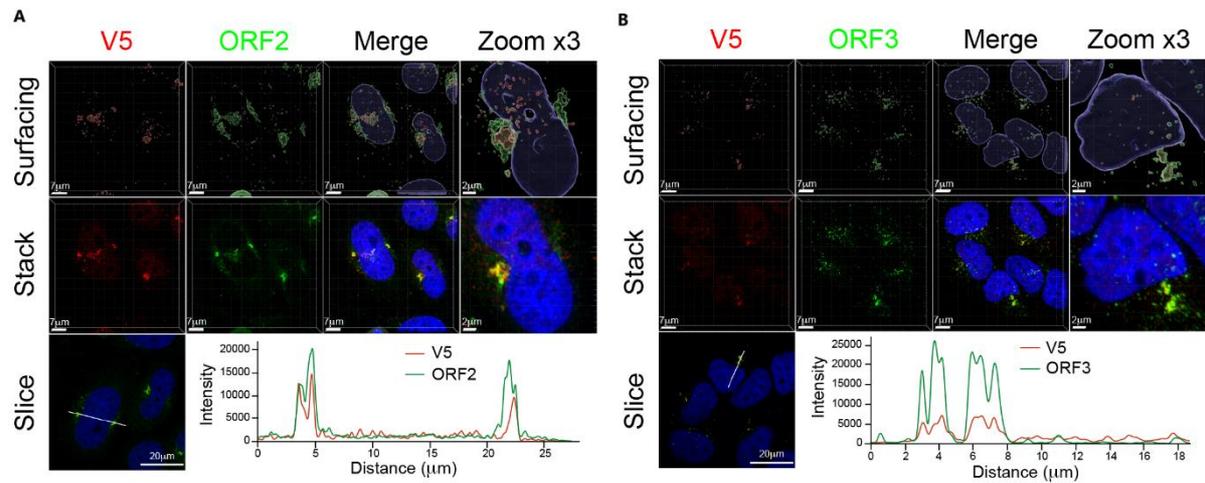
Il est intéressant de noter qu'en système hétérologue d'expression de l'ORF1 en l'absence de l'ORF2/3, l'ORF1 présentait essentiellement un marquage de type cytoplasmique alors qu'en présence de l'ORF2/3, celle-ci montrait un marquage pépite semblable à celui retrouvé dans le cas de système infectieux.



**Figure 50: Co-immunolocalisation de la réplicase virale avec les protéines virales ORF2 et ORF3 dans la cellule hôte dans le système infectieux et dans le système hétérologue.**

**A+B-** Des cellules PLC3 ont été électroporées avec la souche p6 infectieuse exprimant l'ORF1 non étiquetée ou avec les souches p6-V1 ou p6-V2. Trois jours post-électroporation, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope V5 et l'ORF2 ou l'ORF3. **C** – Le calcul des coefficients de corrélation de Pearson (PCC) a été réalisé sur une zone d'intérêt nommée pépite localisée au niveau de la zone périnucléaire. Un nombre minimum de 30 cellules a été utilisé pour calculer les valeurs moyennes de PCC. **D+E-** Des cellules H7-T7-IZ ont été co-transfectées avec le vecteur pTM exprimant l'ORF1 étiquetée ou non et le plasmide pTM exprimant les protéines ORF2 et ORF3. Huit heures post-transfection, les cellules ont été fixées et marquées avec l'anticorps anti-V5 (A), l'anti-ORF2 ou l'anti-ORF3. Les cellules ont été analysées par microscopie confocale. La barre d'échelle correspond à 20  $\mu$ m. Rouge = V5, Vert= ORF2 ou ORF3, Bleu = noyaux

Des analyses plus poussées par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/p6-V1 immuno-marquées avec l'anti-ORF2 (1E6) ou l'anti-ORF3 et l'anti-V5, ont montré un recouvrement total des intensités de fluorescence de l'ORF1 à la fois avec l'ORF2 (**Fig. 51A**) et l'ORF3 (**Fig. 51B**).



**Figure 51: Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/p6-V1 marquées avec les anticorps anti-V5 et anti-ORF2 (A) ou anti-ORF3 (B).**

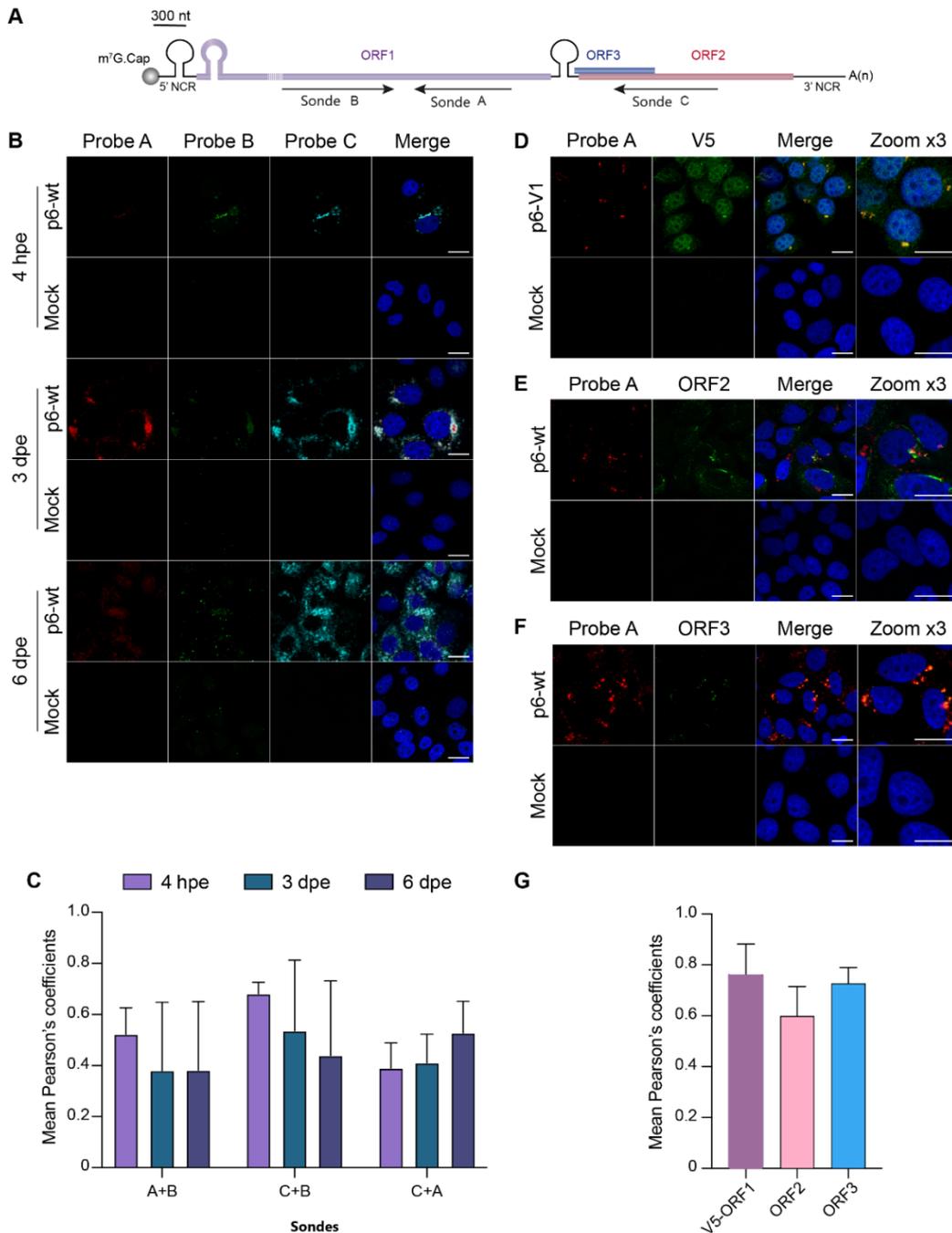
En haut (Surfacing) est montré le rendu volumique des z-stacks en utilisant le logiciel Imaris afin de mieux montrer les sous-structures colorées. Au milieu (Stack), les z-stacks sont visualisés. En bas (Slice), les graphes montrent les intensités de fluorescence des marquages ORF1/ ORF2 et ORF1/ ORF3 mesurées dans la région d'intérêt mise en évidence par la ligne blanche dans l'image montrée en bas à gauche. Les barres d'échelle sont représentées sur chaque image. L'ORF1 est en rouge, l'ORF2 et l'ORF3 sont en vert, et les noyaux en bleu.

### 3.2.3. Etude de la distribution des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV dans la cellule hôte par hybridation *in situ* (RNAscope®)

Afin de localiser les sites de réplication du HEV, la technologie hautement sensible appelée RNAscope® a été mise en place dans notre équipe. Trois sondes ont été conçues pour s'hybrider spécifiquement aux brins d'ARN positif et négatif du HEV (**Fig. 52A**). Les sondes A et C ciblent respectivement le brin positif de l'ARN HEV génomique et sous-génomique (nommés ARNg(+)) et ARNsg(+)). La sonde B cible le brin négatif de l'ARN génomique (nommé ARNg(-)). Des cellules PLC3 électroporées avec le p6-wt ont été fixées à 4 heures, 3 et 6 jours post-électroporation puis soumises à une hybridation *in situ* en utilisant les sondes A, B et C de manière séquentielle. Très tôt (4 hpe) après l'électroporation des cellules avec p6-wt, un signal fluorescent a été détecté pour chacune des 3 sondes à proximité du noyau (**Fig. 52B**). En effet, une importante colocalisation des ARNg(-) (sonde B) avec les ARNsg(+) (sonde C) a été retrouvée ( $PCC_{B+C} = 0,68 \dots 0,05$ ). Néanmoins, une colocalisation partielle a été retrouvée entre ces 2 sondes (B et C) et l'ARNg(+) (sonde A,  $PCC_{A+B} = 0.52 \dots 0.10$ ,  $PCC_{C+A} = 0.39 \dots 0.10$ ). Trois jours post-électroporation, les marquages des ARNg et sg (+) (sondes A et C) se sont élargis davantage tout autour des noyaux des cellules infectées. En revanche, le marquage correspondant à ARNg(-) (sonde B) apparaissait plus condensé dans la région périnucléaire. A six jours post-électroporation, les marquages des ARNg et sg (+) (sondes A et C) étaient plus diffus dans le cytoplasme alors que le marquage correspondant à l'ARNg(-) (sonde B) montrait un marquage cytoplasmique plus punctiforme.

L'ensemble de ces données d'hybridation *in situ* a montré qu'aux différents temps post-électroporation, la localisation du marquage de l'ARNsg(+) (sonde C) était périphérique par rapport à celui de l'ARNg(+) (sonde A). De plus, le marquage de la sonde B (ARNg(-)) montrait l'intensité la plus faible des 3 sondes.

Par la suite, l'ARNg(+) (**sonde A**) a été co-marqué avec les protéines virales ORF1, ORF2 et ORF3 (**Fig. 52 D-G**). A trois jours post-électroporation, la protéine ORF1 étiquetée V5 a été retrouvée à proximité des foyers périnucléaires riches en ARNg(+). Le coefficient de colocalisation s'élevait à  $0,76 \dots 0,11$ . Les protéines virales ORF2 et ORF3 co-localisaient également avec l'ARNg(+) en région périnucléaire avec des PCC de  $0,60 \dots 0,12$  et  $0,73 \dots 0,06$ , respectivement.



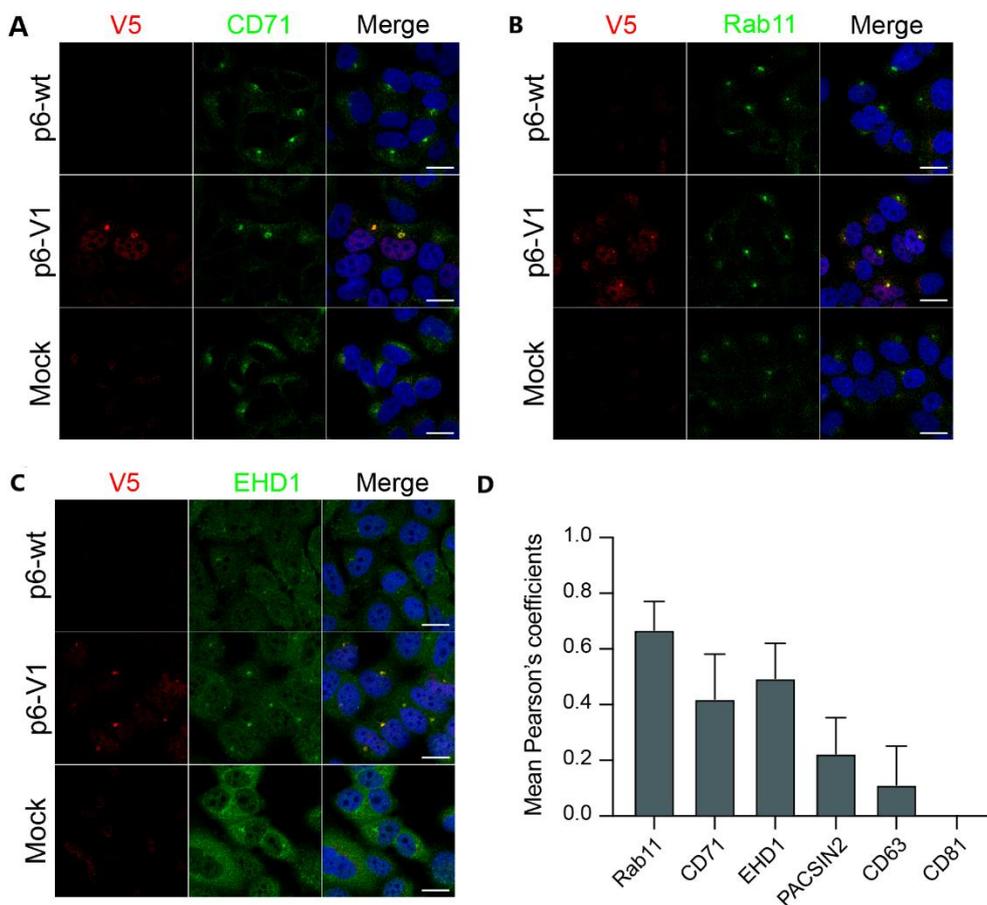
**Figure 52: Marquage *in situ* de l'ARN et des protéines du HEV.**

**A**-Représentation schématique de l'emplacement des différentes sondes utilisées en RNAscope®. La sonde A cible l'ARN génomique de polarité positive et est située dans le domaine RdRp de l'ORF1. La sonde B cible l'ARN génomique de polarité négative et est également située dans le domaine RdRp mais ne chevauche pas avec la sonde A. La sonde C cible l'ARN sous-génomique de polarité positive en s'hybridant au chevauchement ORF3 (bleu) /ORF2 (rouge). **B**- Des cellules PLC3/p6-wt ont été fixées à 4h, 3 et 6 jours post-électroporation puis marquées séquentiellement avec la sonde A (rouge), la sonde B (verte) et C (cyan). Les PLC3 non électroporées ont été utilisées comme contrôle (Mock). **C**- Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés sur cellules entières en utilisant le logiciel ImageJ. Les moyennes ( $\pm$  écart type) de 30 cellules analysées sont représentées. **D, E, F**- Des cellules PLC3/p6-wt et p6-V1 ont été co-marquées avec la sonde A (rouge) et avec soit l'anti-V5 (vert, **D**), l'anti-ORF2 (vert, **E**) ou l'anti-ORF3 (vert, **F**), 3 jours suivant l'électroporation. **G**- Les PCC ont été calculés sur la région d'intérêt correspondant à la pépite en utilisant le logiciel ImageJ. Les moyennes ( $\pm$  écart type) de 30 cellules analysées sont représentées.

### 3.2.4. Etude de la distribution de l'ORF1 et des marqueurs cellulaires

Dans le but de mieux caractériser la distribution subcellulaire de l'ORF1, des doubles marquages avec l'anticorps V5 et des marqueurs d'endosomes tardifs/MVB (CD81 et CD63) et du compartiment endosomal de recyclage, abrégé ERC, (Rab11a, CD71, EHD1, MICAL-L1 et PACSIN2) ont été réalisés. Un nombre minimum de 30 cellules par type de marquage a été analysé et les moyennes des PCC ont été calculées au niveau des pépites (**Fig.53**).

Les résultats obtenus ont montré une colocalisation de l'ORF1 avec les différents marqueurs de l'ERC (**Fig.53 A, B, C et D**). Néanmoins, aucune colocalisation n'a été observée avec les marqueurs des endosomes tardifs/MVB (**données non montrées**).

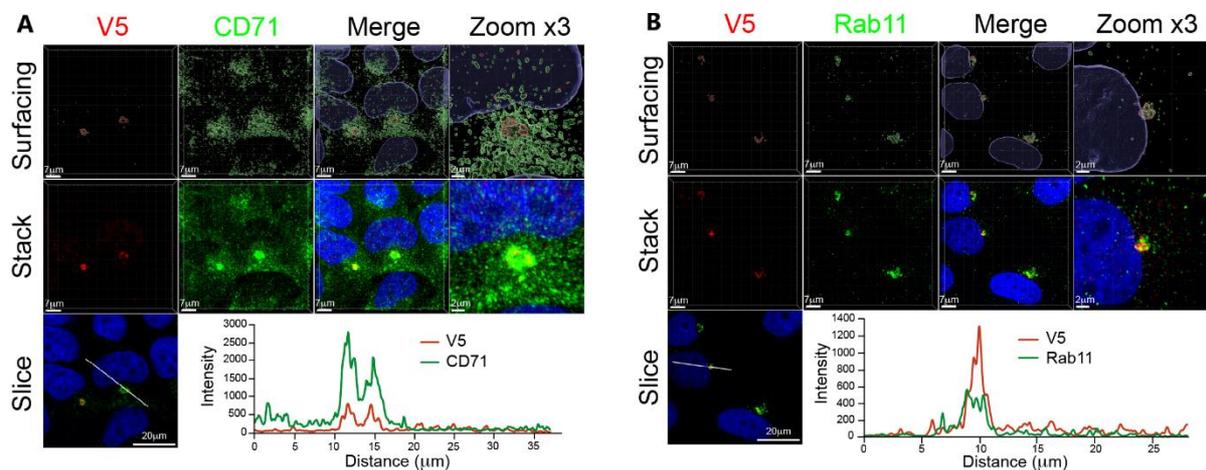


**Figure 53: Etude de la localisation subcellulaire de la protéine virale ORF1 du HEV avec les marqueurs cellulaires de l'ERC par microscopie confocale.**

Trois jours post-électroporation, des cellules PLC3/p6-wt (p6-wt), PLC3/p6-V1 (p6-V1) ou des cellules contrôles (Mock) ont été fixées (PFA, 3%) et perméabilisées avec du méthanol froid et du Triton X-100 à 0,5%. Des co-marquages ont été faits avec les différents marqueurs cellulaires du compartiment de recyclage et des endosomes tardifs/MVB.

En effet, la protéine ORF1 étiquetée V5 a montré une colocalisation importante avec Rab11 (PCC = 0,67 ...0,08), une colocalisation modérée avec CD71 (PCC = 0,42 ...0,13) et avec EHD1 (PCC = 0,49 ... 0,13) (**Fig.53 D**). Ces différents marqueurs de l'ERC ont été détaillés dans la partie 1 de mon projet de thèse.

Une analyse poussée par la microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/p6-V1 marquées avec l'anticorps V5 et les anticorps dirigés contre les marqueurs cellulaires du compartiment de recyclage (Rab11 et CD71) a permis de valider les résultats d'IF montrant un recouvrement des intensités de fluorescence de l'ORF1 avec CD71 et Rab11 (**Fig.54**).



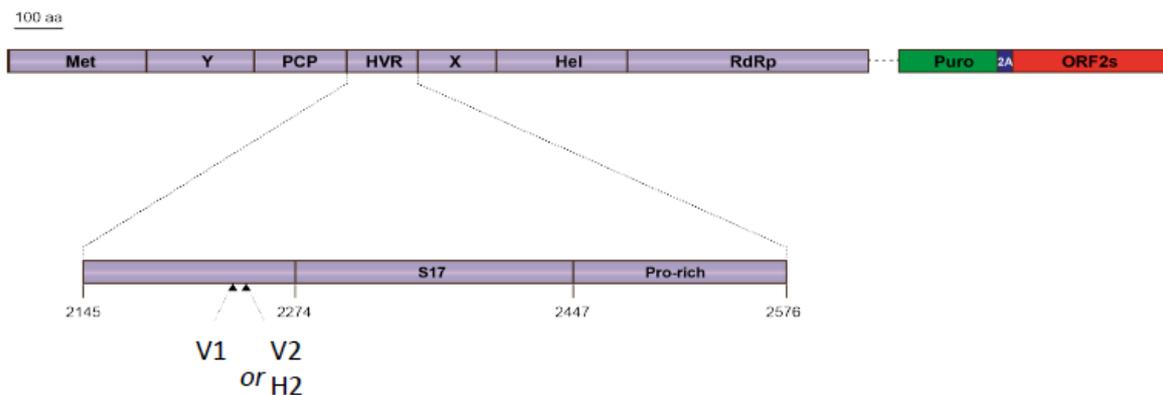
**Figure 54: Analyse poussée par microscopie confocale à super-résolution des cellules PLC3/HEV marquées avec les anticorps dirigés contre V5 et CD71 (A) ou Rab11 (B). L'épitope**

En haut (Surfacing), le rendu volumique des z-stacks en utilisant le logiciel Imaris permet de mieux apprécier les sous-structures colorées. Au milieu (Stack), les z-stacks sont visualisés. En bas (Slice), les graphes montrent les intensités de fluorescence des doubles marquages ORF1/CD71 (A) et ORF1/Rab11 (B) mesurés dans la région d'intérêt mise en évidence par la ligne blanche dans l'image présentée en bas à gauche. Les barres d'échelle sont précisées sur chaque image. Le marquage ORF1 est en rouge ; les marquages CD71 et Rab11 sont en vert ; et le marquage des noyaux en bleu.

#### 4. ORF1 et remaniements membranaires

##### 4.1. Génération des lignées cellulaires exprimant de façon stable la réplicase virale

Dans mon projet j'ai également cherché à définir si la réplication du HEV à elle seule est capable d'induire des réarrangements membranaires au sein de la cellule hôte. Pour ce faire, un réplicon stable exprimant la protéine ORF1 a été construit en insérant, à la place de la partie N-terminale de l'ORF2 et de l'ORF3, le gène de résistance à la puromycine, la puromycine acétyltransférase, permettant la sélection des cellules qui expriment le réplicon (**Fig. 55**). Une région codant pour la protéase 2A a été également introduite. La protéase 2A possède la propriété de s'autocliner à son extrémité C-terminale (Luke, 2009) permettant ainsi le clivage entre la puromycine acétyl-transférase et la partie C-terminale de l'ORF2, les deux protéines pouvant ainsi jouer leurs rôles respectifs dans la cellule.



**Figure 55: Schéma des différentes constructions p6-V1/V2/H2-puro-2A-ORF2S.**

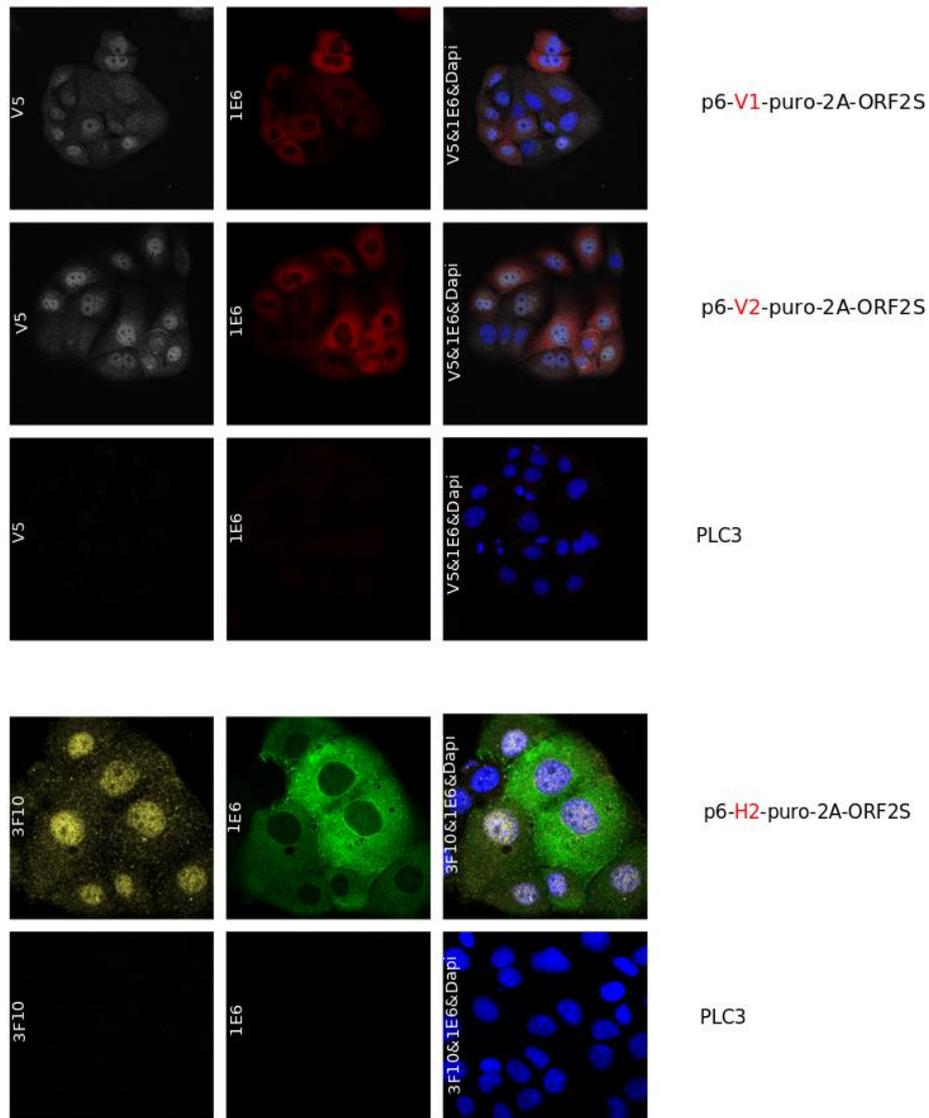
Un réplicon stable exprimant la protéine ORF1 (en violet) a été construit en insérant, à la place des ORF3 et de la région N-terminale de l'ORF2, le gène de résistance à la puromycine (en vert) qui permettra de sélectionner les cellules qui expriment le réplicon. Une région codant pour la protéase 2A (en bleu) permet un autoclivage pour libérer la puromycine acétyl-transférase de la partie C-terminale de l'ORF2. La partie C-terminale de la protéine ORF2 (en rouge) a été préservée (ORF2s) permettant ainsi son immunodétection à l'aide de l'anticorps monoclonal commercial 1E6.

Comme aucun anticorps dirigé contre la protéine ORF1 n'est fonctionnel dans des systèmes cellulaires répliquatifs, trois réplicons contenant la puromycine acétyl transférase et la protéase 2A et exprimant l'ORF1 avec soit l'épitope V1, V2 ou H2 ont été générés. Comme décrit précédemment, ces épitopes ont été insérés au sein du domaine hypervariable de l'ORF1 et permettent ainsi son immunodétection à l'aide des anticorps commerciaux anti-V5 et anti-HA. De même, la partie C-terminale du gène qui code pour la protéine ORF2 (aa339-660, ORF2S) a été conservée dans les réplicons facilitant ainsi leur immunodétection à l'aide des anticorps dirigés contre la protéine ORF2. Les constructions ont été nommées : p6-V1-puro-2A-ORF2S, p6-V2-puro-2A-ORF2S et p6-H2-puro-2A-ORF2S. Afin d'écartier le fait que les structures induites par le réplicon p6-puro-2A-ORF2S soient dues à la partie exprimée de l'ORF2, un codon stop a été inséré en aval du gène codant la puromycine acétyl transférase et trois

autres constructions ont été générées et nommées : p6-V1-puro, p6-V2-puro et p6-H2-puro (résultats non montrés). Les épitopes V5 et HA ont été insérés aux mêmes positions que décrites précédemment.

Des cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN préparé à partir de chacune de constructions des différents réplicons. Les cellules ont été cultivées 15 jours sous pression de sélection puromycine (à une concentration de 3µg/ml). Les cellules sélectionnées ont ensuite été fixées (PFA, 3%) et perméabilisées avec du méthanol froid et du Triton X-100 à 0,5%. Des doubles marquages ORF1 (à l'aide des anticorps anti-V5 ou anti-HA) et ORF2 (à l'aide de l'anticorps commercial 1E6) ont été réalisés pour les réplicons ORF2S (**Fig.56**). De simples marquages ORF1 (à l'aide des anticorps anti-V5 ou anti-HA) ont été réalisés pour les réplicons exprimant le gène de résistance à la puromycine sans l'ORF2S (données non montrées).

Comme précédemment, nos résultats ont montré que l'insertion d'un épitope dans la région HVR de l'ORF1 n'a pas perturbé l'expression de la protéine ORF1 puisque celle-ci était détectable en immunofluorescence. Par ailleurs, cette insertion d'épitope n'a pas perturbé l'expression de l'ARN sous génomique codant pour l'ORF2 tronquée et le gène de la résistance à la puromycine. En effet, les réplicons ont pu être sélectionnés sans difficulté par la puromycine et l'ORF2 tronquée a pu être détectée en IF. Les résultats des IF ont montré un marquage similaire en terme d'ORF1 et d'ORF2 pour les différentes constructions (**Fig.56**). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents réplicons en termes de distribution des protéines ORF1 et ORF2 tronquée. La distribution de l'ORF1 dans la cellule hôte était cytoplasmique et nucléaire alors que l'ORF2 tronquée était très abondante au niveau cytoplasmique.



**Figure 56: E t u d e d e l a l o c a l i s a t i o n s u b c e l l u l a i r e e n m i c r o s c o p e p a r i m m u n o m a r q u a g e .**  
**les cellules PLC3 exprimant les réplicons de façon stable.**

Des cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN de chaque réplicon. Après sélection par la puromycine, ces cellules ont été fixées et des immunomarquages ont été réalisés. Des cellules PLC3 non électroporées (PLC3) ont été utilisées comme contrôles négatifs pour chaque type de marquage.

#### 4.2. es avec le réplicon par microscopie électronique classique

Des cellules PLC3 électroporées avec les réplicons p6-V1-puro-2A-ORF2S, p6-V2-puro-2A-ORF2S ou p6-H2-puro-2A-ORF2S ont été sélectionnées par la puromycine puis fixées et analysées en microscopie électronique classique. L'analyse ultrastructurale des cellules PLC3 exprimant ou non ces réplicons p6-puro-2A-ORF2S par microscopie électronique n'a pas révélé de remaniements membranaires induits par les réplicons. Des approches par immunogold ont également été développées mais aucun anticorps anti-V5 ou anti-HA fonctionnel n'a été identifié.

Ces résultats indiquent donc que la réplication du HEV à elle seule n'induit probablement pas de remaniements membranaires.

#### IV. Conclusion

De nombreux aspects du cycle viral du HEV restent à ce jour inconnus du fait de la difficulté à amplifier le HEV *in vitro*. Les objectifs majeurs de cette étude étaient d'abord d'étudier la maturation de la réplicase du HEV, d'identifier les compartiments subcellulaires où a lieu la réplication virale et de déterminer si l'ORF1 est capable d'induire à elle seule des remaniements membranaires dans la cellule hôte.

Nos résultats ont montré que les réplicons HEV, pour lesquels des épitopes V5 ont été positionnés dans la région HVR, conservent une bonne efficacité de réplication par rapport au p6-GLuc-wt. En revanche, l'insertion des épitopes HA a diminué drastiquement l'efficacité de réplication. De même, la quantification de l'infectivité des HEV étiquetés avec les épitopes V5 (p6-V1 et p6-V2) a montré des titres infectieux équivalents au virus sauvage non étiqueté.

L'étude des niveaux d'expression des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV à la fois en système réplicon et en système infectieux a montré que l'insertion des épitopes V5 dans le génome viral ne perturbe pas la sécrétion des particules virales dans le surnageant des cellules infectées.

L'analyse de la maturation de l'ORF1 dans les différents systèmes de culture en WB a montré la détection d'une bande d'une taille supérieure à 180 kDa qui correspond à la forme complète de la protéine ORF1. D'autres bandes qui pourraient correspondre à des formes minoritaires de clivage ont également été détectées. Les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse de l'ORF1 exprimée en systèmes infectieux et hétérologue ont montré une extrémité N-terminale plus stable que l'extrémité C-terminale qui est apparue plus maturée.

En immunofluorescence, dans le système infectieux ainsi que dans le système hétérologue, la protéine ORF1 était localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, ce qui a été confirmé par l'analyse en WB des fractions subcellulaires. Le marquage cytoplasmique correspondant à l'ORF1 forme des spots fluorescents intenses situés en périphérie du noyau, appelés « pépites ». Dans le système infectieux, l'étude de la distribution de l'ORF1 et des autres protéines virales, ORF2 et ORF3, a montré que certaines pépites contenant l'ORF1 étaient également marquées avec les anticorps anti-ORF2 et anti-ORF3. Ceci suggère que ces sites pourraient correspondre aux lieux d'assemblage ou de réplication du HEV. Des marquages avec des marqueurs cellulaires ont montré une forte colocalisation avec les marqueurs de l'ERC (Rab11, CD71, EHD1).

Enfin, la réplication du HEV ne semble pas induire de remaniements membranaires majeurs dans la cellule hôte. Alternativement, l'efficacité de réplication du HEV étant moins efficace que celles d'autres virus (exemple : HCV), ces remaniements sont peut-être trop discrets pour pouvoir être mis en évidence en microscopie électronique classique.

## V. Discussion

Chez la plupart des virus à ARN sb (+), les polyprotéines non structurales subissent une maturation et un clivage en plusieurs protéines de plus petite taille (Ploss & Dubuisson, 2012). Dans le cas du HEV, les résultats des travaux de recherche s'intéressant à la maturation de l'ORF1 restent toujours controversés (LeDesma et *al.*, 2019).

### Mise en place de différents systèmes de culture :

En raison de son faible niveau d'expression et de l'absence d'anticorps commerciaux fonctionnels (Lenggenhager et *al.*, 2017), la réplicase du HEV est la protéine la moins étudiée par rapport à l'ORF2 et l'ORF3. L'insertion d'épitopes au sein de la séquence ORF1 du HEV apparaît une bonne stratégie pour caractériser la maturation et la localisation subcellulaire de cette protéine virale. En effet, Szkolnicka et collaborateurs ont déjà réussi à insérer un épitope HA dans la réplicase virale du HEV en utilisant une approche d'insertion au hasard par transposons (Szkolnicka et *al.*, 2019).

Dans le cas de notre projet, l'analyse d'un alignement de séquences en aa de l'ORF1 provenant de 44 souches de HEV de différents génotypes nous a permis d'identifier les régions variables susceptibles de pouvoir tolérer l'insertion d'épitopes. Un site a été choisi à l'extrémité C-terminale de la RdRp et six autres sites ont été identifiés dans la région HVR. En fait, la région HVR est considérée comme une région intrinsèquement désordonnée et caractérisée par sa grande variabilité (Holla et *al.*, 2013). L'analyse d'isolats provenant de patients chroniquement infectés par le HEV a révélé que la région HVR pouvait acquérir des insertions au fil du temps, soit à partir d'autres régions du génome viral soit à partir de gènes humains (Lhomme et *al.*, 2014 ; Johnne et *al.*, 2014). Bien que la raison de ces insertions reste méconnue, l'insertion de résidus aminés provenant des protéines ribosomales S17 et S19 dans la région HVR du HEV procure aux souches virales les ayant intégrées une haute capacité de réplication *in vitro* (Shukla et *al.*, 2012 ; Nguyen et *al.*, 2012). La souche Kernow-C1-p6 (nommée p6) est l'une des souches HEV les plus couramment utilisées en culture cellulaire en raison de sa plus haute capacité répliquative et hébergeant l'insertion de la protéine S17 (Shukla et *al.*, 2011 ; Nguyen et *al.*, 2012 ; Johnne et *al.*, 2014 ; Lhomme et *al.*, 2014). Le choix des sites d'insertions des épitopes a été validé sur la base de l'efficacité de réplication des différentes constructions effectuées dans le contexte de la souche p6 ainsi que de leur pouvoir infectieux en culture cellulaire. Ensuite, les profils d'expression de l'ORF1 étiquetée ainsi que sa localisation subcellulaire ont été caractérisés en WB et en IF.

Au début du projet, des alignements de séquences des différents épitopes ont été réalisés avec la séquence HVR de la souche p6 afin d'identifier des similarités entre ces séquences et donc que l'insertion puisse être mieux tolérée par le virus. Une région ayant une similarité avec l'épitope V5 a

ainsi été identifiée (V1) : 4 aa correspondaient à la séquence de l'épitope V5, trois acides aminés ont été mutés et 7 aa ont été insérés afin de construire la séquence complète de l'épitope V5 (14 aa). Pour les constructions V2 et H2, les épitopes ont été insérés dans leur intégralité à la position correspondant à l'insertion de la protéine S19 dans la souche LBPR-0379 (Nguyen et *al.*, 2012 ; Shukla et *al.*, 2012). En utilisant un site d'insertion naturelle rapporté pour une autre souche, l'efficacité de réplication serait probablement préservée. Enfin, un épitope HA a été inséré à l'extrémité C-terminale de l'ORF1 en émettant l'hypothèse que cette insertion ne perturberait pas la conformation de la protéine ORF1.

Tout d'abord, les différents épitopes ont été insérés dans le réplicon p6-GLuc afin de déterminer l'impact de leur insertion sur la capacité répliquative en analysant l'activité luciférase. L'ensemble de nos résultats a montré que l'expression de la *Gaussia* luciférase et donc, l'efficacité de réplication du p6-GLuc-H1, était inhibée par l'insertion de l'épitope HA à l'extrémité C-terminale de l'ORF1. Également, en contexte infectieux, l'insertion de l'épitope HA en position H2, perturbait l'expression de l'ORF2 comme nous avons pu l'observer en WB et en IF (Données non montrées). Ce site d'insertion est localisé dans la région de jonction entre l'ORF1 et l'ORF3/2 et cette région contient un promoteur sous-génomique dont le rôle est crucial pour la transcription des ARN sous-génomiques (Ding et *al.*, 2018). Ce promoteur sous-génomique s'étend de l'extrémité 3' de l'ORF1 jusqu'au codon Start de l'ORF3. En insérant un épitope HA dans cette région, la transcription de l'ARN sous-génomique est inhibée ainsi que l'expression des protéines ORF2 et ORF3. La caractérisation de cette construction n'a donc pas été poursuivie en système infectieux. Ensuite, on a pu illustrer que les insertions H2 et V2, placées au niveau des mêmes positions, impactaient différemment l'expression de l'ARN sous-génomique puisque l'activité luciférase était préservée en grande partie pour la construction p6-GLuc-V2 alors qu'elle était fortement diminuée pour la construction p6-GLuc-H2. Il semble donc que la composition de la séquence en aa de l'épitope, et pas uniquement sa position, ait un impact notamment en modifiant la conformation de la polyprotéine ORF1, ce qui pourrait amener à une inhibition de son activité. Par contre, les efficacités de réplication des constructions p6-V1-GLuc et p6-V1 sont restées comparables à celles des souches sauvages. Les insertions de l'épitope V5 en positions V1 et V2 étant mieux tolérées, nous avons poursuivi leur caractérisation en vérifiant que l'infectivité virale et les niveaux d'expression de la protéine ORF2 pour ces 2 constructions n'étaient pas modifiés par rapport à la souche sauvage. Nous nous sommes donc servis de ces 2 constructions pour analyser l'expression et la maturation de l'ORF1 dans trois systèmes différents : le système réplicon p6-Gluc, le système hétérologue et le système infectieux.

### Etude de la maturation de la protéine ORF1

Dans les trois systèmes utilisés dans notre projet, la forme complète de l'ORF1 de 180 kDa a été détectée même à des moments très précoces. D'autres protéines pouvant correspondre à des produits de clivage de l'ORF1 ont été également observées. Ces protéines étaient présentes en quantité plus faible et migraient à des tailles comprises entre 95 et 180 kDa. La spectrométrie de masse a permis d'identifier la séquence aminée de la protéine ORF1 complète. Néanmoins, l'identification des formes potentielles de clivage était moins fiable en raison de leur faible niveau d'expression à la fois dans le système infectieux et dans le système d'expression hétérologue et ce, malgré les efforts d'optimisation des immunoprécipitations et de l'accroissement important des quantités de cellules électroporées ou transfectées. Nous n'avons donc pas pu identifier ces protéines minoritaires avec certitude et ne pouvons donc pas confirmer la présence d'un ou plusieurs sites de clivage de la protéine ORF1. Nos résultats d'analyse par spectrométrie de masse de ces produits minoritaires ont mis en évidence une extrémité N-terminale stable qui correspond à celle de la forme complète de l'ORF1 et une extrémité C-terminale variable. En revanche, l'éventualité que ces protéines de poids moléculaires inférieurs à 180 kDa soient le résultat d'une dégradation ne pouvait être exclue. Nous avons donc réalisé des essais d'inhibition du protéasome en utilisant la lactacystine (Kim et *al.*, 1999). Après 8 heures de traitement par la lactacystine, le profil de bandes détectées pour l'ORF1 en WB est resté inchangé alors qu'une légère accumulation de la protéine HSP70 était détectée. Ces observations suggèrent que les bandes minoritaires détectées pour l'ORF1 sont plutôt les produits d'une maturation de la polyprotéine plutôt que le résultat d'une dégradation artéfactuelle. La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents domaines de la polyprotéine pourrait permettre d'aller plus loin dans l'étude de la maturation de la protéine ORF1.

Une étude menée en système d'expression BacMam a rapporté la détection des différents domaines ORF1 dans les cellules Huh-7 en utilisant des anticorps spécifiques de différents domaines Met-, PCP- et RdRp. En fait, une bande de 18 kDa qui correspond au domaine PCP, une autre bande de 35 kDa qui correspond au domaine Met et une bande de 37 kDa qui correspond au domaine RdRp ont été détectées lors de l'utilisation des différents anticorps en WB. De même, l'activité méthyltransférase du domaine Met a été illustré. En IF, l'utilisation des anticorps Met et PCP a montré une localisation nucléaire et périnucléaire d'ORF1, tandis que le marquage anti-RdRp a révélé une localisation périnucléaire (Kumar et *al.*, 2020). Au laboratoire, nous avons testé des anticorps anti-ORF1 commerciaux ou issus de collaborations ainsi que les anticorps utilisés dans l'étude de Pertilla et collaborateurs (2013). Malheureusement, aucun signal spécifique n'a été détecté. Ceci pourrait être due à la difficulté d'accessibilité aux épitopes ou bien au faible niveau d'expression de l'ORF1.

## Etude de la localisation subcellulaire de la polyprotéine ORF1

L'étude des fractions subcellulaires en WB a montré la détection de la protéine ORF1 et des produits de maturation dans différentes fractions cellulaires avec des intensités très variables. Dans des études antérieures, la protéine ORF1 a été retrouvée dans le cytoplasme à proximité des deux autres protéines virales ORF2 et ORF3 et des marqueurs cellulaires spécifiques de l'ERGIC et du Golgi (Rehman *et al.*, 2008 ; Szkolnicka *et al.*, 2019). Plusieurs rapports récents ont décrit la localisation subcellulaire de l'ORF1 dans différents systèmes de culture cellulaire. Lenggenhager et collaborateurs ont utilisé deux anticorps reconnaissant respectivement la région RdRp et Met (Lenggenhager *et al.*, 2017). La réplicase virale a été détecté au niveau du cytoplasme. Cependant et contrairement à la protéine ORF2, la réplicase virale n'a pas pu être détectée dans les tissus de patients infectés par le HEV. Ces observations peuvent être expliquées par le fait que par rapport à l'ORF2, l'ORF1 est probablement moins abondante dans les tissus des patients et est donc plus difficile à détecter.

Dans notre étude en utilisant le système infectieux et hétérologue, la protéine ORF1 étiquetée présentait à la fois une localisation cytoplasmique et nucléaire lors des analyses de fractionnement subcellulaire et d'IF. La souche Kernow C-1 p6 contient au niveau de l'HVR, une insertion de la protéine ribosomique humaine S17 dans laquelle un signal de localisation nucléaire a été défini (Kenney & Meng, 2015), ce qui pourrait expliquer la localisation nucléaire de l'ORF1. Nous avons muté ce NLS dans le contexte du réplicon p6-GLuc et de la protéine ORF1 exprimée en système hétérologue (données non montrées). Nos analyses ont montré que, en accord avec (Kenney & Meng, 2015a), la mutation du NLS inhibait la réplication virale mais la localisation nucléaire de l'ORF1 n'était pas affectée (données non montrées).

En plus de sa localisation nucléaire et cytoplasmique, la protéine ORF1 a été identifiée dans des spots fluorescents intenses situés en périphérie du noyau appelés « pépites » qui contenaient également les protéines ORF2 et ORF3 et colocalisaient avec des marqueurs cellulaires du compartiment endosomal de recyclage tels que Rab11 et CD71. Comme décrit précédemment (**résultats de la partie1, publication 1**), ces structures correspondent probablement à des usines virales. Les résultats d'immunolocalisation de l'ORF1 confortent l'hypothèse que le site de réplication du HEV est situé à proximité immédiate du site d'acquisition de la quasi-enveloppe du virus. En effet, afin d'identifier le site de réplication du HEV, nous avons cherché à étudier la distribution subcellulaire des ARN viraux en utilisant une nouvelle technique d'hybridation *in situ* appelée la RNAscope®. Cette technique permettant de visualiser les différents brins d'ARN a été utilisée dans le cas du HCV et du virus Zika (Wang *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2019). Nous avons réussi à localiser de l'ARN génomique et sous-génomique. Des études de colocalisation des brins d'ARN positifs, négatifs et de l'ARN génomique avec

les différentes protéines virales ont pu être réalisées et ont montré une codistribution du génome viral dans les pépites périnucléaires. Ces analyses renforcent de nouveau l'hypothèse selon laquelle le site de réplication, d'assemblage ainsi que le site d'acquisition de la quasi-enveloppe se situent à proximité, probablement au niveau du compartiment endosomal de recyclage. Néanmoins, il serait intéressant de caractériser l'implication de l'ERC au cours de la réplication du HEV en développant par exemple des approches de siRNA dirigés contre Rab11. De plus, il serait intéressant de vérifier la distribution des différents ARN au niveau de tissus de patients infectés.

**Conclusion générale et perspectives**

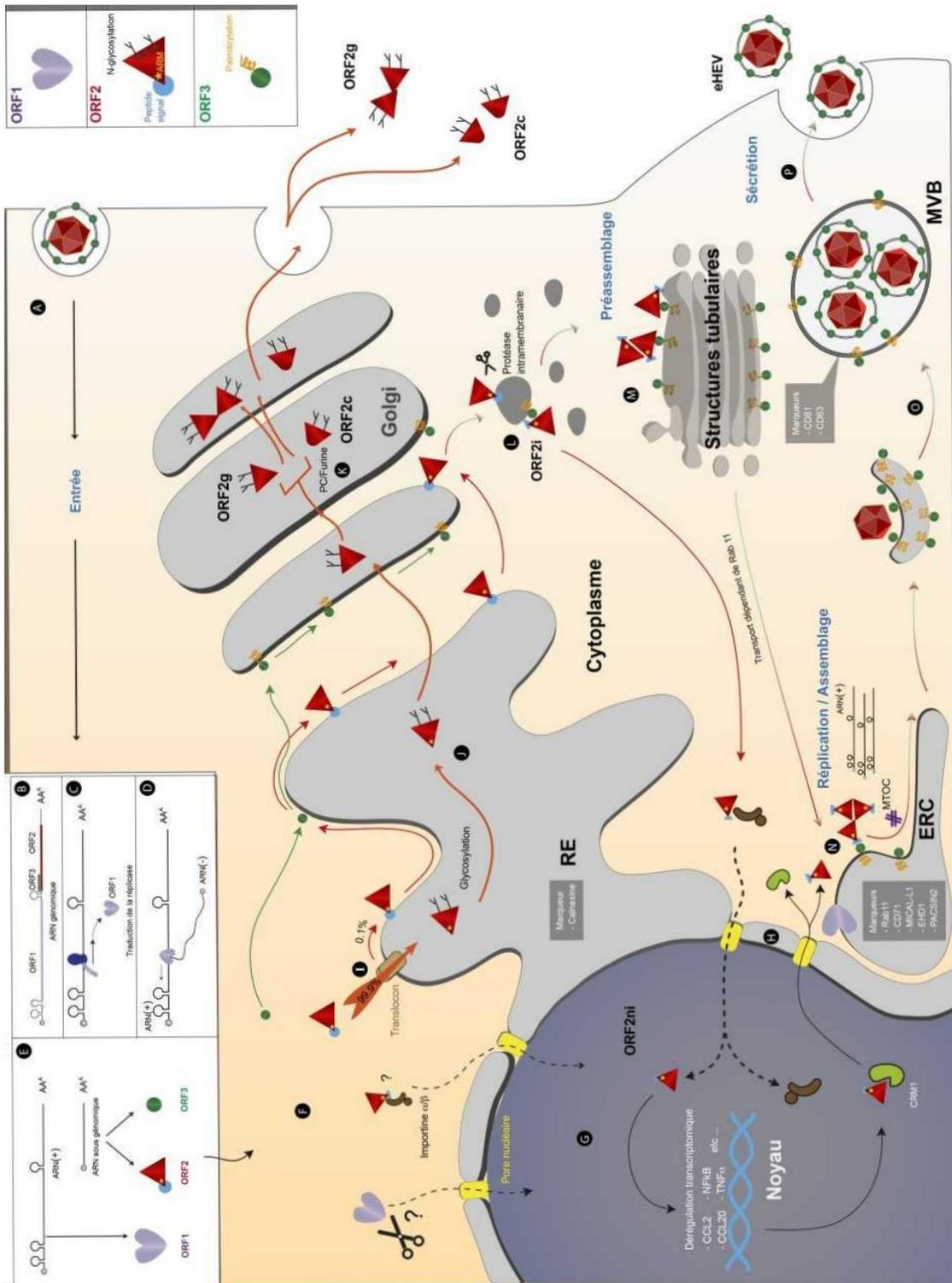


Figure 57 : Vue globale sur le cycle de réplication du HEV.

# **Annexes**

**Publication 1: The Endocytic Recycling Compartment Serves  
as a Viral Factory for Hepatitis E Virus**

## The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for Hepatitis E Virus

Cyrine Bentaleb<sup>a#</sup>, Kévin Hervouet<sup>a#</sup>, Claire Montpellier<sup>a</sup>, Charline Camuzet<sup>a</sup>, Julien Burlaud-Gaillard<sup>b,c</sup>, Martin Ferrié<sup>a</sup>, Elisabeth Werkmeister<sup>d</sup>, Karoline Metzger<sup>a</sup>, Nancy Leon Janampa<sup>b</sup>, Julien Marlet<sup>b</sup>, Julien Roux<sup>e</sup>, Clarence Deffaud<sup>e</sup>, Anne Goffard<sup>a</sup>, Yves Rouillé<sup>a</sup>, Jean Dubuisson<sup>a</sup>, Philippe Roingear<sup>b,c</sup>, Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>a,\$</sup> and Laurence Cocquerel<sup>a,\$,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR 9017-CIIL- Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>b</sup> Inserm U1259. Morphogénèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites (MAVIVH), Université de Tours and CHRU de Tours, 37032 Tours, France.

<sup>c</sup> Université de Tours et CHRU de Tours, Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique, Tours, France

<sup>d</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014 - US41 - PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, Lille, France.

<sup>e</sup> BIOTEM, Apprieu, France

#C.B. and K.H. contributed equally to this work

\$C-M.A-D. and L.C. contributed equally to this work

\*Corresponding author: Laurence Cocquerel, University of Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR 9017-CIIL- Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France, [laurence.cocquerel@cnrs.fr](mailto:laurence.cocquerel@cnrs.fr)

**Keywords:** Hepatitis E virus, ORF2 capsid protein, antibodies, infectious particles, viral factories, electron microscopy, endocytic recycling compartment

**Word count:**

**Number of figures: 8**

Patents have been filed by Inserm-Transfert. JR and CD are employees of the BIOTEM company. The authors have no other potential conflict of interest.

**Financial support:** This work has been funded by Inserm-Transfert (MAT-PI-17006), Pasteur Institute of Lille (DiagHepE), Region Hauts-de-France (DiagHepE), ANRS and the University of Tours.

**Authors contributions:**

C.B., K.H., C.M., C.C., J.B-G., M.F., K.M., J.R., Y.R., J.D., P.R., C-M.A., and L.C. performed research and/or analyzed data.

E.W., N.L.J., J.M., C.D., A.G., contributed to reagents or analytic tool.

L.C. wrote the paper.

**Abstract (268 words):**

**Background & Aims:** Although Hepatitis E virus (HEV) is the major leading cause of enterically transmitted viral hepatitis worldwide, many gaps remain in the understanding of the HEV lifecycle. Notably, viral factories induced by HEV have not been documented yet and it is currently unknown whether HEV infection leads to cellular membrane modelling as many positive-strand RNA viruses. HEV genome encodes three proteins, the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 protein involved in virion egress. Previously, we demonstrated that HEV produces different isoforms of its ORF2 capsid protein including the virion-associated ORF2i form.

**Methods:** We generated and characterized monoclonal antibodies directed against ORF2 proteins. We used them in confocal and electron microscopy approaches to probe viral factories in HEV-producing cells. We performed an extensive colocalization study of viral proteins with subcellular markers. We analyzed the impact of the silencing of Rab11, a central player of the endocytic-recycling compartment (ERC).

**Results:** We produced antibodies that specifically recognize the particle-associated ORF2i form, and antibodies that recognize the different ORF2 isoforms. One of the antibodies, named P1H1 and targeting the N-terminus of ORF2i, recognized delipidated HEV particles. Confocal and ultrastructural microscopy analyses of HEV-producing cells revealed an unprecedented HEV-induced membrane network containing tubular and vesicular structures. These subcellular structures were enriched in ORF2 and ORF3 proteins, and were dependent on the ORF3 expression and ORF2i capsid protein assembly. Colocalization and silencing analyses revealed that these structures are derived from the ERC.

**Conclusions:** Our study reveals that HEV hijacks the ERC and forms a membrane network of vesicular and tubular structures that might be the hallmark of HEV infection.

**Lay summary**

Hepatitis E virus (HEV) is the leading cause of acute hepatitis worldwide but many steps of its lifecycle are still elusive. Thanks to the development of new antibodies that recognize the different forms of the HEV capsid protein, we were able to visualize vesicular and tubular structures that were established by the virus in the host cell. In addition, extensive efforts to identify these structures led us to conclude that HEV hijacks the endocytic-recycling compartment of the cell to form this network of vesicles and tubules, which might be the hallmark of HEV infection.

## Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of acute viral hepatitis worldwide. Four main distinct genotypes (gt), belonging to a single serotype, infect humans. HEV gt1 and gt2 are restricted to humans and are responsible for waterborne outbreaks in developing countries with low sanitary conditions. HEV gt3 and gt4 are zoonotic and cause sporadic zoonotic foodborne hepatitis in industrialized countries [1–3]. Although HEV causes a mostly asymptomatic self-limited disease, gt1-infection can lead to fulminant liver failure, particularly in pregnant women, and gt3-infection can lead to chronic disease in immunosuppressed patients. There is no specific treatment nor universal vaccine against HEV [4].

HEV is found as a non-enveloped virus in bile and feces or as a quasi-enveloped virus (eHEV) in blood and cell culture. Its RNA genome encodes three proteins, the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 protein involved in virion egress [5]. Previously, we demonstrated that, during the HEV lifecycle, HEV produces at least 3 forms of the ORF2 capsid protein: infectious ORF2 (ORF2i), glycosylated ORF2 (ORF2g), and cleaved ORF2 (ORF2c) [6]. The ORF2i protein is the structural component of infectious particles that is likely derived from the assembly of the intracellular ORF2 (ORF2intra) form. In contrast, ORF2g and ORF2c proteins (herein referred to as ORF2g/c) are not associated with infectious material but secreted in large amounts (*i.e.*, about 1000x more than ORF2i [7]) and are the most abundant antigens detected in patient sera [6]. In addition, these proteins likely act as humoral decoys that inhibit antibody-mediated neutralization [7]. Recently, we demonstrated that a 5 amino acid Arginine-Rich Motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region is a unique central regulator of ORF2 addressing that finely controls the HEV lifecycle [8]. Indeed, the ARM controls ORF2 nuclear translocation, promoting regulation of host antiviral responses. This motif also regulates the dual topology and functionality of ORF2 signal peptide, leading to the production of either cytosolic infectious ORF2i or reticular non-infectious glycosylated ORF2 forms. Furthermore, the ARM likely serves as a cleavage site of the glycosylated ORF2 protein. Finally, it promotes ORF2 membrane association that is likely essential for particle assembly [8].

Recent breakthroughs have been achieved in developing cell culture models for HEV [9]. However, many gaps remain in the knowledge of the HEV lifecycle such as the intracellular location of HEV replication and particle assembly as well as the underlying mechanisms of these processes [10]. It is known that the majority of positive sense single-stranded RNA viruses induce host cell membrane rearrangements to facilitate their viral genome transcription, replication, viral particle assembly and to protect from the innate immune response. These membrane rearrangements have been well-characterized by confocal and electron microscopy approaches leading to the identification of a broad spectrum of complexity between the host membrane remodeling and viral and cellular actors involved in these arrangements [11]. However, due to a scarcity of robust cell culture models, membrane

remodeling and viral factories induced by HEV have not been documented yet. Here, we generated monoclonal antibodies directed against the ORF2 capsid protein and used them to probe infectious particles and viral factories in HEV-producing cells.

## Materials and methods

**Antibodies.** Mice immunization and generation of P1H1, P2H1, P2H2 and P3H2 monoclonal antibodies were performed as described in [12]. Other primary antibodies used in this study are listed in **Supplementary Table 1**. Peroxidase- and fluorochrome-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Gold-conjugated secondary antibodies were from Aurion (Wageningen, Netherlands).

**Cells.** PLC3 cells are a subclone of PLC/PRF-5 hepatoma cells [6]. PLC3 and Huh-7.5 [13] cells were authenticated by STR profiling and Multiplex Cell Authentication (Multiplexion) respectively, and cultured as previously described [14].

**Plasmids and transfection.** The plasmid pBlueScript SK(+) carrying the DNA of the full length genome of adapted gt3 Kernow C-1 p6 strain, (GenBank accession number JQ679013, kindly provided by S.U Emerson) was used [15]. The ORF3-null mutant (HEV-p6- $\Delta$ ORF3) and the 5R/5A mutant (HEV-p6-5R/5A) of HEV-p6 were generated as described in [16] and [8], respectively. Capped genomic HEV RNAs were prepared with the mMMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) and delivered to PLC3 or Huh-7.5 cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell<sup>TM</sup> apparatus (Bio-Rad) [6]. PLC3/HEV and Huh-7.5/HEV cells were electroporated with p6 RNA (20ag /  $4 \cdot 10^6$  cells) whereas PLC3 mock and Huh-7.5 mock were electroporated in the absence of RNA.

**Indirect immunofluorescence.** At 6 days p.e. cells were immunostained as previously described [14]. Cells were then analyzed with a LSM 880 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a Plan Aplanachromat 63xOil/1.4N.A. objective. The images were processed using ImageJ and Fiji softwares. For high-resolution confocal analyses, images were acquired with an Airyscan module. Z-stacks acquisition were performed with a 0.15  $\mu$ m z-interval. The ORF2 confocal parameters were determined to optimize the dynamic range and avoid intensity saturation, and the same settings were applied for each sample. Images in the 3 channels were recorded using Zen image collection software (Carl Zeiss Microscopy) and processed for high resolution reconstruction. 3D volumetric surface constructs were obtained using Imaris software (version 9.5.1; Oxford instruments, Belfast), by applying an intensity threshold for each channel. The images were then processed using Fiji software.

**Mander's overlap coefficient** Colocalization studies were performed by calculating the MOC using the JACoP plugin of ImageJ software. For each calculation, at least 30 cells were analyzed to obtain a MOC mean. A MOC of 1 indicates perfect overlap and 0 no overlap.

**Western blotting analysis.** Western blotting analyses were performed as described previously [6]. Target proteins were detected with specific antibodies (**Supplementary Table 1**) and corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies.

**Immunoprecipitations (IP).** Antibodies were bound to Tosylactivated M-280 Dynabeads™ (Thermofisher) overnight at 37°C following the manufacturer's recommendations. Beads were washed and then incubated for 1h at room temperature with supernatants (heat-inactivated or Triton-treated), lysates or Triton-treated patient sera. Beads were washed and then heated at 80 °C for 20 min in Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 MAb.

**qIP.** For qIP experiments, samples were first immunoprecipitated as described above. Next, RNA were extracted and quantified by RT-qPCR as described in [14].

**Immunoelectron microscopy.** Electroporated cells were fixed by incubation for 2 h with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6), washed twice with PBS (pH 7.6), for 5 min each, and centrifuged at 300 × g for 10 min. The supernatant was removed, and the cell pellets were embedded in 12% gelatin and infused with 2.3 M sucrose overnight at 4°C. Ultra-thin cryosections (90 nm) were cut at -110°C on a LEICA FC7 cryo-ultramicrotome. The sections were retrieved in a mixture of 2% methylcellulose and 2.3 M sucrose (1:1) and collected onto formvar/carbon-coated nickel grids. The gelatin was removed by incubation at 37°C, and the sections were incubated on drops of diluted primary antibodies (**Supplementary Table 1**). The grids were washed six times with PBS, for 5 min each, and were then incubated on drops of PBS supplemented with diluted secondary antibodies conjugated to gold particles of 6 nm or 10 nm in diameter. The grids were washed with six drops of PBS (5 min each), post-fixed in 1% glutaraldehyde and rinsed with three drops of distilled water. Contrast staining was achieved by incubating the grids on drops of a 2% uranyl acetate/2% methylcellulose mixture (1:10). The sections were then examined under a transmission electron microscope operating at 100 keV (JEOL 1011). Electron micrographs were recorded with a digital camera driven by Digital Micrograph software (GMS 3, Gatan).

**Transferrin endocytosis.** PLC3/HEV and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells were incubated with 25  $\mu$ g/ml of Alexa633-conjugated transferrin (TrF) at 37°C and fixed at indicated times. Cells were next permeabilized with methanol and TX, then stained with the P1H1 antibody. Cells were analyzed by confocal microscopy.

**Silencing experiments.** At 3 days p.e., PLC3/HEV cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) pools (Horizon) targeting Rab11a (ON-TARGETplus human Rab11a, gene 8766, siRNA SMARTpool) and Rab11b (ON-TARGETplus human Rab11b, gene 9230, siRNA SMARTpool) (siRab11) or with a nontargeting siRNA control (siCTL) by using RNAiMax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The knockdown effects were determined at 72h post-transfection by immunofluorescence, western-blotting, RT-qPCR and virus titration.

**Infectious titer determination.** Infectious titers in focus forming unit (FFU/mL) were determined as described previously [14] by using Huh7.5 cells. ORF2-positive cells were quantified using an InCell 6000 confocal analyzer (GE Healthcare) and the Columbus image analysis software (Perkin Elmer).

## Results

### Generation of monoclonal antibodies that specifically recognize the ORF2i protein

The ORF2 protein sequence contains 660 amino acids (aa) (**Fig. 1A**). Previously, we demonstrated that the first aa of ORF2i/intra, ORF2g and ORF2c proteins are L<sup>14</sup>, S<sup>34</sup> and S<sup>102</sup>, respectively [6,14]. The ORF2i/intra protein is not glycosylated whereas ORF2g/c proteins are N-glycosylated on <sup>137</sup>NLS and <sup>562</sup>NTT sequons [14] (**Fig. 1A**). We capitalized on these features to design two immunogen peptides (P1 and P2) for obtaining highly specific antibodies of the ORF2i form. The P1 peptide corresponds to the N-terminus of the ORF2i protein that is not present in the ORF2g/c form sequences. The P2 peptide corresponds to 14 aa covering the <sup>562</sup>NTT sequon that is not occupied by N-glycans on the ORF2i protein, in contrast to ORF2g/c proteins. We also designed a P3 peptide for obtaining antibodies recognizing the different forms of ORF2 (**Fig. 1A**). To verify the specificity between strains/genotypes, sequence alignments were carried out for each peptide (data not shown). Following mice immunization and hybridoma screening, one clone from P1 immunization (P1H1), two clones from P2 immunization (P2H1 and P2H2) and one clone from P3 immunization (P3H2) were selected and further characterized.

Specificity of generated antibodies was first analyzed in western blotting (WB) experiments with supernatants (SN) and lysates of PLC3 cells electroporated with the gt3 p6 strain (PLC3/HEV cells) and non-infected PLC3 cells, as antigens (**Fig. 1B**). SN of PLC3/HEV cells contains quasi-enveloped infectious HEV particles (ORF2i) but also large amounts of ORF2g/c proteins, whereas cells express the intracellular ORF2i form (ORF2intra) that assembles to form intracellular particles [6,14]. The 1E6 monoclonal antibody, which recognizes the three forms of ORF2 proteins [6] was used as a control. The P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies showed a highly specific recognition of the ORF2i protein without cross-reacting with the ORF2g/c proteins, as compared to the P3H2 and 1E6 antibodies that recognized the three forms (**Fig. 1B**).

Antibodies were next used in immunoprecipitation (IP) assays against heat-denatured (HD) SN and lysates of PLC3/HEV cells. In lysates, all antibodies immunoprecipitated the ORF2intra protein (**Fig. 1C**, bottom panel). In contrast, in SN, no ORF2 proteins were detected in IP-P2H1 and IP-P2H2 whereas the IP-P1H1 showed a highly specific recognition of the ORF2i protein, without cross-reaction with the ORF2g/c proteins (**Fig. 1C**, top panel), as compared to IP-P3H2 and IP-1E6 that displayed the three forms of ORF2. Thus, P1H1 specifically immunoprecipitates heat-denatured HEV particles.

HEV particles produced in cell culture are wrapped with lipids that mask the ORF2 epitopes. In order to analyze the ability of antibodies to immunoprecipitate non-denatured particles, SN of PLC3/HEV cells was then treated with Triton X-100 (TX), or left untreated (TX-0%) before IP with P1H1 and P3H2 (**Fig. 1D**). In untreated samples, no ORF2 proteins were detected in IP-P1H1, whereas ORF2g/c proteins were immunoprecipitated by P3H2. In treated samples, the IP-P1H1 showed a highly sensitive and

specific recognition of the ORF2i protein, whereas IP-P3H2 displayed the three forms of ORF2. Thereby, P1H1 specifically immunoprecipitates detergent-treated HEV particles.

We next analyzed by RT-qPCR the ability of P1H1 and P3H2 antibodies to immunocapture HEV particles in TX-treated SN. We found that P1H1 immunocaptured 27% of total RNA input whereas P3H2 immunocaptures only 2% (**Fig. 1E**). These results indicate that P1H1 efficiently recognizes non-lipid-associated-particles and that its epitope is exposed on naked HEV particles.

Antibodies were also tested for their ability to neutralize non-enveloped particles but none of them displayed neutralizing activity (data not shown), indicating that, while exposed on HEV particles, the P1H1 epitope is not involved in HEV entry.

### **Identification of HEV-induced subcellular structures**

We next performed double-label immunofluorescence and confocal analyses of PLC3/HEV cells using the anti-ORF2 antibodies and a polyclonal antibody directed against ORF3, a small protein that is associated with the quasi-enveloped viral particle and supports virion egress through the exosomal pathway [17,18]. ORF3 protein is palmitoylated at cysteine residues in its N-terminal region and is exposed to the cytosolic side of the membrane [19]. The anti-ORF2i antibodies (P1H1, P2H1 and P2H2) mainly displayed a perinuclear nugget-like ORF2 staining, whereas the P3H2 and 1E6 antibodies showed a diffuse ER-like ORF2 staining in addition to the perinuclear nugget-like ORF2 staining (**Fig. 2A**). Of note, P3H2 and 1E6 antibodies recognize the different ORF2 isoforms notably the ORF2g/c forms which are proteins going through the secretory pathway [6,8,14].

For each antibody, we calculated the Mander's Overlap Coefficient (MOC) of either ORF2 staining in ORF3 staining (**Fig. 2B**, ORF2 in ORF3) or ORF3 staining in ORF2 staining (**Fig. 2B**, ORF3 in ORF2). We found that the ORF3 protein staining highly overlapped with ORF2 for all antibodies, indicating that the ORF3 protein highly colocalizes with the ORF2 proteins (**Fig. 2B**, MOC ORF3 in ORF2). Moreover, the P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies showed a higher MOC of ORF2 in ORF3 than that of P3H2 and 1E6, indicating that ORF3 protein mainly colocalizes with the ORF2i protein (**Fig. 2B**, ORF2 in ORF3). In line with this, super-resolution confocal microscopy analyses of PLC3/HEV cells stained with either P1H1 (ORF2i, **Fig. 2C**) or P3H2 (ORF2tot, **Fig. 2D**) showed a total overlap of fluorescence intensities of ORF2i with ORF3 (**Fig. 2C**) whereas a shift of fluorescence intensities was observed between total ORF2 and ORF3 proteins (**Fig. 2D**).

Together, these results indicate that anti-ORF2 antibodies, and more specifically anti-ORF2i antibodies, recognize perinuclear ORF2-enriched structures that are in close proximity to the ORF3 protein.

Of note, all antibodies recognized ORF2 proteins from HEV-gt1 (Supplementary data, **Fig. S1**).

We then performed electron microscopy (EM) experiments, using immunogold labeling with P1H1, P2H2, P3H2 and 1E6 anti-ORF2 antibodies (visualized by 6 nm gold particles) of ultrathin cryosections

of PLC3/HEV (**Fig. 3A**) and PLC3 mock (**Fig. S2**) cells. On cryosections of PLC3/HEV cells, the four antibodies specifically labeled two types of subcellular structures *i.e.* tubular structures and vesicular structures (**Fig. 3A**). Tubular structures displayed a homogeneous diameter of 20-25 nm. They were highly organized, often arranged in compact parallel arrays. Vesicular structures were larger and heterogeneous in size with a diameter of 50-250 nm. Both structures were mostly found in the vicinity of the nucleus and led to a nuclear deformation (**Fig. 3A**, P3H2, asterisk). In most cells, we observed an extensive membrane network containing tubular and vesicular structures (**Fig. 3B**, P1H1, P2H2 and 1E6) and in some cells, transverse and longitudinal sections of tubular structures were observed (**Fig. 3B**, P3H2). These results suggest that the perinuclear ORF2-enriched structures previously observed in confocal microscopy likely correspond to the tubular and vesicular structures observed in EM. Importantly, HEV-induced tubular and vesicular structures were also observed in Huh-7.5 cells (**Fig. S3**). In addition, these structures were not found in cryosections of PLC3 mock and Huh-7.5 mock cells. Together, these results indicate that, during its lifecycle, HEV induces the formation of perinuclear ORF2-enriched ultra-structures in the host cell.

We next performed double immunogold labeling experiments with anti-ORF2 (visualized by 6 nm gold particles) and anti-ORF3 (visualized by 10 nm gold particles) antibodies on cryosections of PLC3/HEV cells (**Fig. 4A**). We found a co-distribution of ORF3 and ORF2 proteins in vesicular and tubular structures, supporting the confocal microscopy analyses of ORF2/ORF3 co-localization (**Fig. 2**).

To further understand which viral determinant is important for the formation of HEV-induced subcellular structures, we transfected PLC3 cells with an ORF3-null mutant (HEV- $\Delta$ ORF3) [16] (**Fig. 4B**) and an ORF2 assembly mutant (HEV-5R/5A) [8] (**Fig. 4C**). In the absence of ORF3 protein expression, HEV particle secretion is abolished [16] and ORF2 proteins accumulate in the cytosol (**Fig. 4B**). In the HEV-5R/5A mutant, the arginine residues of the ARM were replaced by alanine residues without affecting ORF3 expression. The 5R/5A mutations lead to an accumulation of ORF2 in the Golgi apparatus (**Fig. 4C**) and are deleterious for viral particle assembly [8]. Of note, HEV RNA replication is not altered in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 and PLC3/HEV-5R/5A cells [8]. Strikingly, in the absence of ORF3 expression (PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3), cells displayed no perinuclear ORF2-enriched structures in confocal microscopy but rather a diffuse ORF2 staining. In EM, immunogold labeling revealed no vesicular or tubular ORF2-enriched ultra-structures but rather ORF2 proteins associated with regular cellular membranes likely derived from ER/GA compartment (**Fig. 4B**). Similarly, in PLC3/HEV-5R/5A cells, we observed no structures resembling to the ORF2/ORF3-enriched ultra-structures as those observed in **Fig. 4A**, but ORF2 and ORF3 proteins were distributed in the cytosol close to common intracellular vesicles.

Together, these results indicate that, during its lifecycle, HEV induces the formation of subcellular structures that are dependent both on the ORF3 expression and on the capacity of ORF2i to assemble

as capsids. Of note, we did not observe any structures resembling to the ORF2/ORF3-enriched ultra-structures in cells transfected with a tagged-ORF1 replicon (data not shown), indicating that these structures are not induced by HEV replication. Therefore, the ORF2/ORF3-enriched ultra-structures are solely dependent on the ORF3 expression and ORF2 capsid protein assembly.

### **HEV hijacks the Endosomal Recycling Compartment (ERC)**

To further characterize the HEV-induced subcellular structures, we next carried out an extensive immunofluorescence colocalization study of the ORF2i protein with cell pathway markers. Colocalizations were performed with the P1H1 anti-ORF2i antibody and antibodies directed against markers of cytoskeleton ( $\alpha$ -tubulin and MTOC), secretory pathway (Calnexin and ERGIC 53), early endosomes (EEA1 and Rab5), late endosomes / multivesicular bodies (MVB) (Rab9a, CD81 and CD63), Endosomal Recycling Compartment (ERC) (Rab11, CD71, EHD1, MICAL-L1 and PACSIN2), peroxisome (PMP70 and Catalase), mitochondria (TOM-20) and lysosome (LAMP1) (**Fig. 5A** and **Fig. S4**). Colocalizations were quantitatively analyzed by calculating the MOC (**Fig. 5A**). As shown in **Fig. 5A** and **5B**, the ORF2i protein significantly co-distributes with markers of two different cell compartments *i.e.* the late endosomes and the ERC. Indeed, the MOCs of ORF2i with Rab9a, CD81 and CD63 were 0.44, 0.55 and 0.37, respectively, indicating a medium colocalization between ORF2i and these cellular markers. Rab9a belongs to a class of small Rab GTPases which are effector proteins promoting exchanges between the late endosome pathway and the trans Golgi network [20,21], whereas CD81 and CD63 are tetraspanins found in MVB, which are a compartment belonging to the late endosome pathway.

On the other hand, ORF2i strongly colocalized with cell markers of the ERC. This compartment is the keystone of the slow cellular recycling pathway. The ERC plays major roles in cellular metabolism and is subverted during infection by an increasing number of pathogens such as viruses [22,23]. The ERC constitutes a collection of tubular organelles that are close to the nucleus and is defined by the presence of the Rab11 GTPase and its effectors. Rab11 regulates recycling from the ERC and transport of cargo from the TGN to the plasma membrane [24–27]. Strikingly, ORF2i and Rab11 showed a MOC of 0.86 (**Fig. 5A**), indicating a strong colocalization. Indeed, super-resolution confocal microscopy analyses showed a total overlap of fluorescence intensities between ORF2i and Rab11 (**Fig. 5C**). ORF2i also strongly colocalized with CD71 (MOC=0.78) (**Fig. 5A**), the transferrin receptor that is a reference marker for the ERC [28]. This observation was further confirmed by high-resolution microscopy (**Fig. 5D**).

Efficient recycling via the ERC relies on the integrity of a complex network of elongated, non-symmetrical endosomes known as tubular recycling endosomes (TRE). A family of proteins known as the C-terminal Eps15 homology domain (EHD1-4) proteins and EHD-interaction partners such as MICAL-L1 (Molecule Interacting with CasL-like1) and PACSIN2/Syndapin2, are involved in TRE

biogenesis and control membrane recycling. Although ORF2i only displayed a weak co-localization with EHD1 (MOC=0.28), it colocalized with MICAL-L1 (MOC=0.49) and PACSIN2 (MOC=0.63) (**Fig. 5A**). The colocalization of ORF2i with MICAL-L1 was further confirmed by high-resolution microscopy but showed a small shift of fluorescence intensities (**Fig. 5E**), indicating that they are in close proximity to each other. Altogether, our data suggest that HEV likely subverts effectors of the cellular recycling machinery.

On the other hand, although ORF2i did not colocalize with the MTOC (**Fig. 5A**), ORF2i-enriched structures were found in close proximity of the organizing center (**Fig. S4**). Of note, it has been shown that the MTOC and the ERC are two distinct structural entities closely related promoting endosomal trafficking [29].

As shown for Rab11, CD71 and MICAL-L1, colocalization analyses in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells, indicated that, in the absence of ORF3 expression, ORF2i no longer colocalizes with these cell markers (**Fig. 5B**). These results are in line with our above described observations on the importance of the ORF3 protein in the formation of HEV-induced subcellular structures (**Fig. 4**). Although some cellular markers were enriched in subcellular structures (*i.e.* CD81 and Rab11), staining of mock electroporated PLC3 cells (PLC3 mock) showed similar subcellular localizations of other cell markers as in PLC3/HEV and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells (**Fig. S5**), indicating that HEV infection does not induce a general cell markers redistribution.

To strengthen our previous observations, we next performed a kinetics of colocalization with the P1H1 anti-ORF2i antibody and fluorochrome-conjugated transferrin in PLC3/HEV and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells (**Fig. S6**). It has been shown that Transferrin (TrF) first binds to its receptor (CD71) at the cell membrane and then enters the cell through clathrin-mediated endocytosis. Once in the early endosomes, TrF-CD71 complexes return back to the cell surface through either a fast route going directly back to the plasma membrane, or a slower route delivering TrF-CD71 complexes to the ERC before they are trafficked back to the cell surface [28]. In PLC3/HEV cells, the colocalization between transferrin and ORF2i readily increased over time and reached a MOC of 0.70 after 45 min (**Fig. S6A**), a value similar to that found in **Fig. 5A** for its receptor. In contrast, in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells, transferrin and ORF2i showed a reduced colocalization (MOC = 0.4), (**Fig. S6B**). Thus, during the HEV lifecycle, the ORF2i protein with the help of ORF3 protein, associates with a functional ERC compartment.

We carried out double immunogold labeling experiments by combining anti-ORF2 (visualized by 10 nm gold particles) with anti-Rab11 or anti-CD71 (visualized with 6 nm gold particles) antibodies, and anti-ORF3 (10 nm) with anti-CD81 (6 nm) antibodies on cryosections of PLC3/HEV (**Fig. 6**) and PLC3 mock (**Fig. S7**) cells. In PLC3/HEV cells, we found a co-distribution of ORF2 with Rab11 and CD71 and a co-distribution of ORF3 with CD81 in vesicular and tubular structures, supporting our confocal microscopy analyses. These results indicate that the HEV-induced vesicular and tubular structures likely derive

from ERC and TRE compartments. Moreover, the detection of the tetraspanin CD81 confirms the presence of membranes in vesicular and tubular structures. Since ORF3 protein is a key player in the biogenesis of eHEV [30] and CD81 is present on the quasi-envelope [31], the ORF2/ORF3-enriched ultrastructures that we identified likely correspond to eHEV viral factories. In line with this, P1H1, P2H2, P3H2 and 1E6 anti-ORF2 immunolabeling on cryosections of PLC3/HEV cells highlighted in these ORF2-enriched membranous compartments numerous viral-like particles of ~25 nm in diameter (**Fig. 7**).

Finally, to confirm that the ERC plays a central role in the HEV lifecycle, we conducted functional studies. PLC3/HEV cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting Rab11a and Rab11b isoforms (siRab11) or non-targeting siRNA (siCTL) (**Fig. 8**). The effect of Rab11 silencing on ORF2 expression was analyzed by IF (**Fig. 8A**) and WB (**Fig. 8B**). The effect of Rab11 silencing on viral production was analyzed by quantification of secreted viral RNA (**Fig. 8C**) and infectious titers (**Fig. 8D**). Although Rab11 silencing did not affect the ORF2 expression level, we found that it abrogated the formation of nugget-like structures to the benefit of ORF2-enriched stringy structures mostly localized around the nucleus. These stringy structures did not co-distribute with ORF3, CD71 nor MICAL-L1, which display a more diffuse pattern upon Rab11 silencing. Moreover, extracellular RNA levels and infectious titers were reduced in siRab11-transfected PLC3/HEV cells, as compared to control cells (NT and siCTL). Altogether, these results confirm that the hijacking of the recycling compartment by HEV is pivotal for producing viral particles.

## Discussion

The study performed here with the help of home-made anti-ORF2 antibodies, notably antibodies recognizing the particle associated-ORF2i form, and HEV-producing cells brings new insights into the HEV-host cell interactions.

Previously, we and other demonstrated that during HEV infection, different isoforms of the ORF2 capsid protein are secreted [6,7]. Indeed, by combining the gt3 p6 strain [15] and the highly transfectable PLC3 cells, we identified 3 forms of the ORF2 capsid protein that perform distinct functions in the HEV lifecycle and display different sequences, post-translational modifications and subcellular localization [6,14]. The ORF2i form is the component of infectious particles and derives from the assembly of intracellular ORF2i (ORF2intra) protein [8]. The ORF2i and ORF2intra proteins are not glycosylated and display the same sequence starting at Leu14 corresponding to the middle of the signal peptide (Fig. 1). Although it has been shown that ORF2i protein might be produced from an additional start codon [7], we recently found that an Arginine-Rich Motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region regulates the dual topology and functionality of ORF2 signal peptide, leading to the production of either the cytosolic infectious ORF2i that is not processed by the signal peptidase or the ORF2g/c forms that are generated by translocation into the ER lumen [8]. The glycosylated ORF2g/c forms, which are secreted in very large amounts in culture supernatant and infected patient sera, are not associated with infectious virions [6], but inhibit antibody-mediated neutralization [7]. These glycosylated forms are produced by translocation of ORF2 proteins into the secretory pathway where they are N-glycosylated on two N-x-S/T sequons [14], O-glycosylated and sialylated, and quickly secreted [6,7]. They are cleaved by cellular proteases notably by the proprotein convertase furin [8]. Here, we capitalized on these distinctive features to generate and characterize four anti-ORF2 monoclonal antibodies, including three antibodies (P1H1, P2H1 and P2H2) directed against the ORF2i form and one antibody (P3H2) directed against the different ORF2 isoforms (Fig. 1). Analyses by WB and IP of HEV-infected cell lysates showed that the four antibodies equally recognize the intracellular ORF2 proteins. In contrast, analyses on HEV-infected cell supernatants, which contain some ORF2i proteins but also huge amounts of ORF2g/c proteins, demonstrated that the P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies specifically recognize the ORF2i protein without cross-reaction with the glycosylated ORF2 forms. Importantly, we found that the P1H1 antibody recognizes non-lipid-associated HEV particles. Therefore, the P1H1 antibody might represent a good candidate for diagnosis purposes. More generally, the antibodies that we generated in this study represent unique tools for deciphering the biogenesis mechanisms of ORF2 isoforms and their precise functions in the HEV lifecycle.

Structure of the ORF2 N-terminal domain has not been resolved yet. However, based on its potential interaction with RNA, it is believed that this domain is orientated toward the interior cavity of particles. In our study, we found that the P1H1 antibody that recognizes the N-terminal domain of ORF2 (Fig. 1A) efficiently captures delipidated HEV particles (Fig. 1D and 1E). Although we cannot exclude that

the P1H1 antibody recognizes partially assembled ORF2i proteins, our results suggest that the ORF2 N-terminus might be exposed on the viral surface. Consistent with this observation, we recently found that the ARM located in the ORF2 N-terminal region promotes ORF2 membrane association that is likely essential for particle assembly [8]. Therefore, we hypothesize that the ORF2 N-terminus is associated with lipids enveloping eHEV and removal of lipids by detergent treatment unmasks ORF2 N-terminal epitopes, including the P1H1 epitope.

In the present study, we identified HEV-induced subcellular structures that are enriched in ORF2 and ORF3 proteins. Indeed, we found that ORF2 and ORF3 proteins highly co-localize in infected cells. In addition, thanks to the P1H1 antibody that specifically recognizes the particle-associated ORF2i protein, we demonstrated that ORF2i and ORF3 proteins are tightly co-distributed in perinuclear nugget-like structures, as observed in confocal microscopy. In the absence of ORF3 expression, we observed a redistribution of the ORF2i protein in cytosolic dot-like structures, and in the absence of ORF2 assembly, the ORF3 protein was as well redistributed through the cytosol, indicating that both proteins are tightly connected. Ultrastructural analyses by EM of cryosections of HEV-replicating cells showed that the ORF2/ORF3 enriched structures correspond to a network of vesicular and tubular components in the vicinity of the nucleus. While vesicular structures were heterogeneous in their organization and their size *i.e.* 50-250 nm, the tubular structures formed regular parallel arrays and displayed an homogeneous diameter of 20-25nm, corresponding to that of intracellular HEV-like particles observed in cryosections. Therefore, we hypothesize that tubular structures might correspond to virion precursors. Vesicular and tubular structures were found in both PLC3/HEV and Huh-7.5/HEV cells, indicating that they are not cell type-specific. Although difficult to set up, it would be also interesting to analyze whether this kind of structures is formed in other infectious models such as cells replicating gt1 or in HEV-infected primary cells.

Interestingly, in the absence of ORF2 assembly or ORF3 expression, no perinuclear nugget-like shapes were observed in confocal microscopy, nor vesicular and tubular structures in EM. ORF3 protein is not involved in virion assembly but plays an essential role in exosomal release and acquisition of the quasi-envelope around the neo-synthesized viral particles [32]. We can therefore speculate that the observed structures represent viral factories in which assembled particles acquire their membrane through an ORF2-ORF3 interaction.

Due to the scarcity of analytical tools until recently, only little is known about subcellular localization of HEV proteins in infected cells and about the host factors involved in the various steps of the HEV lifecycle. The subcellular localization of the ORF1 polyprotein, which contains domains involved in viral RNA synthesis, has been studied within heterologous expression systems that showed a membrane association and a colocalization with ER and the ER-Golgi intermediate compartment [33]. A more recent study using HA-tagged replicons and full-length genomes found replication complexes in cytoplasmic dot-like structures overlapping significantly with ORF2 and ORF3 proteins as well as with the CD63 and CD151 exosomal markers [34]. The ORF2 protein has been also studied in heterologous systems and found in different cell compartments *i.e.* plasma membrane, ER and cytoplasmic compartment [35,36]. Later on, ORF2 characterization in infectious systems led to the identification of ORF2 isoforms which are found partitioned in different subcellular compartments. The glycosylated ORF2 forms go through the secretory pathway. The ORF2i form is mainly present in the cytosolic compartment but is also translocated into the nucleus of infected cells [7,8,14,34,37]. The ORF3 protein, which plays a pivotal role in viral egress, has been found in association with microtubules [38,39]. It has also been localized in early and recycling endosomes [40] as well as MVB [17]. Indeed, ORF3 interacts with the MVB-resident tumor susceptibility gene 101 (Tsg101) that is a component of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway [18,41,42]. A recent study showed that ORF3 is palmitoylated at cysteine residues in its N-terminal region and is exposed to the cytosolic side of the intracellular membranes [19]. Here, thanks to the specificity of our antibodies, notably the P1H1 antibody, we performed an extensive colocalization study of ORF2i proteins with different cell markers. In accordance with previous studies, we found a partial co-localization of ORF2i with late endosome markers notably with the tetraspanin CD81, a marker of MVB and exosomes. Since ORF1 and ORF3 proteins have been also shown to colocalize with MVB markers, our findings

strengthen the hypothesis of a close connection between HEV replication and assembly sites [34]. Importantly, we identified a strong colocalization of ORF2i with several markers of the recycling compartment, which was abrogated upon Rab11 silencing. ERC is involved in several stages of the lifecycle of a number of DNA and RNA viruses, with Rab11 playing as a central player in most of these processes [23]. ERC notably mediates viral transport, assembly and egress *e.g.* it is involved in the envelopment of herpes simplex-1 capsids [43] or contributes to the transport of HCV virions towards the plasma membrane [44]. Here, we demonstrated that HEV particle secretion depends on a functional ERC. Interestingly, it has been shown that ERC hijacking is associated with membrane remodeling upon infection. Cholesterol accumulates at the ERC during Influenza A virus (IAV) infection, or Rab11 redistributes from dot structures to large aggregates during infection with several viruses including IAV [23]. Ultrastructural changes of these ERC membrane remodeling were poorly investigated to date. In our study, we demonstrated that HEV is a new candidate in the list of viruses hijacking the ERC. Importantly, we found that viral proteins and recycling compartment markers are co-distributed in perinuclear structures found in ultrastructural analyses as a network of vesicular and tubular structures. To our knowledge, this kind of structures has never been described before and might be the hallmark of HEV infection.

## Figure legends

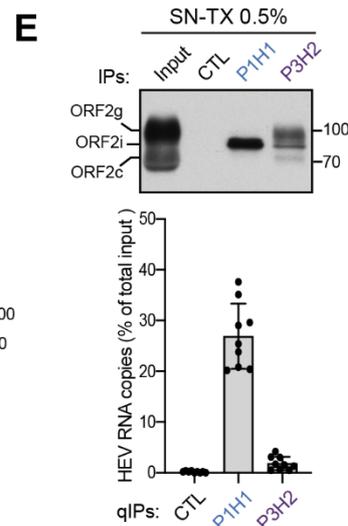
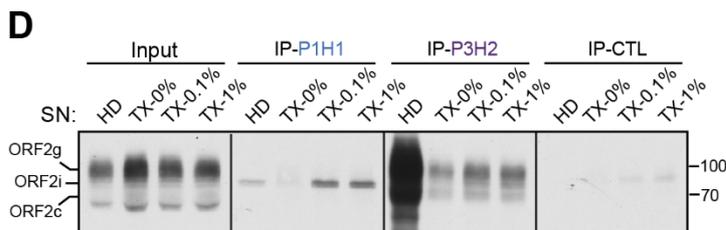
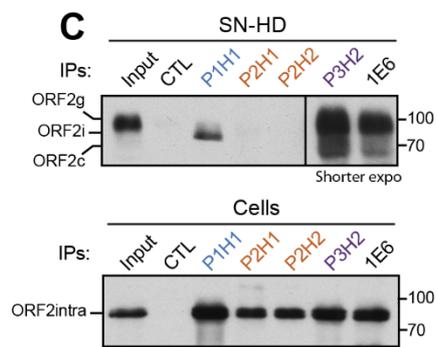
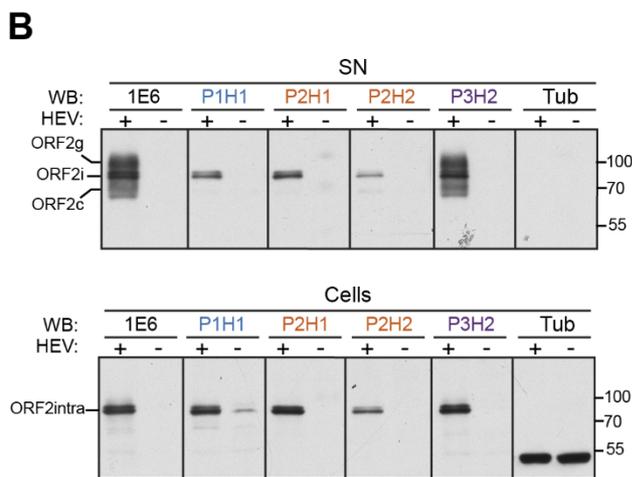
**A**

```

1  MCPRVLLLLF FVF LPMLPAP PAGQPSGRRR GRRSGGAGGG FWGDRVDSQP 50
51  FALPYIHPTN PFAADI VSQS GAGTRPRQPP RPLGSAWRDQ SQRPSAAPRR 100
101 R S A P A G A A P L T A V S P A P D T A P V P D V D S R G A I L R R Q Y N L S T S P L T S S V A S G 150
151  TNLVLYAAPL NPLLPLQDGT NTHIMATEAS NYAQYRVVRA TI RYRPLVPN 200
201  AVGGYAI SIS FWPQTTTTPT SVDMSITST DVRI LVQPGI ASELVI P SER 250
251  LHRYNQGWRS VETTGVAE E E AT SGLVMLCI HGSPVNSYTN TPYTGALGLL 300
301  D F A L E L E F R N L T P G N T N T R V S R Y T S T A R H R L R R G A D G T A E L T T T A A T R F M 350
351  KDLHFTGTNG VGEVGRGI AL TLFNLADTLL GGLPTELISS AGGQLFYSRP 400
401  VVSANGEPTV KLYTSVENAQ QDKGITI PHD I DL G D S R V V I Q D Y D N Q H E Q D 450
451  R P T P S P A P S R P F S V L R A N D V L W L S L T A A E Y D Q A T Y G S S T N P M Y V S D T V T F 500
501  VNVATGAQAV ARSLDWSKVT LDGRPLTTI Q QYSKTFYVLP LRGKLSFWEA 550
551  GTTR AGYPYN YNTTASDQ I L I E N A A G H R V A I S T Y T T S L G A G P A S I S A V G V 600
601  LAPH SALAVL EDTVDYPARA HTFDDFCPEC RTLGLQGCAF QSTIAELQRL 650
651  KTEVGKTRES 660 P2

```

**P3**



**Fig 1**

**Fig 1: Generation of monoclonal antibodies that specifically recognize the ORF2i protein.** (A) Sequence of ORF2 proteins. The line corresponds to the signal peptide. N-glycosylation sites are highlighted in yellow. P1, P2 and P3 peptides are highlighted in blue, orange and purple, respectively. The dashed line corresponds to the 1E6 epitope. (B) Detection of ORF2 proteins in supernatants (SN) and lysates (cells) of PLC3/HEV cells (+) and non-infected PLC3 cells (-) by WB. (C) Immunoprecipitation of ORF2 proteins in heat-denatured (HD, 20min at 80°C) SN and lysates of PLC3/HEV cells. An anti-HCV E2 envelope protein (H52) was used as a negative control (CTL). ORF2 proteins were detected by WB with the 1E6 antibody (WB 1E6) (D) IP of SN treated for 30min with Triton X-100 (TX-0.1%, TX-1%), or left untreated (TX-0%). Input

used for IP are shown on the left. ORF2 proteins were detected by WB 1E6 (E) SN of PLC3/HEV cells was treated with TX-0.5% and immunoprecipitated with the P1H1, P3H2 or isotype control antibodies. Half of the IP was analyzed by WB 1E6 (top panel) and the other half was processed for RNA extraction and HEV RNA quantification (bottom panel). Results are expressed as percent of immunocaptured HEV RNA copies compared to the total input. (B-E) Molecular mass markers are indicated on the right (kDa). For clarity and conciseness concerns, blots were cropped.

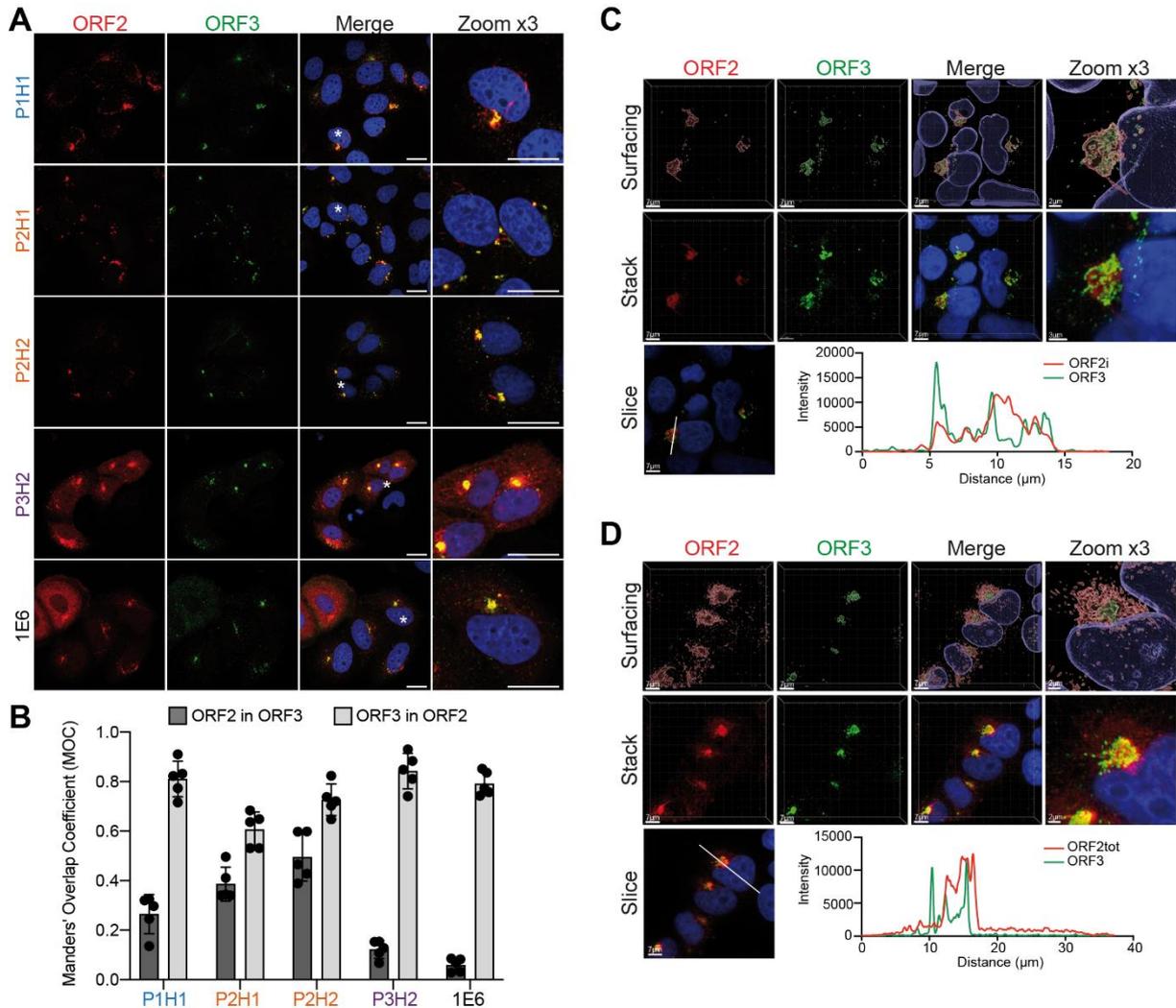
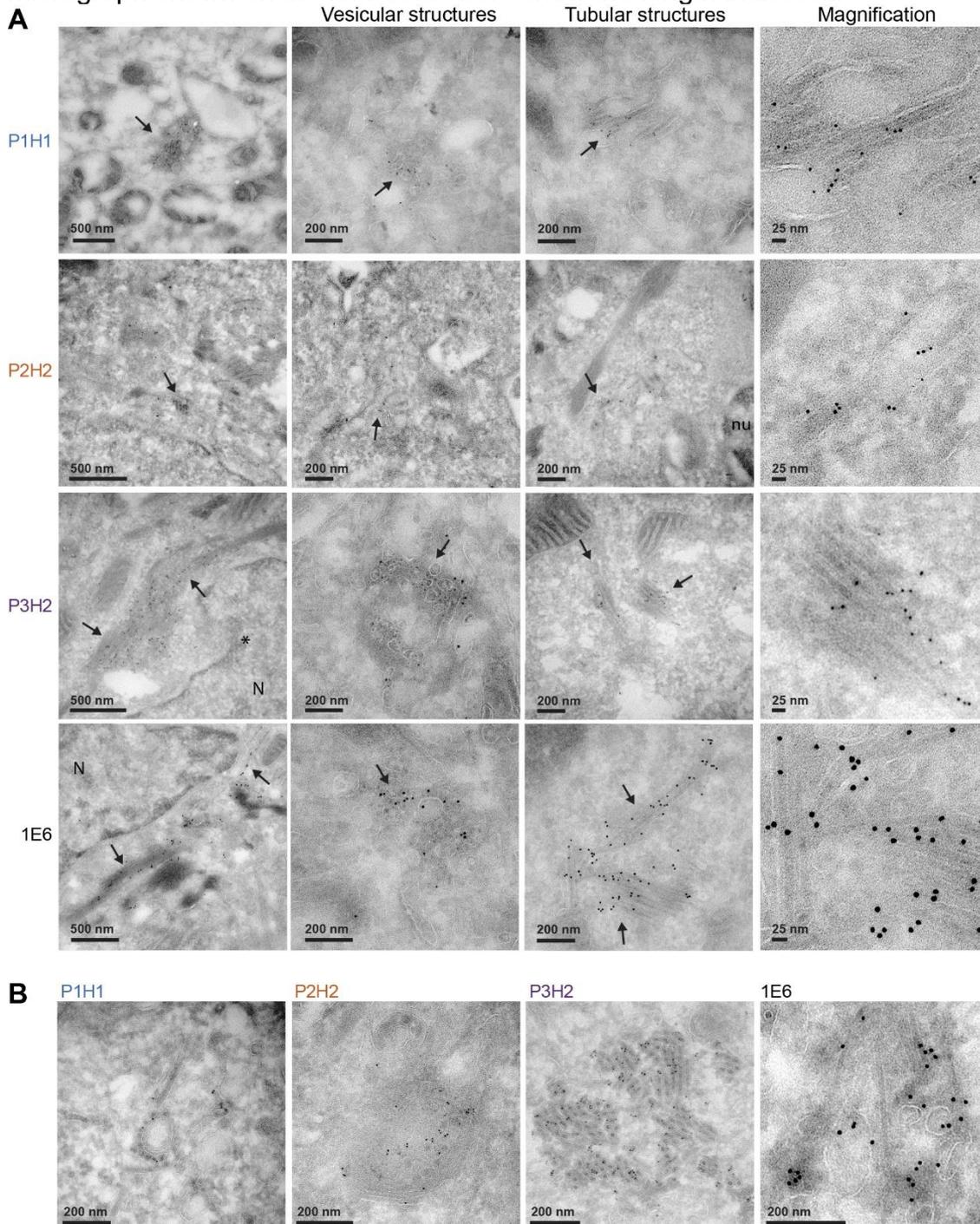


Fig 2

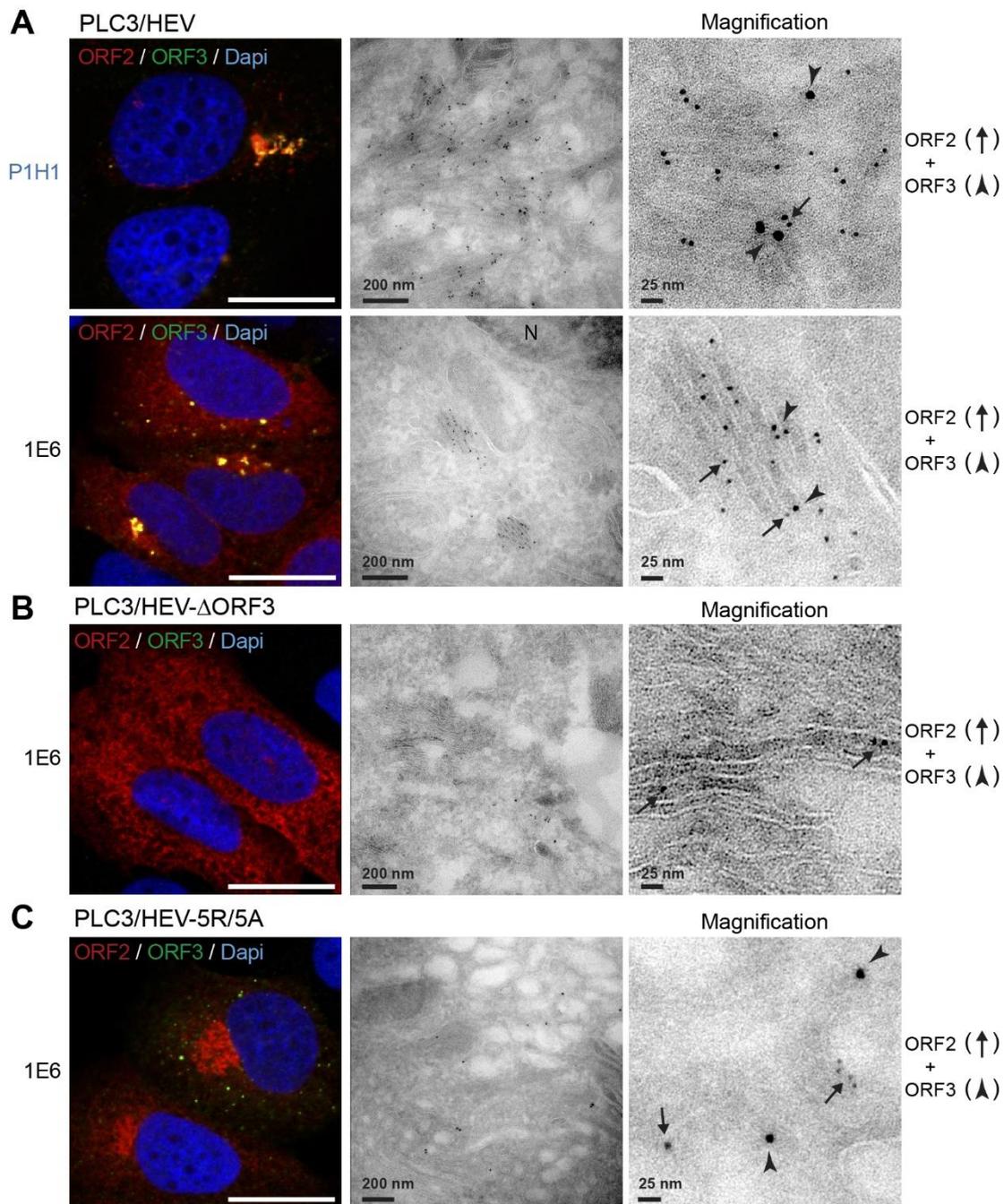
**Fig 2: Subcellular structures recognized by anti-ORF2 antibodies.** (A) PLC3/HEV cells were fixed, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and double-stained with indicated anti-ORF2 and anti-ORF3 antibodies. Red = ORF2; Green = ORF3; Blue = DAPI. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20µm. (B-D) Manders' Overlap Coefficients (MOC) of the ORF2 labeling in the ORF3 labeling (ORF2 in ORF3, dark grey) and MOC of the ORF3 labeling in the ORF2 labeling (ORF3 in ORF2, light grey). (C-D) PLC3/HEV cells were co-stained anti-ORF3 and P1H1 (C) or P3H2 (D) and analyzed by confocal microscopy with a high resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using Imaris are shown to visualize the ORF2/ORF3 substructures. In the middle, z-stacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of ORF2 and ORF3 staining

measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Scale bars show the length indicated.



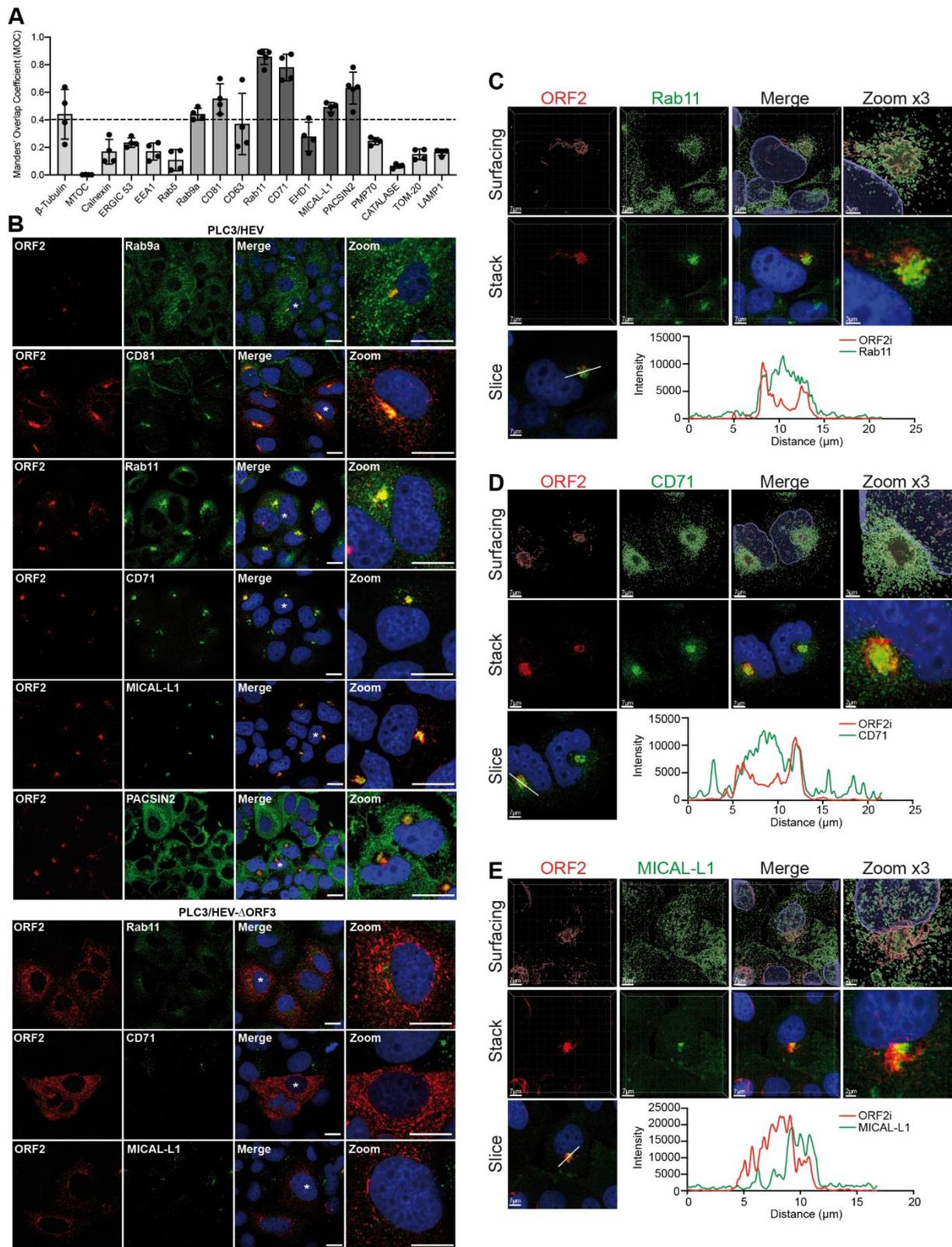
**Fig 3**

**Fig 3: Identification of HEV-induced vesicular and tubular structures.** (A) Transmission electron microscopy of PLC3/HEV cells cryosections immunogold-labelled with the indicated antibodies. Arrows highlight vesicular and tubular structures. N, nucleus. (B) Networks containing both vesicular and tubular structures are shown.



**Fig 4**

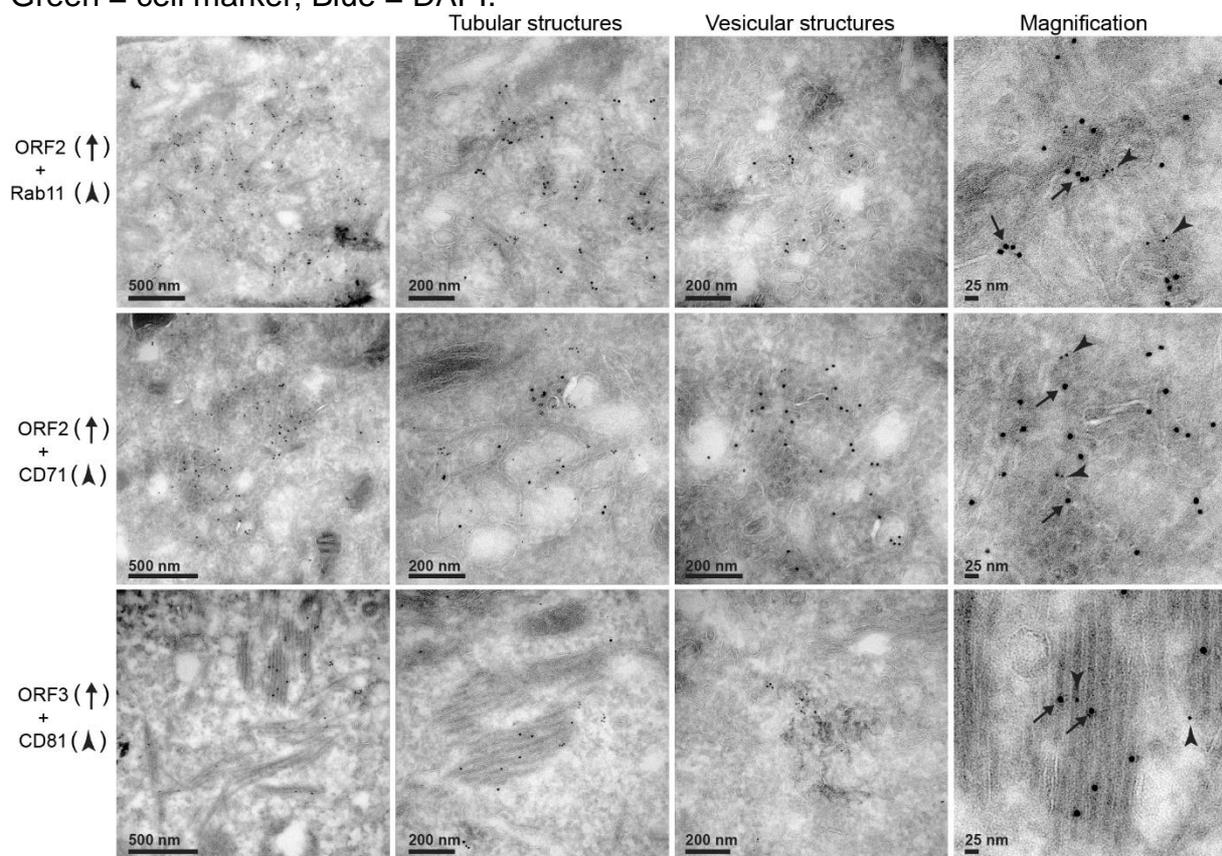
**Fig 4: HEV-induced subcellular structures are dependent on the expression of ORF3 protein and assembly of ORF2 capsid proteins.** Cryosections of PLC3/HEV (A), PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 (B) and PLC3/HEV-5R/5A (C) cells were processed for double immunogold labeling with anti-ORF2 (visualized by 6 nm gold particles) and anti-ORF3 (visualized by 10 nm gold particles) antibodies, as indicated. Cryosections were next analyzed by EM. ORF2 proteins are indicated by black arrows and ORF3 proteins by arrowheads. N, nucleus. Representative confocal images of double-stained cells are shown on the left. HEV- $\Delta$ ORF3 is an ORF3-null mutant. HEV-5R/5A is an ORF2 assembly mutant.



**Fig 5**

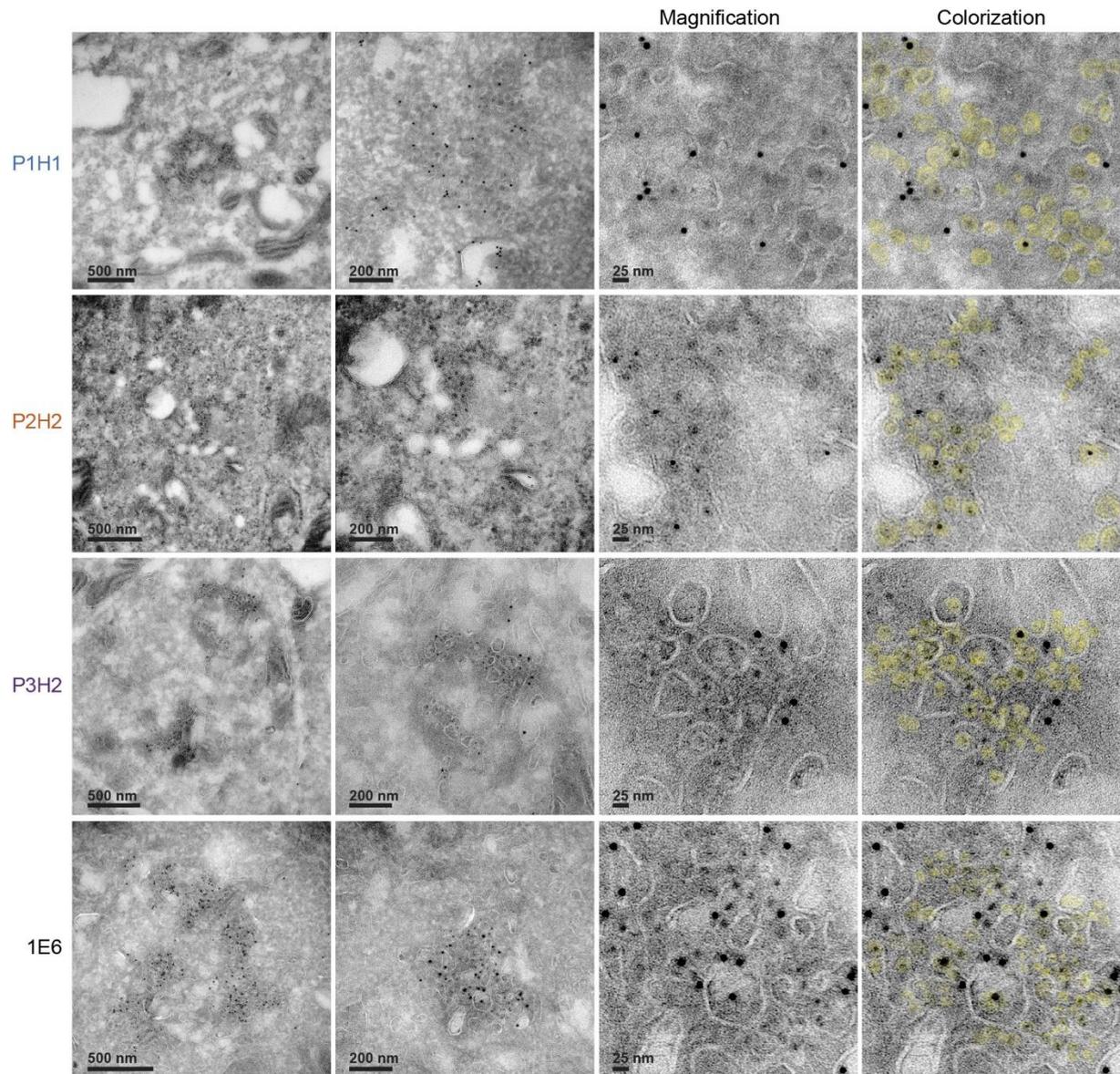
**Fig 5: Colocalization analysis of the ORF2i protein with different cell markers.** PLC3/HEV and PLC3/HEV-ΔORF3 cells were fixed, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and double-stained with P1H1 and anti-cell markers antibodies, as indicated. (AD Á T æ} ΔOverlap Coefficients (MOC) of ORF2 and cell marker labeling ( $n > 30$ )

cells). Co-staining showing a low MOC are in light grey and those showing a medium MOC are in middle grey. Co-staining of PLC3/HEV cells showing a MOC > 0.4 are in dark grey and representative confocal images are shown in **(B, Top)**. The co-staining of PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells with P1H1 and antibodies directed against markers of recycling compartment are also shown in **(B, bottom)**. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 $\mu$ m. PLC3/HEV cells double-stained with P1H1 and anti-Rab11 **(C)**, anti-CD71 **(D)** or anti-MICAL-L1 **(E)** antibodies were next analyzed by confocal microscopy with a high resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using Imaris are shown to better visualize the stained substructures. In the middle, z-stacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of ORF2i and Rab11/CD71/MICAL-L1 staining measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Scale bars show the indicated length. Red = ORF2; Green = cell marker; Blue = DAPI.



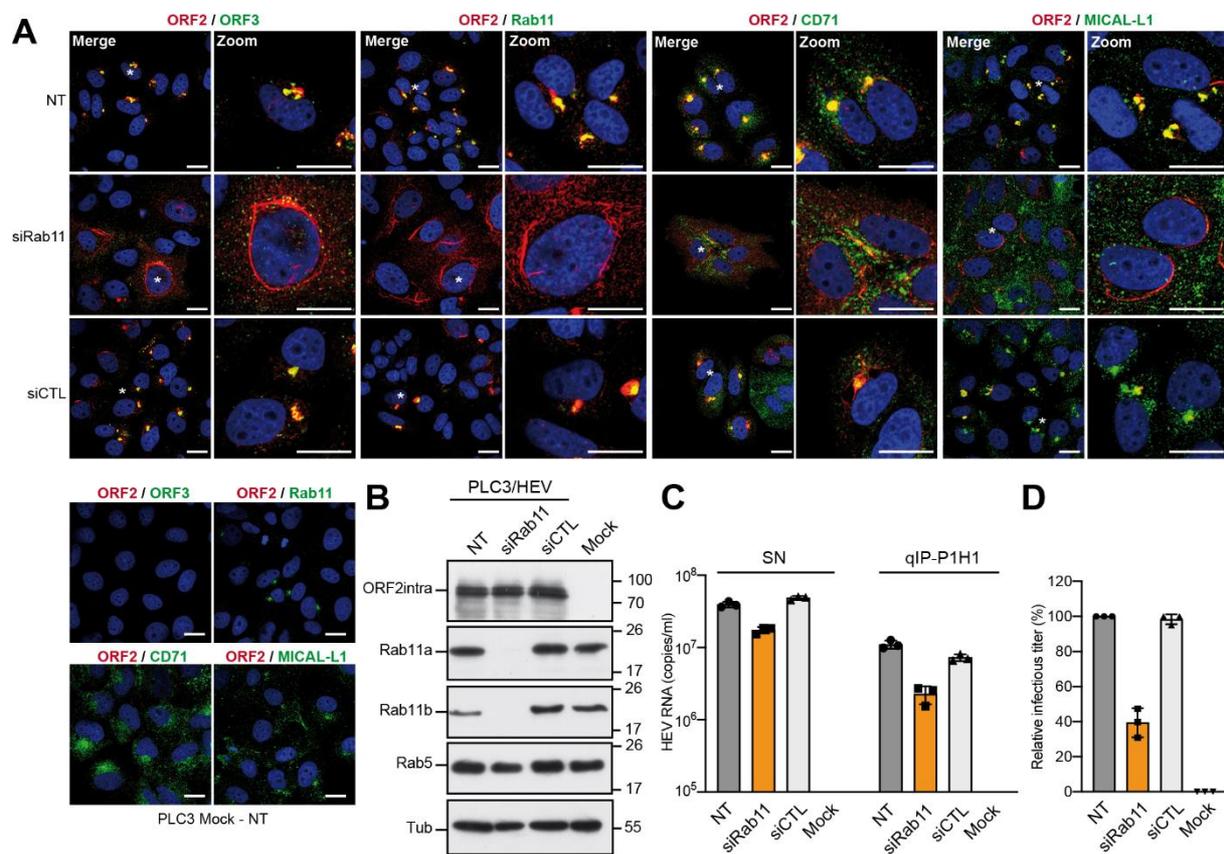
**Fig 6**

**Fig 6: EM analysis of the co-distribution of ORF2 and ORF3 proteins with cell markers.** Cryosections of PLC3/HEV cells were processed for double immunogold labeling with anti-ORF2 or anti-ORF3 (visualized by 10 nm gold particles) and anti-Rab11, anti-CD71 or anti-CD81 (visualized by 6 nm gold particles) antibodies, as indicated. Cryosections were next analyzed by EM. ORF2 and ORF3 proteins are indicated by black arrows and cell markers by arrowheads.



**Fig 7**

**Fig 7: Visualization of intracellular HEV like-particles.** Cryosections of PLC3/HEV cells were immunogold-labelled with the indicated antibodies and analyzed by EM. On the right column, particles were highlighted by colorization in yellow.



**Fig 8**

**Fig 8: Effect of Rab11 silencing on protein expression and HEV particle secretion.** PLC3/HEV cells were transfected with siRNA targeting Rab11a and Rab11b (siRab11), with a nontargeting siRNA control (siCTL) or left non-transfected (NT). Non-transfected PLC3 mock were used as controls. At 72h post-transfection, cells were analyzed by IF (**A**) and WB (**B**) using the indicated antibodies. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20am. Red = ORF2 stained by P1H1; Green = ORF3 or cell marker; Blue = DAPI. (**C**) Quantification of HEV RNA in SN of transfected cells was performed by direct RT-qPCR (SN) and after IP with the P1H1 antibody (qIP-P1H1). (**D**) Production of infectious particles in SN of transfected cells was evaluated by viral titration. Results are shown as relative infectious titer (in %) related to NT supernatant.

## Supplementary results

Since no efficient cell culture model of HEV gt1 is currently available, we used a heterologous expression system to compare antibody recognition towards gt1 and gt3 ORF2 proteins. Sar55 (gt1) and p6 (gt3) ORF2 sequences were cloned into pTM plasmids and expressed in Huh-7 cells stably expressing the T7 RNA-polymerase (H7-T7-IZ cells) [1]. As shown in **Fig. S1**, although the ORF2-gt3 pattern was different from that observed in infectious system, the ORF2 recognition pattern for each antibody was similar for gt1 and gt3 ORF2-expressing cells. These results indicate that antibodies recognized ORF2 proteins from HEV-gt1.

## Supplementary Materials and methods

**Cells.** The Huh-7-derived H7-T7-IZ cells stably expressing the T7 RNA polymerase ([1]; kindly provided by Ralf Bartenschlager, University of Heidelberg, Germany) were maintained in a medium supplemented with 50 µg/ml of Zeocin. They were used for the transfection of the T7 promoter-driven pTM expression vectors.

**Plasmids and transfection.** The plasmid pTM-ORF2-HEV-gt3 was kindly provided by J. Gouttenoire (University of Lausanne, Switzerland) [2]. The plasmid pTM-ORF2-HEV-gt1 was generated by cloning the Sar55 strain ORF2 sequence into the multiple cloning site of pTM plasmid. The pTM plasmids were transfected into H7-T7-IZ cells according to the manufacturer's recommendations.

## Supplementary Figure legends

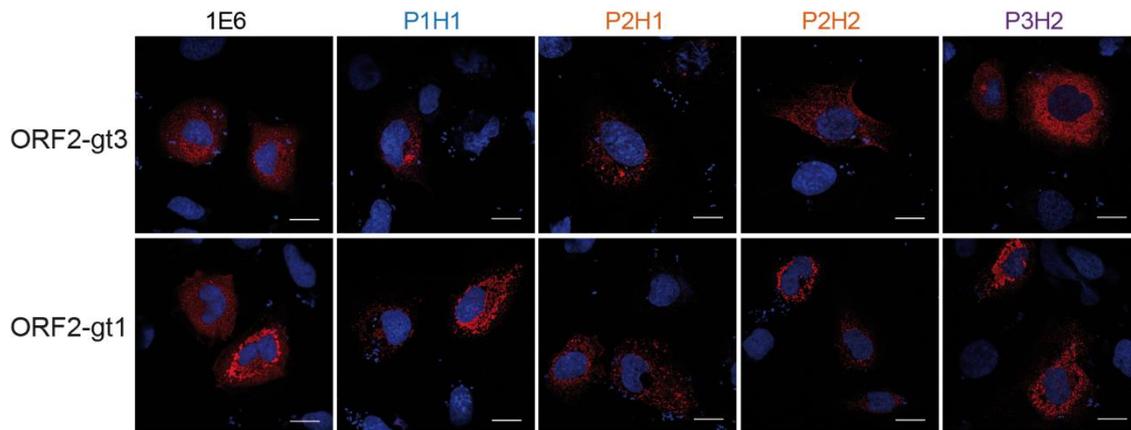


Fig S1

**Supplementary Figure 1: Antibody recognition of gt1 and gt3 ORF2 protein.** H7-T7-IZ cells transfected with pTM plasmid expressing p6 strain ORF2 (ORF2-gt3) or Sar55 strain ORF2 (ORF2-gt1) were fixed at 16h post-transfection, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and stained with indicated anti-ORF2 antibodies. Staining were analyzed by confocal microscopy. Red = ORF2; Blue = DAPI. Scale bar, 20am.

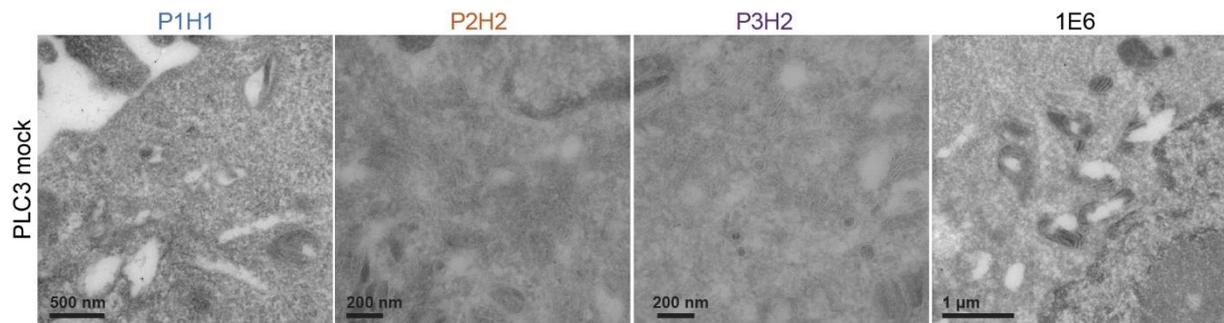
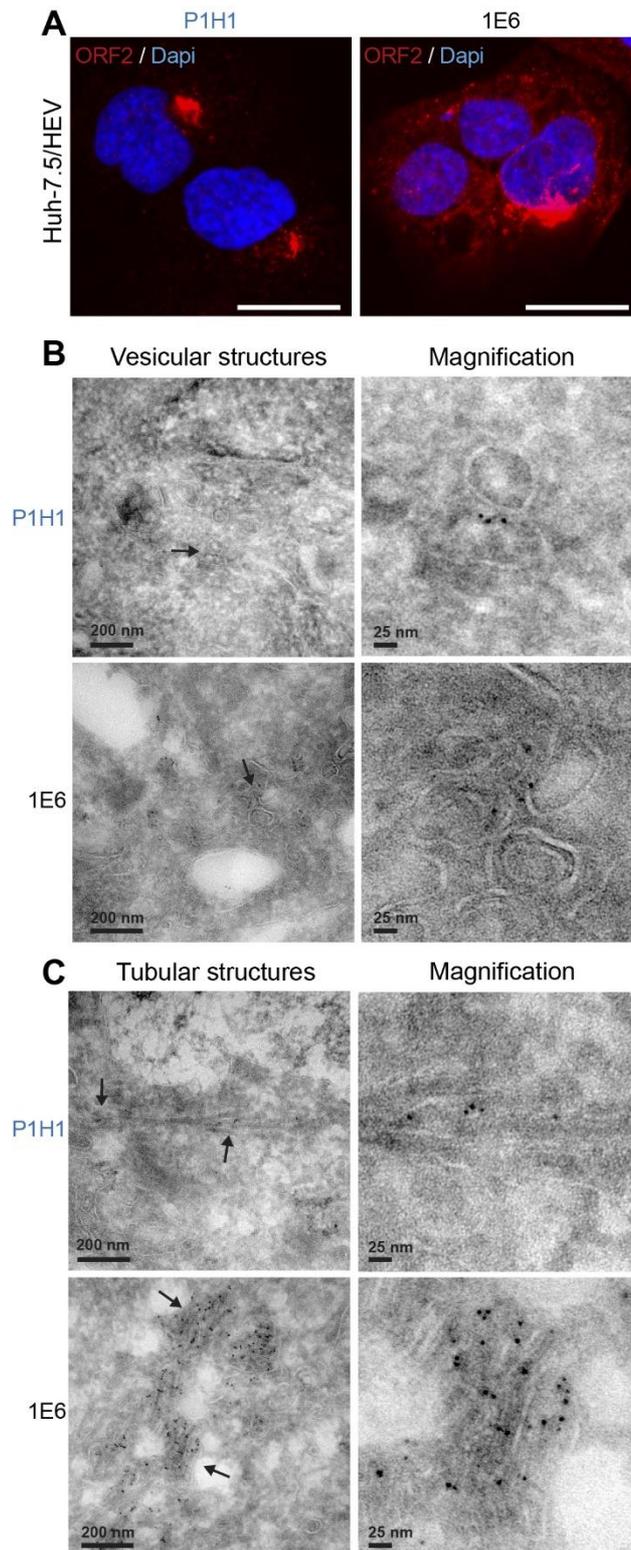


Fig S2

**Supplementary Figure 2: Immunogold labeling of PLC3 mock cells.** Cryosections of PLC3 mock cells were immunogold-labelled with the indicated antibodies and analyzed by EM.



**Fig S3**

**Supplementary Figure 3: Identification of HEV-induced vesicular and tubular structures in HEV-producing Huh-7.5 cells.** (A) Huh-7.5/HEV cells were fixed, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and stained with P1H1 or 1E6 antibodies. Red = ORF2; Blue = DAPI. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20am. In (B) and (C), cryosections of Huh-7.5/HEV cells were processed for immunogold labeling with P1H1 or 1E6 antibodies (visualized by 6 nm gold particles), as indicated. Cryosections were next analyzed by EM.

Vesicular (A) and Tubular (B) structures containing ORF2 proteins are indicated by black arrows.

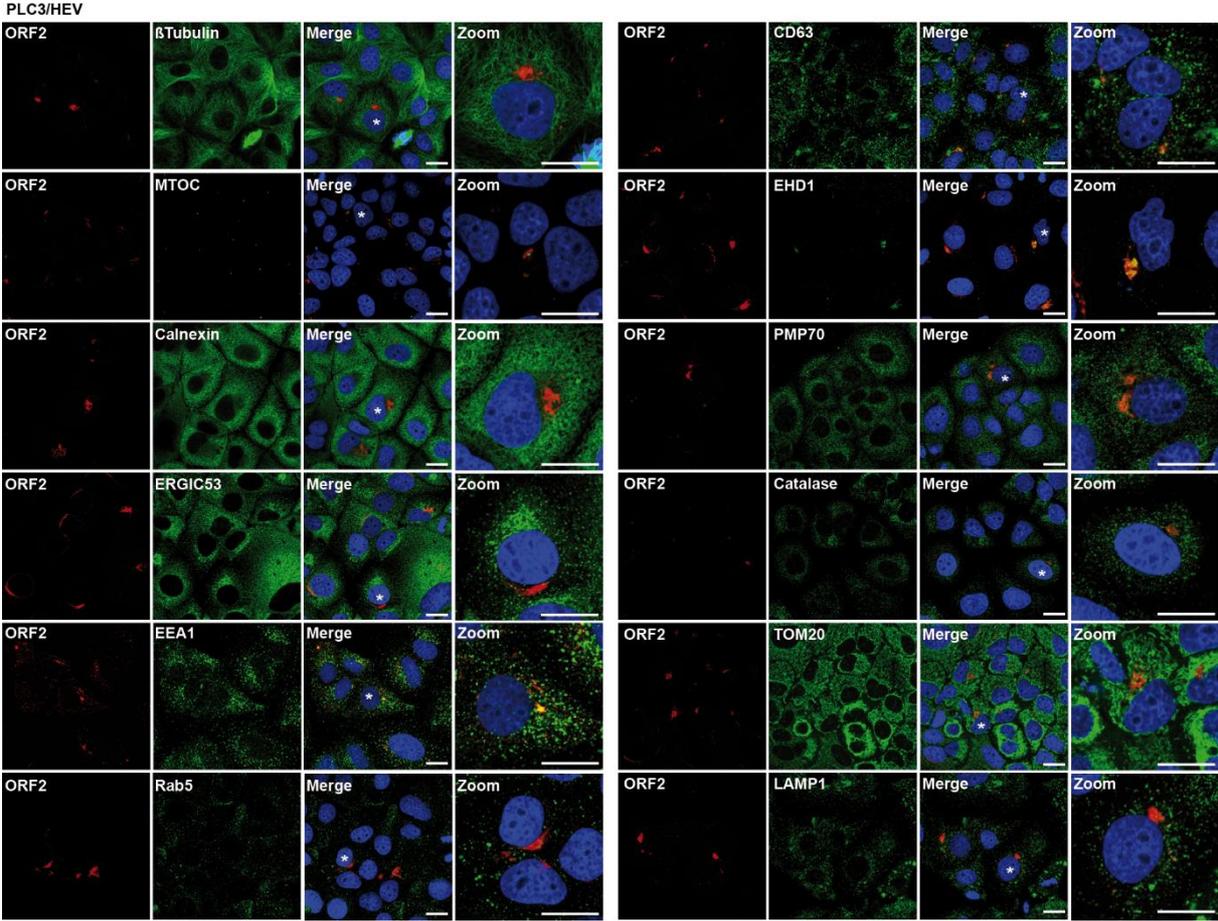
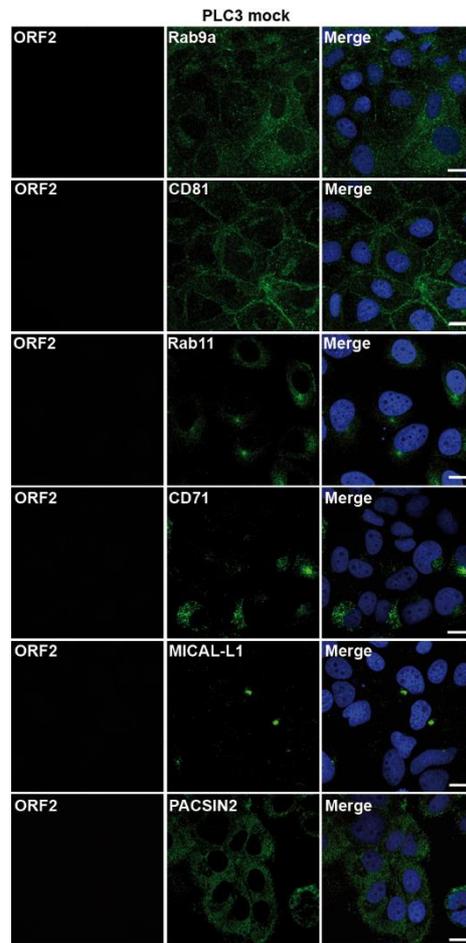


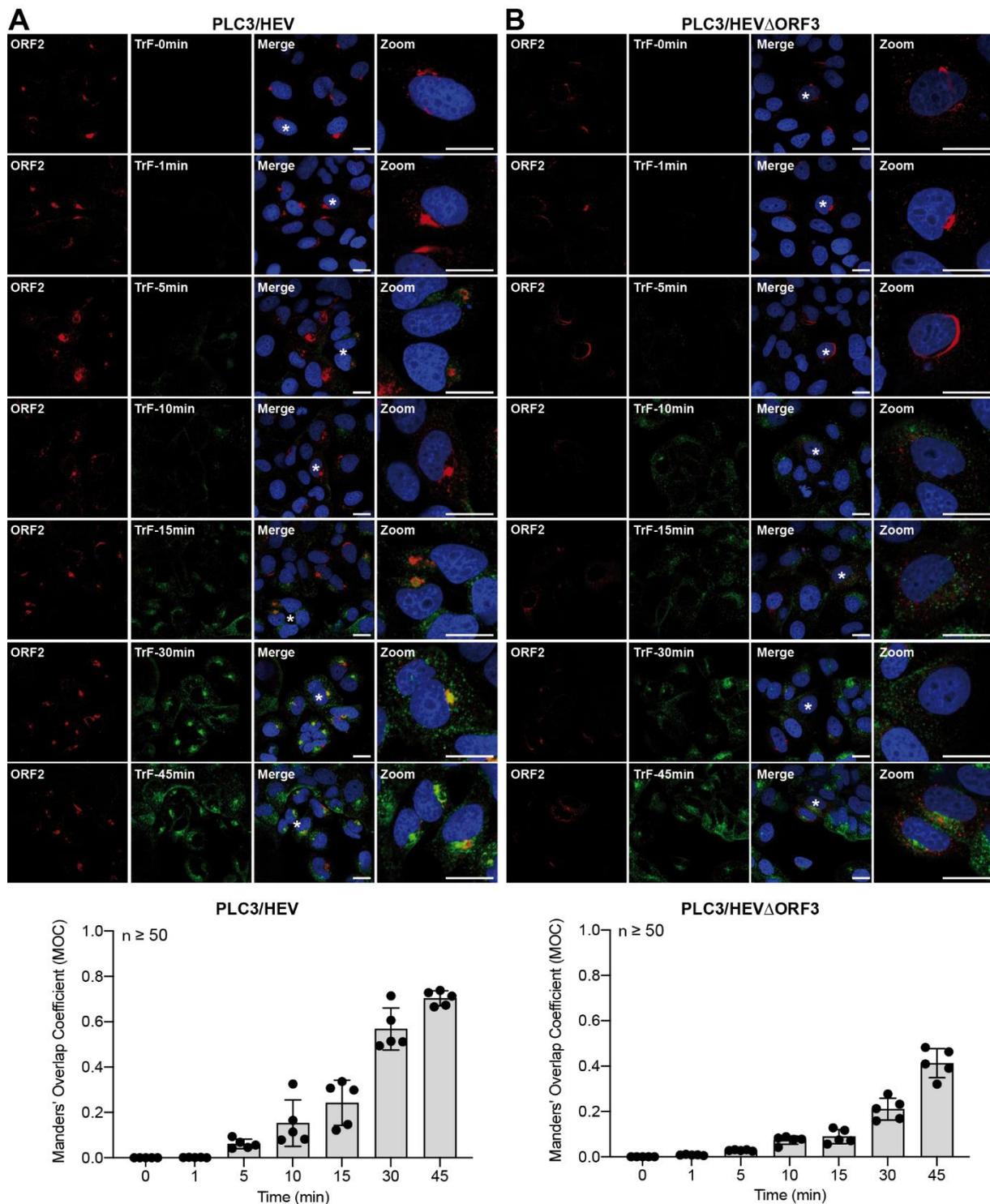
Fig S4

**Supplementary Figure 4: Colocalization analysis of the ORF2i protein with different cell markers in PLC3/HEV cells.** PLC3/HEV cells were fixed, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and double-stained with P1H1 and anti-cell markers antibodies, as indicated. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 $\mu$ m.



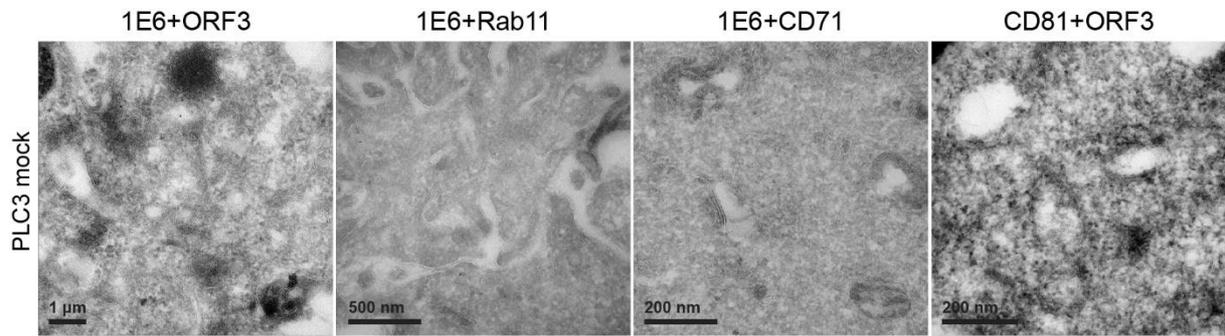
**Fig S5**

**Supplementary Figure 5: Colocalization analysis of the ORF2i protein with different cell markers in PLC3 mock cells.** PLC3 mock cells were fixed, permeabilized with Methanol and TX-0.5% and double-stained with P1H1 and anti-cell markers antibodies, as indicated. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20am.



**Fig S6**

**Supplementary Figure 6: Kinetics of colocalization of the ORF2i protein with transferrin.** PLC3/HEV (**A**) and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 (**B**) cells were incubated with fluorochrome-conjugated transferrin (TrF) at 37°C and fixed at indicated times. Cells were next permeabilized and stained with the P1H1 antibody. Red = ORF2; Green = transferrin; Blue = DAPI. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 $\mu$ m. (BD  $\hat{A}$  T  $\hat{x}$ )  $\hat{a}$   $\hat{!}$  q  $\cdot$   $\hat{A}$  U  $\hat{c}$   $\hat{!}$  |  $\hat{x}$ ]  $\hat{A}$   $\hat{O}$  [  $\hat{\wedge}$   $\hat{\sim}$   $\hat{\sim}$  of ORF2 with TrF (n  $\pm$  50 cells).



**Fig S7**

**Supplementary Figure 7: Double-immunogold labeling of PLC3 mock cells.** Cryosections of PLC3 mock cells were processed for double immunogold labeling with anti-ORF2 or anti-ORF3 (visualized by 10 nm gold particles) and anti-Rab11, anti-CD71 or anti-CD81 (visualized by 6 nm gold particles) antibodies, as indicated. Cryosections were next analyzed by EM.

**Supplementary Table 1: Primary antibodies used in Western-blot (WB), immunofluorescence (IF) and immunogold (IG) experiments.**

Name	Target / Epitope	Host	Isotype	Source	Reference	Ab Registry	WB	IF	IG
P1H1	ORF2i GQPSGRRRRGRRSSG	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P2H1	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG2a	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P2H1	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG1	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P3H2	ORF2i/g/c SRVVIQDYDNQHEQDR	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
1E6	ORF2i/g/c GDSRVVIQDYDNQHEQ DRTPSPA	Mouse	IgG2b	Millipore	MAB8002	AB_827236	1/2000	1/800	1/100
ORF3	ORF3 ANPPDHSAPLGVTRPSA PPLPHVVDLPQLGPRR	Rabbit	pAb	S. Emerson	[3]	n/a	n/a	1/1000	1/100
Tub	V-tubulin C-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5201	AB_609915	1/1000	1/100	n/a
MTOC	[-tubulin N-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5326	AB_532292	n/a	1/500	n/a
Calnexin	Human Calnexin	Rabbit		Abcam	ab22595	AB_2069006	n/a	1/1000	n/a
ERGIC53	ERGIC 53kDa protein	Mouse	IgG1	Enzo Life Sciences Inc	ALX-804-602-C100	AB_2051363	n/a	1/100	n/a
EEA1	Early Endosome Antigen 1	Mouse	IgG1	Transduction Laboratories	610457	AB_397830	n/a	1/500	n/a
Rab5	Rab5	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#3547	AB_2300649	1/1000	1/200	n/a
Rab9a	Rab9a	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#5118	AB_10621426	n/a	1/50	n/a
Rab11	Rab11	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#5589	AB_10693925	n/a	1/50	n/a
Rab11a	Rab11a	Rabbit	(pAb)	ThermoFisher	71-5300	AB_2533987	n/a	n/a	1/10
Rab11a	Rab11a	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab128913	AB_11140633	1/20000	n/a	n/a
Rab11b	Rab11b	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab175925	n/a	1/10000	n/a	n/a
5A6	Tetraspanin CD81 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	S. Levy	[4]	AB_627192	n/a	1/300	1/30
CD63	Tetraspanin CD63 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	BD Pharmingen	556019	AB_396297	n/a	1/500	n/a
CD71	Transferrin receptor	Mouse	IgG1	Santa Cruz Biotechnology	sc-65882	AB_1120670	n/a	1/100	n/a
CD71	Transferrin receptor	Rabbit	pAb	Abcam	ab84036	AB_10673794	n/a	1/1000	1/100
EHD1	Eps15 homology domain protein 1	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab109747	AB_10864800	n/a	1/1000	n/a
MICAL-L1	Molecule Interacting with CasL-like1	Rabbit	IgG	Abcam	ab220648	n/a	n/a	1/100	n/a
PACSIN2	Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 2	Rabbit	IgG	MyBiosource	MBS7114698	n/a	n/a	1/1000	n/a
PMP70	70-kDa Peroxisomal Membrane Protein	Mouse	IgG1	Sigma	SAB4200181	AB_10639362	n/a	1/1000	n/a
Catalase	Catalase	Rabbit	IgG	Cell signaling	#12980	AB_2798079	n/a	1/800	n/a
TOM-20	Translocase of the outer mitochondrial Membrane	Mouse	IgG1	BD Biosciences	612278	AB_399595	n/a	1/100	n/a
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#9091	AB_2687579	n/a	1/200	n/a

## References

- [1] Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens* 2012;8:e1003056. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>.
- [2] Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M, Bawohl M, Honcharova-Biletska H, Kreutzer S, et al. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* 2017;67:471. 9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002>.
- [3] Graff J, Nguyen H, Yu C, Elkins WR, Claire MS, Purcell RH, et al. The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. *Journal of Virology* 2005;79:6680. 9. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.11.6680-6689.2005>.
- [4] Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1990;10:4007. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4007>.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French agency ANRS-Maladies infectieuses émergentes. This work was also supported by the Pasteur Institute of Lille, Région Hauts-de-France, Inserm-transfert and the University of Tours. C.B. and K.H. were supported by a fellowship from the ANRS. C.C. and M.F. were supported by the Pasteur Institute of Lille and Région Hauts-de-France. C.C. was also supported by Inserm-transfert. We thank Suzanne U. Emerson (NIH, USA), Jérôme Gouttenoire (University of Lausanne) and Ralph Bartenschlager (University of Heidelberg) for contribution.

## References

- [1] Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2017;3:17086. <https://doi.org/10.1111/trf.13355>.
- [2] Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Encucuk Lecvk qvpirs ahcCTparksmission Rólitgs.uVgruses 2016;8:270. <https://doi.org/10.3390/v8100270>.
- [3] Horvatits T, Wiesch JS zur, Lütgehetmann M, Lohse AW, Pischke S. The Clinical Perspective on Hepatitis E. *Viruses* 2019;11:61769. <https://doi.org/10.3390/v11070617>.
- [4] Aslan AT, Balaban HY. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroentero* 2020;26:5543660. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543>.
- [5] Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018;15:966110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150>.
- [6] Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier J-C, Saliou J-M, Ankavay M, et al. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* 2018;154:211-223.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>.
- [7] Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, et al. 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* 2018;3:20172134566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115>.
- [8] Hervouet K, Ferrié M, Ankavay M, Montpellier C, Camuzet C, Alexandre V, et al. The fate of Hepatitis E virus capsid protein is regulated by an Arginine-Rich Motif. *Biorxiv* 2021:2021.05.26.445820. <https://doi.org/10.1101/2021.05.26.445820>.
- [9] Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Research* 2019;163:34649. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.007>.
- [10] Ju X, Ding Q. Hepatitis E Virus Assembly and Release. *Viruses* 2019;11:539613. <https://doi.org/10.3390/v11060539>.
- [11] Harak C, Lohmann V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology* 2015;479:418633. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.029>.
- [12] Talmont F, Moulédous L, Baranger M, Gomez-Brouchet A, Zajac J-M, Deffaud C, et al. Development and characterization of sphingosine 1-phosphate receptor 1 monoclonal

antibody suitable for cell imaging and biochemical studies of endogenous receptors. PLoS ONE 2019;14:e0213203-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213203>.

[13] Blight KJ, Mckeating JA, Rice CM. Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* 2002;76:13001614. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13001-13014.2002>.

[14] Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou J-M, Wychowski C, Saas L, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Nature Publishing Group* 2019;9:6243. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42737-2>.

[15] Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, Mather K, Torian U, Engle RE, et al. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *Journal of Virology* 2012;86:56976707. <https://doi.org/10.1128/jvi.00146-12>.

[16] Graff J, Nguyen H, Yu C, Elkins WR, Claire MS, Purcell RH, et al. The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. *Journal of Virology* 2005;79:668069. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.11.6680-6689.2005>.

[17] Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Journal of General Virology* 2014;95:2166675. <https://doi.org/10.1099/vir.0.066910-0>.

[18] Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *Journal of General Virology* 2011;92:269678. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025791-0>.

[19] Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L, Oechslin N, Mauron J, Matter M, et al. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLoS Pathogens* 2018;14:e1007471-24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007471>.

[20] Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J* 1993;12:677682. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05701.x>.

[21] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol Rev* 2011;91:119649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>.

[22] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004;5:121632. <https://doi.org/10.1038/nrm1315>.

[23] Vale-Costa S, Amorim M. Recycling Endosomes and Viral Infection. *Viruses* 2016;8:64629. <https://doi.org/10.3390/v8030064>.

- [24] Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biology* 1996;135:913624. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.913>.
- [25] Stone R, Hayashi T, Bajimaya S, Hodges E, Takimoto T. Critical role of Rab11a-mediated recycling endosomes in the assembly of type I parainfluenza viruses. *Virology* 2016;487:1168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.008>.
- [26] Bhuin T, Roy JK. Rab11 in disease progression. *Int J Mol Cell Medicine* 2015;4:168.
- [27] Guichard A, Nizet V, Bier E. RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:624634. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3325>.
- [28] Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj* 2012;1820:264681. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.009>.
- [29] Hehnly H, Chen C-T, Powers CM, Liu H-L, Doxsey S. The Centrosome Regulates the Rab11- Dependent Recycling Endosome Pathway at Appendages of the Mother Centriole. *Curr Biol* 2012;22:1944650. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.022>.
- [30] Yang Y-L, Nan Y-C. Open reading frame 3 protein of hepatitis E virus: Multi-function protein with endless potential. *World J Gastroentero* 2021;27:2458673. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i20.2458>.
- [31] Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *Journal of Virology* 2017;91. <https://doi.org/10.1128/jvi.00822-17>.
- [32] Glitscher M, Hildt E. Hepatitis E virus egress and beyond ó the manifold roles of the viral ORF3 protein. *Cell Microbiol* 2021:e13379. <https://doi.org/10.1111/cmi.13379>.
- [33] Perttilä J, Spuul P, Ahola T. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *Journal of General Virology* 2013;94:807616. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049577-0>.
- [34] Szkolnicka D, Pollán A, Silva ND, Oechslin N, Gouttenoire J, Moradpour D. Recombinant Hepatitis E Viruses Harboring Tags in the ORF1 Protein. *J Virol* 2019;93. <https://doi.org/10.1128/jvi.00459-19>.
- [35] Surjit M, Jameel S, Lal SK. 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* 2007;81:3339645. <https://doi.org/10.1128/jvi.02039-06>.
- [36] Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *Journal of Virology* 1999;73:4074682.

- [37] Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M, Bawohl M, Honcharova-Biletska H, Kreutzer S, et al. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* 2017;67:47169. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002>.
- [38] Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of Virology* 1997;71:9045653.
- [39] Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang Y-J. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *Journal of Virology* 2009;83:6375682. <https://doi.org/10.1128/jvi.02571-08>.
- [40] Chandra V, Kar-Roy A, Kumari S, Mayor S, Jameel S. The Hepatitis E Virus ORF3 Protein Modulates Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking, STAT3 Translocation, and the Acute-Phase Response  $\nabla$ . *J Virol* 2008;82:7100610. <https://doi.org/10.1128/jvi.00403-08>.
- [41] Emerson SU, Nguyen HT, Torian U, Burke D, Engle R, Purcell RH. Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *Journal of Virology* 2010;84:9059669. <https://doi.org/10.1128/jvi.00593-10>.
- [42] Kenney SP, Wentworth JL, Heffron CL, Meng X-J. Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101. *Virology* 2015;486:1986208. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.012>.
- [43] Hollinshead M, Johns HL, Sayers CL, Gonzalez-Lopez C, Smith GL, Elliott G. Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *The EMBO Journal* 2012;31:4204620. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.262>.
- [44] Collier KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G. Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis C Virus Secretion. *Plos Pathog* 2012;8:e1002466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002466>.

## Abbreviations

aa: amino acid  
ARM: Arginine-Rich Motif  
EEA1: Early Endosome Antigen-1  
EHD: Eps15 homology domain  
eHEV: enveloped HEV  
EM: Electron Microscopy  
ER: Endoplasmic Reticulum  
ERC: Endocytic-Recycling Compartment  
ERGIC: Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment  
ESCRT: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport  
gt: genotype  
HD: Heat-denatured  
HEV: Hepatitis E Virus  
IF: Immunofluorescence  
IG: Immunogold  
IP: Immunoprecipitation  
MICAL-L1: Molecule Interacting with CasL-like1  
T U Ô K Á T æ } O ã N ð Ç coefficient  
MTOC: Microtutule-Organizing Center  
MVB: Multi-Vesicular Bodies  
ORF: Open Reading Frame  
ORF2c: cleaved ORF2  
ORF2g: glycosylated ORF2  
ORF2i: infectious ORF2  
PACSIN2: Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 2  
PMP70: 70-kDa Peroxisomal Membrane Protein  
qIP: immunoprecipitation followed by RT-qPCR  
siRNA: small interfering RNA  
SN: Supernatant  
TRE: Tubular-Recycling Endosome  
TrF: Transferrin  
TX: Triton X-100  
WB: Western Blotting

**Publication 2 : Characterization of the hepatitis E virus  
replicase**

# Characterization of the hepatitis E virus replicase

Karoline Metzger<sup>1†</sup>, Cyrine Bentaleb<sup>1†</sup>, Kévin Hervouet<sup>1</sup>, Virginie Alexandre<sup>1</sup>, Claire Montpellier<sup>1</sup>, Jean-Michel Saliou<sup>2</sup>, Martin Ferrié<sup>1</sup>, Charline Camuzet<sup>1</sup>, Yves Rouillé<sup>1</sup>, Cécile Lecoeur<sup>1</sup>, Jean Dubuisson<sup>1</sup>, Laurence Cocquerel<sup>1</sup>, Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 ó CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>2</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014 - US41 - PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, Lille, France.

† These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

## \* Correspondence:

Dr Cécile-Marie Aliouat-Denis

cecile.aliouat@univ-lille.fr

**Keywords (5-8):** HEV, positive-strand RNA virus, open reading frame 1, ORF1 processing, *Gaussia* Luciferase replicon, epitope tag, RNA hybridization, p6 cell culture system

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the major cause of acute hepatitis worldwide. HEV is a positive-sense RNA virus expressing 3 open reading frames (ORFs). ORF1 encodes the ORF1 non-structural polyprotein, the viral replicase which transcribes the full-length genome and a subgenomic RNA that encodes the structural ORF2 and ORF3 proteins. The present study is focused on the replication step with the aim to determine whether the ORF1 polyprotein is processed during the HEV lifecycle and to identify where the replication takes place inside the host cell. As no commercial antibody recognizes ORF1 in HEV-replicating cells, we aimed at inserting epitope tags within the ORF1 protein without impacting the virus replication efficacy. To achieve this, a Kernow C-1 p6 replicon where the *Gaussia* luciferase reporter gene lies under the control of ORF1 was used. Two insertion sites located in the hypervariable region were thus selected to tolerate the V5 epitope while preserving HEV replication efficacy. Once integrated into the infectious full-length p6 strain, the V5 epitopes did neither impact the replication of genomic nor the production of subgenomic RNA. Also, the V5-tagged viral particles remained as infectious as the wildtype particles to Huh-7.5 cells. Next, the expression pattern of the V5-tagged ORF1 was compared in the p6 replicon, p6 cell culture and heterologous expression systems. A high molecular weight protein (180 kDa) that is expressed in all 3 systems and that likely corresponds to the unprocessed form of ORF1 could be detected up to 25 days after electroporation in the p6 cell culture system. Additionally, less abundant products of lower molecular weights were also detected in all systems, both in cytoplasmic and nuclear compartments. Concurrently, the V5-tagged ORF1 was localized by confocal microscopy inside the cell nucleus but also as compact perinuclear substructures in which ORF2 and ORF3 proteins were detected. Simultaneous detection of HEV genomic and subgenomic HEV RNA by fluorescence *in situ* hybridization (RNAscope®) and viral proteins by immunofluorescence identified candidate HEV replication complexes.

## Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is one of the leading causes of acute hepatitis worldwide (WHO, 2021). Amongst the 20 million infections estimated by WHO every year, 3.3 million cases are symptomatic. Although HEV infection is usually self-resolving in the general population with a mortality rate of 0.5-to-4% due to fulminant hepatitis, the immunocompromised patients, mainly organ transplant recipients, may suffer from chronic hepatitis and cirrhosis (Lhomme et al., 2020). Elevated mortality rates (up to 25%) have also been recorded among pregnant women in developing countries as well as in patients with pre-existing liver diseases (Pérez-Gracia et al., 2017; Lhomme et al., 2020; Webb and Dalton, 2020). In addition, both chronic and acute HEV infections can lead to neurological disorders or kidney injuries and impaired renal function (Lhomme et al., 2020; Webb and Dalton, 2020).

HEV is classified in the Hepeviridae family and the 4 genotypes (gt 1-gt 4) that account for most of the human infections, are included within the Orthohepevirus A genus (Smith and Simmonds, 2018). HEV gt 1 and 2 are transmitted from human-to-human through fecal-oral route and can cause large, primarily waterborne outbreaks in resource-limited settings. Ingestion of undercooked swine or game meat is the primary mode of zoonotic transmission of HEV gt 3 and 4 in middle- and high-income areas (Kamar et al., 2017).

The HEV genome is a positive-sense, 5'-capped, single-stranded RNA of ~7.2 kb in length. It is organized into 3 open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2, and ORF3 (Wang and Meng, 2021). ORF1 encodes the ORF1 nonstructural polyprotein, which contains several functional domains essential for viral replication. ORF2 encodes the ORF2 viral capsid protein, which is involved in particle assembly, binding to host cells and eliciting neutralizing antibodies (Schofield et al., 2000; Shiota et al., 2013). ORF3 encodes a small multifunctional phosphoprotein involved in virion morphogenesis and egress (Ding et al., 2017; Gouttenoire et al., 2018). ORF2 and ORF3 are partially overlapping and the corresponding proteins are translated from a sub-genomic RNA of 2.2 kb in length (**Figure 1A**, Graff et al., 2006).

ORF1 is the largest ORF in the viral genome and encodes a non-structural polyprotein where several domains have been bioinformatically assigned based on homology with Rubi-like viruses, *i.e.* *Rubivirus*, *Betateravirus* and *Benyvirus* (Koonin et al., 1992). Although several domains such as methyltransferase (Met), helicase (Hel) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) have been reported to be enzymatically active, the function of the Y and X-domains as well as the highly disordered hypervariable region (HVR) remain elusive (Wang and Meng, 2021) (**Figure 1B**). In addition, the precise location of the protease region (known as papain-like cysteine protease, PCP) and its enzymatic activity are still a matter of debate (LeDesma et al., 2019; Proudfoot et al., 2019). Whether or not the HEV polyprotein gets processed by the PCP or other cellular proteases remains a difficult question to address considering the low expression level of the polyprotein in HEV cell culture systems as well as

the scarcity of functional specific antibodies (Debing et al., 2016; Lenggenhager et al., 2017; Nimgaonkar et al., 2018; Kenney and Meng, 2019).

In this study, we sought to characterize the ORF1 replicase. The insertion of epitope tags into the HEV replicase came to us as the best strategy to track the polyprotein inside the host cell and identify its potential cleavage products. The HVR was chosen based on amino acid (aa) ORF1 sequence alignments as well as its capacity to tolerate inserted fragments arising either from duplication of viral genome or from human genes (Shukla et al., 2011, 2012; Nguyen et al., 2012; Johne et al., 2014; Lhomme et al., 2014). Additionally, the HVR region of the HEV83-2-27 strain of gt 3 has been recently reported to tolerate the insertion of an HA epitope and a small luciferase reporter gene (Szkolnicka et al., 2019). In our study, we attempted to insert V5 or HA epitopes into the HVR of gt 3 Kernow C-1 p6 strain, taking advantage of the homology existing between the HEV and V5 epitope aa sequences and also of a naturally occurring insertion in the HEV genome (Nguyen et al., 2012) (**Figure 1C**). At first, a p6-GLuc replicon expressing the *Gaussia Luciferase (GLuc)* reporter gene under the control of the epitope tagged-ORF1 was used to select insertion sites that did not impact replication efficacy (Shukla et al., 2012; Emerson et al., 2013). Two positions located into the HVR were selected as the V5 insertions did neither impact the *Gaussia* luciferase secretion nor the transcription of genomic and subgenomic viral RNA. Also, the V5-tagged viral particles remained as infectious as the wildtype particles to Huh-7.5 cells. Next, the expression of the selected epitope-tagged ORF1 was analyzed in the p6-GLuc replicon, heterologous and p6 cell culture systems. The full-length ORF1 protein as well as less abundant products of lower molecular weight were detected in all systems, both in cytoplasmic and nuclear compartments. Simultaneous detection of HEV genomic and sub-genomic HEV RNA by fluorescence *in situ* hybridization (RNAscope®) and ORF1 protein by immunofluorescence identified candidate HEV replication complexes as compact perinuclear nuggets in which ORF2 and ORF3 proteins were also detected. Finally, partial co-localization of viral proteins with cellular markers of the endocytic recycling compartment (ERC) unveiled the composition of the HEV replication complex.

## Materials and methods

### Plasmids

The plasmid pBlueScript SK (+) carrying the DNA of the full-length genome of HEV gt 3 Kernow C-1 p6 strain (GenBank accession number JQ679013) was kindly provided by Dr S.U. Emerson (**Figure 1A**). The HEV p6-wt-GLuc replicon, constructed from the HEV gt 3 Kernow C-1 p6 strain was also obtained from Dr Emerson (**Figure 1B**). This replicon possesses a *Gaussia Luciferase (GLuc)* reporter gene that substitutes the 5' part of the ORF2 gene and most part of the ORF3 gene (Shukla et al., 2012; Emerson et al., 2013). A p6-GAD-GLuc mutant replicon in which the ORF1 polymerase active site GDD was mutated to GAD to prevent any replication was used as a negative control (Emerson et al., 2013).

The plasmids pTM-ORF1, pTM-ORF3/2 and pTM empty vector were kindly provided by Dr J. Gouttenoire from the University of Lausanne (Switzerland) and have been previously described (Lenggenhager et al., 2017). The pTM-ORF1 vector contains the full-length sequence of the ORF1 protein. The pTM empty vector, was used as a negative control.

### Epitope tag insertions

Two different epitopes (HA and V5) were inserted in 3 different positions of the ORF1 sequence (**Figure 1C**). The pBlueScript SK(+) harboring the p6-GLuc replicon was used as a template. Sequences of the primers used to make the tagged ORF1 constructs can be found in **Table 1**. Prior to the fusion PCR step, DNA fragments located upstream and downstream to the epitope insertion sites were amplified by PCR using the Q5<sup>®</sup> High-Fidelity 2 × Master Mix (NEB) with relevant primers (**Table 1**) on a ProFlex PCR system (Life Technologies). After purification, fragments were ligated by performing a fusion PCR. The fused fragments were amplified by another PCR using the relevant external primer pairs (**Table 1**). Next, pBlueScript SK(+) harboring the p6-GLuc / p6 genomes or pTM-ORF1 vectors and epitope-tagged inserts were restricted by the suitable restriction enzymes (**Table 1**) and subsequently ligated using the T4 DNA ligase (NEB). Finally, *E. coli* (strain TOP10) were transformed with the ligated plasmid, selected clones were grown overnight at 37°C under agitation and the plasmid DNA was extracted and purified using the NucleoSpin plasmid Mini or Midi kit (Macherey-Nagel).

### Capped mRNA synthesis

First, the plasmid DNA of p6-GLuc and p6 constructs were linearized using the MluI restriction enzyme (NEB). Next, the DNA was mixed with sodium acetate (3 M, pH 5.5) and chloroform/isoamyl alcohol

(96v :4v) and centrifuged at 14,000 rpm for 4 min. Following precipitation with absolute ethanol, the DNA was washed twice with 70% ethanol, dried and suspended in RNase free water. The capped mRNAs were synthesized by *in-vitro* transcription of the MluI-linearized DNA according to the mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) procedure and stored at -80°C before electroporation in PLC3 cells.

### **Cell culture and transfection**

PLC3 cells are a subclone of the PLC/PRF/5 (CRL-8024) hepatoma cells and were characterized as highly replicative and productive cell line for HEV (Montpellier et al., 2018). PLC3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ThermoFisher Scientific) containing 10% inactivated fetal calf serum and 1% non-essential aa (ThermoFisher Scientific, DMEM complete).

Capped mRNA of either luciferase p6 replicons (p6-wt-GLuc, p6-GAD-GLuc mutant replicons and HA- or V5-ORF1-tagged p6-GLuc replicons, named as p6-H1-GLuc, p6-H2-GLuc, p6-V1-GLuc and p6-V2-GLuc) or p6 infectious strains (p6-wt and V5-tagged ORF1 p6 constructs named as p6-V1 and p6-V2) were electroporated in PLC3 cells as follows. After trypsinization, cells were suspended in DMEM complete medium and washed twice in Opti-MEM medium (ThermoFisher Scientific). Three million cells were electroporated with 10 µg of RNA and suspended in DMEM complete medium.

Huh-7.5 cells (RRID:CVCL\_7927) are hepatoma cells derived from Huh-7 cells (Blight et al., 2002). They were grown and electroporated with the luciferase p6 replicons as described above.

Electroporated PLC3 or Huh-7.5 cells were treated with the HEV-replication inhibitor sofosbuvir (Selleck Chemicals) at 20 µM final concentration as previously published (Dao Thi et al., 2016; Farhat et al., 2018).

Huh-7-derived H7-T7-IZ cells (Romero-Brey et al., 2012) stably expressing the T7 RNA polymerase were kindly provided by Dr R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany). H7-T7-IZ cells were maintained in a DMEM completed medium supplemented with 50 µg/ml of Zeocin (InvivoGen) and used for transfection of the T7 promoter-driven pTM expression vectors. The pTM plasmids were transfected into H7-T7-IZ cells using TransIT<sup>®</sup>-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio LLC) following the manufacturer's recommendations.

### **Luciferase assay**

The electroporated cells were seeded in 24-well plates (80,000 cells/well) and incubated for 5 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The supernatants were sampled at 1, 3, 4 and 5 days post-electroporation (dpe) and stored at -20°C until luminometer reading.

The supernatants were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min and next, the samples were diluted 1:100 in 1× passive lysis buffer (Promega) and 5 µl were transferred into a white Nunc 96-well plate. At 1 s after injection of 20 µl of the substrate solution (Renilla Luciferase Assay System, Promega), relative light units (RLUs) were acquired on a Centro XS<sup>3</sup> LB 960 luminometer (Berthold Technologies) during 10 s.

### **Quantification of viral RNA**

After electroporation of PLC3 cells with the p6 luciferase replicons or the infectious p6 strains, total RNA was extracted from cellular supernatants (QIAamp Viral RNA Mini kit, Qiagen) or cells (NucleoSpin RNA plus kit, Macherey-Nagel) at different time post-electroporation (4 hpe – 7 dpe). The RNA was next converted to cDNA by using a polydT primer and following the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit instructions (Agilent Technologies). In order to quantify the HEV genome, a standard curve was prepared by diluting the *in vitro*-transcribed HEV p6 plasmid in total RNA extracted from mock electroporated PLC3 cells. For the quantification of intra- and extra-cellular HEV RNA, primers and probes were designed against genomic and sub-genomic RNA according to previously published literature (**Table 1**) (Jothikumar et al., 2006; Yin et al., 2017; Ding et al., 2018). The viral RNA copy numbers were quantified by qPCR (TaqMan Gene Expression Assay, MGB-FAM-dye, ThermoFisher Scientific) using the QuantStudio3 Thermocycler (Applied Biosystems).

### **Cell lysis, subcellular fractionation and immunoblotting**

The cells were lysed in B1 buffer (100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X100, 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS) including 1 mM PMSF and 1× of protease inhibitors (cOmplete™ protease inhibitor cocktail, Roche) and stored at -20°C in 1× Laemmli buffer until usage. Subcellular fractionation was performed using the subcellular protein fractionation kit for cultured cells following the supplier instructions (ThermoFisher Scientific).

The samples were heated at 70°C for 10 min and then loaded on a 8% SDS-PAGE gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham). The membrane was incubated in blocking buffer (PBS 1× with 5% milk and 0.2% Tween-20) for 1 h at RT under constant shaking. The

primary antibody (**Table 2**) was incubated overnight at 4°C under constant shaking in 1×PBS containing 0.2% Tween-20 and 2% BSA. The membrane was washed 3 times with a solution of 1×PBS and 0.2% Tween-20, which was followed by an incubation with a suited peroxidase-conjugated secondary antibody in blocking buffer for 45 min at RT. The membrane was washed again 3 times. Finally, the proteins were detected by chemiluminescence using the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Life Technologies) and a developer.

### **Infectious Titers**

After electroporation of PLC3 cells with p6-wt, p6-V1 or p6-V2 RNA or PBS,  $1 \times 10^6$  were seeded into T-75 flasks in DMEM complete medium. Eight hours after seeding, the medium was changed to HEV medium: DMEM/M199 (1v:1v), 1 mg/ml of lipid-rich albumin (AlbuMAX™ I Lipid-rich BSA, ThermoFisher Scientific), 1% non-essential aa and 1% pyruvate sodium (ThermoFisher Scientific). Then, the HEV producing cells were incubated at 32°C and 5% CO<sub>2</sub> for 10 days.

Next, Huh-7.5 cells seeded into 96-well plates (8,000 cells/well) were infected with undiluted and serially diluted supernatants from HEV-producing cells. The inoculum was removed after 8 h and cells were overlaid with fresh medium. Three days post-infection at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence with anti-ORF2 antibody 1E6 (Millipore). For confocal microscopy analysis, Huh-7.5 cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates and infected with 500 µl of undiluted infectious cell supernatant.

### **Indirect immunofluorescence**

Cells were first fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min, washed three times with 1×PBS, then permeabilized for 5 min with cold methanol and subsequently with 0.5% Triton X-100 for 30 min. Cells were incubated with 10% goat serum diluted in 1×PBS for 30 min at RT and then stained with primary antibodies (**Table 2**) for 30 min at RT followed by three washes with 1×PBS and then incubated with a suited secondary antibodies for 20 min at RT. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1:500) was used to stain the nuclei. Finally, coverslips were mounted with Mowiol®4-88 (Calbiochem) on glass slides. Cells were analyzed using an LSM880 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a ×63/1.4 numerical aperture oil immersion lens. The images were next processed using the ImageJ and Fiji softwares.

Colocalization studies were performed by calculating the Pearson's Correlation Coefficient (PCC) using the JACoP plugin of ImageJ and Fiji softwares. The PCC examines the relationship between the intensities of pixels from two channels in the same image. Twenty-to-thirty whole cells or regions of interest (ROI) were analyzed to calculate the PCC mean. A PCC of 1 indicates perfect correlation, 0 no correlation, and -1 a perfect anti-correlation.

### **Immunoprecipitations**

Immunoprecipitations (IP) were performed with cell lysates of either electroporated PLC3 cells (3 dpe) or transfected H7-TZ-IZ cells (1 dpt). Protein G sepharose beads (GE Healthcare, 40 µl per IP) were equilibrated in B1 lysis buffer by washing and centrifuging them at 6,000 rpm at 4°C. The beads were then incubated with the target specific antibody in B1 buffer overnight at 4°C on a spinning wheel. The cell lysates were pre-cleared with 40 µl of beads without specific antibodies for 30 min on a spinning wheel. Next, the pre-cleared cell lysates were added to the antibody-bound beads for 2 h at RT. After this, the beads were washed 6 times with 1× PBS containing 0.5% NP-40. The samples were heated for 10 min at 70°C and loaded on a 8% SDS-PAGE gel.

### **Mass spectrometry analysis**

NanoLC-MS/MS analyses of the protein digests were performed on a UltiMate-3000 RSLCnano System coupled to a Q-Exactive instrument (Thermo Fisher Scientific), as previously described. Collected raw data were processed and converted into \*.mgf peak list format with Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). MS/MS data were interpreted using search engine Mascot (version 2.4.0, Matrix Science) with a tolerance on mass measurement of 0.2 Da for precursor and 0.2 Da for fragment ions, against a composite targetdecoy database (40584 total entries) built with Swissprot *Homo sapiens* database (TaxID=9606, 20 May 2016, 20209 entries) fused with the sequences of ORF1 (p6\_AFD33683) and a list of classical contaminants (119 entries). Carbamidomethylation of cysteine residues, oxidation of methionine residues, protein N-terminal acetylation and propionamidation of cysteine residues were searched as variable modifications. Up to one trypsin or three Asp-N missed cleavage were allowed. Semi-specific cleavage was also authorized. Peptides were filtered out according to the cutoff ion score > 25 and a minimal size of 7 amino acid residues.

### ***In situ* labeling of viral RNA**

The RNAscope® is a branched DNA *in situ* hybridization technology that specifically and sensitively detects RNA in fixed cells or tissues. First, 3 pools of dual Z-shaped probes of 18-25 nucleotides were designed against the HEV genomic and subgenomic RNA (Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne, ACD Bio, **Figure 8A**). Two probes need to bind next to each other to produce a specific signal. Each target probe set contains a pool of 20 oligo ZZ pairs.

PLC3 cells electroporated with p6-wt or p6-V1 infectious strains were fixed in 3% PFA for 20 min. Coverslips holding the fixed cells were attached to glass slides with a drop of nail polish and hydrophobic barriers were drawn around them with the ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (ACD Bio). Next, fixed cells were pre-treated according to the supplier instructions (RNAscope® H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Protease Reagents). First, the cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min at RT and then washed twice with 1×PBS. Next, the protease III was diluted 1:15 and incubated for 15 min at RT; slides were washed twice. Then, the RNAscope assay was carried out following the user manual precisely (RNAscope Detection Kit Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (Wang et al., 2012; Liu et al., 2019). The positive and negative strand of genomic viral RNAs were targeted by probe A (ref. 1030631-C2, ACD Bio) and probe B (ref. 579841-C3, ACD Bio), respectively (**Figure 8A**). Probe C (ref. 586651-C1, ACD Bio) targeted the positive strand of sub-genomic RNA (**Figure 8A**). The RNAs were labeled using the Opal 520, Opal 570 and Opal 650 as fluorophores (Akoya Biosciences). Subsequently, immunofluorescent labeling using either the anti-V5, 1E6 or anti-ORF3 antibodies could be performed (**Table 2**). Finally, coverslips were mounted and cells were analyzed by confocal microscopy as mentioned above.

## Statistical analysis

Mann-Whitney statistical tests were performed with software.

## Results

### Insertion of epitope tags in the ORF1 polyprotein of HEV

Since there is no commercial antibody that recognizes the ORF1 protein in HEV-replicating cells, we first sought to insert epitope tags in the ORF1 sequence in a way to preserve HEV replication. We aligned 44 aa sequences from different HEV genotypes to identify variable regions which are generally more prone to accept epitope insertions. Indeed, the HVR stood out as the region with the highest divergence of the entire HEV genome, thus confirming previous reports (Muñoz-Chimeno et al., 2020). Focusing on the HVR, we next aligned several epitope aa sequences with that of HEV in an aim to

identify similar aa and to ease epitope insertion with the least disruption. Such a location highly similar to the V5 epitope aa sequence was found in the HVR (**Figure 1C**). While 4 aa residues remained unchanged (G729, P731, P733, P735), 3 were mutated (L730K, H732I, T734N) and 7 were inserted to generate the full V5 epitope (V1, **Figure 1C**). In a second approach, we took advantage of the report by Nguyen et al. to insert a HA and a V5 epitope tags at position 2143 (H2, V2, **Figure 1C**) (Nguyen et al., 2012). These authors isolated a HEV gt3 strain from a chronically infected patient in which the human S19 ribosomal coding sequence was inserted at that corresponding position and led to a HEV replication advantage in cell culture (Nguyen et al., 2012). Finally, a HA tag was also introduced at the C-terminus of the RdRp, since avoiding an insertion within the ORF1 protein was supposed to maintain viral replication (H1, **Figure 1C**).

### **Replication of HEV p6 replicons expressing epitope-tagged ORF1**

To evaluate whether epitope insertions modify the replication efficacies, we made use of the HEV *Gaussia* luciferase replicon (GLuc) in which the *GLuc* reporter gene is transcribed by the ORF1 viral replicase (**Figure 1B**, Shukla et al., 2012; Emerson et al., 2013). The luciferase, secreted in cell supernatants, is used as a readout of ORF1 replication efficacy. To measure the impact of V5 and HA epitope insertion on HEV replication, we electroporated the *GLuc* replicons expressing wt ORF1 (p6-wt-GLuc), polymerase-inactivated GAD mutant (p6-GAD-GLuc), HA-tagged ORF1 (p6-H1-GLuc, p6-H2-GLuc) or V5-tagged ORF1 (p6-V1-GLuc, p6-V2-GLuc) in PLC3 and Huh-7.5 cells, which have been described as efficient HEV cell culture systems (Farhat et al., 2018; Montpellier et al., 2018). The replication efficacies were analyzed over a course of 5 days post-electroporation (dpe) and replication folds (normalized to 1 dpe) were compared (**Figures 2A,B**). The replication kinetics of the p6-V1-GLuc and p6-V2-GLuc replicons were similar to that of p6-wt-GLuc, in both PLC3 and Huh-7.5 cell lines (**Figures 2A,B**). Thus, the V5 epitope insertions at the selected positions in the ORF1 HVR do not significantly affect HEV replication. In contrast, the p6-H1-GLuc and p6-H2-GLuc replicons respectively showed a 93% and 78% reduction of replication efficacies at 5 dpe, as compared to the p6-wt-GLuc replicon. Due to poor replication efficacies, these constructs have not been used any further to characterize the HEV replicase processing or subcellular localization.

Moreover, in the presence of sofosbuvir (20  $\mu$ M), an effective HCV and HEV polymerase inhibitor (Thi et al., 2016; Farhat et al., 2018), the replication efficacies of all replicons were inhibited at 5 dpe by 87% to 75,8% in PLC3 cells and by 72,8% to 92,2% in Huh-7.5 lines (**Supplementary Figures 1A,B**). These results indicate that the insertion of epitope tags in the ORF1 does not affect the sofosbuvir efficacy to inhibit HEV replication.

### **Replication of HEV infectious genome expressing epitope-tagged ORF1.**

The V5 epitope was next introduced into the p6 infectious full-length genome at 2 positions, leading to the p6-V1 and p6-V2 constructs (**Figure 1C**). Intra- and extracellular HEV RNA levels were measured over a course of 7 dpe, by RT-qPCR using probes against the genomic and sub-genomic RNA (ORF2 probe, **Figure 1A, Table 1**) or the genomic RNA (ORF1 probe, **Figure 1A, Table 1**). The intracellular RNA levels increased rapidly for p6-V1 and p6-V2 constructs within 1 dpe to reach close to  $1 \times 10^8$  copies / ag RNA (ORF1 probe, **Figure 2C**) and  $2 \times 10^8$  copies / ag RNA (ORF2 probe, **Figure 2D**) at 3 dpe. Then, the RNA levels decreased slightly while staying above  $2.9 \times 10^7$  (ORF1 probe, **Figure 2C**) and  $6.9 \times 10^7$  (ORF2 probe, **Figure 2D**) copies / ag RNA at 7 dpe. The intracellular RNA copy numbers of the p6-wt followed a similar kinetics to the p6-V1/p6-V2 kinetics over the course of 7 dpe. In the cell supernatants, all RNA copy numbers decreased during the first day, then increased to reach a level of  $5.5 \times 10^7$  (ORF1 probe, **Figure 2E**) and  $8.9 \times 10^7$  (ORF2 probe, **Figure 2F**) copies / ag RNA at 3 dpe and remained constant towards the end of the experiment. The RNA levels measured for the p6-wt in the cell supernatants were comparable to p6-V1 and p6-V2 RNA level evolution. Moreover, PLC3 cells electroporated with the p6-V1 or p6-V2 constructs, displayed an ORF2 fluorescent labeling similar to that of p6-wt-electroporated cells (**Supplementary Figure 1C**). The expression of ORF2 is inhibited by sofosbuvir as a much lower fluorescent signal could be visualized in the treated electroporated cells (**Supplementary Figure 1C**). Taken together, these results indicate that the insertions of V5 epitopes at the selected positions in ORF1 HVR do not affect replication efficacy of the p6 genome in PLC3 cells.

### **Expression and processing of the V5-tagged HEV replicase**

We next sought to analyze the expression and processing of the ORF1 polyprotein in HEV replicative systems. Since the ORF1 protein has also been largely studied in heterologous expression systems, we aimed to compare the expression and maturation of V5-tagged ORF1 in replicative and heterologous systems. For this purpose, the V5-tagged ORF1 were cloned downstream of the T7 promoter into the pTM plasmid and expressed in H7-T7-IZ cells, as previously described (Lenggenhager et al., 2017).

First, the expression of the V5-tagged ORF1 was analyzed overtime in the H7-T7-IZ heterologous expression system. As early as 8 hours post-transfection (hpt), the ORF1 protein is detectable by immunoblot as a major band migrating above 180 kDa, a size that corresponds to the expected molecular weight of the full-length ORF1 (**Figure 3A**). This major band is present at every time points and is accompanied by several lower molecular weight bands of less signal intensity, comprised

between 95 and 170 kDa, which may correspond to ORF1 cleavage products (**Figure 3A**, stars). Second, the expression kinetics of the V5-tagged ORF1 protein was monitored by immunoblot, over the course of 3 dpe, in PLC3 cells electroporated with the p6-wt-GLuc, p6-V1-GLuc and p6-V2-GLuc replicons (**Figure 3B**). As early as 4 hours post-electroporation (hpe), a band of high signal intensity was detected above 180 kDa, which corresponds to the full-length ORF1 protein. Additionally, several bands of lower molecular weights (95 to 170 kDa) were also detected and may correspond to potential cleavage products of the ORF1 polyprotein. At 3 days post-electroporation (dpe), the overall smaller-size band pattern ranging from 95 kDa to 170kDa is comparable to the band profile observed at early time points. At last, the expression profiles of the V5-tagged ORF1 in PLC3 electroporated with the p6 infectious strains (p6-wt, p6-V1, p6-V2, **Figure 3C**) were compared to the profiles of ORF1 expressed in the replicon and heterologous systems (**Figures 3A,B**, respectively). Similarly, the most intense band was migrating above 180 kDa at every time points and smaller bands were identified between 95-180 kDa. The V5-tagged ORF1 expression signal was more intense at early time points (4 hpe-3 dpe) when compared to later time points (15 and 25 dpe, **Figure 3C**). The V5-tagged ORF1 expression level decreased but was still detectable at 15 and 25 dpe, as it is for the ORF2 capsid protein, thus showing that the HEV particles expressing a V5-tagged replicase are able to fulfill their infectious cycle in the long-term.

To exclude that the V5-tagged ORF1 minor bands were due to protein degradation, proteasome inhibition experiments were conducted (**Supplementary Figure 2**). Upon treatment with lactacystin (30  $\mu$ M for 8 hours), the V5-tagged ORF1 minor bands were still detectable in both H7-T7-IZ and PLC3 cells and their pattern remained unchanged. As a control, we probed for HSP70 protein that accumulated in the lactacystin-treated conditions, indicating that the proteasome inhibition was successful (Liao et al., 2006; Young and Heikkila, 2010). Thus, these minor ORF1 bands are likely not the result of proteasome degradation.

In an aim to identify these potential cleavage products, V5-immunoprecipitations were set up from cell lysates produced in all 3 systems (**Figures 4A,B**). The pattern of the smaller-size ORF1 proteins differed from one expression system to another with some proteins migrating at the same size (**Figures 4A,B**, stars). Minor ORF1 bands seemed more numerous in the p6 infectious cell culture system. As both the heterologous and p6 cell culture systems allowed us to achieve better ORF1 expression levels, V5-immunoprecipitations were scaled up from these 2 systems and trypsin-digests of some ORF1 selected products were analyzed by nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (**Figures 4C,D**, **Table 3**). The full-length V5-tagged ORF1 proteins, expressed in the heterologous and infectious p6 cell culture systems, were identified with 35% and 38% of peptide coverage, respectively. In spite of several attempts to reach sufficiently pure tagged-ORF1 protein in

high-enough quantity, the peptide coverage of smaller size ORF1 proteins was not sufficient to identify any potential cleavage sites. Overall, the N-terminus of the V5-tagged ORF1 protein was better covered than the C-terminus, suggesting a limited processing at the polyprotein N-terminus especially in the heterologous system. Some higher molecular weight products (bands 8-10, **Table 3**), visible on the Coomassie-stained gel, but not detected by the V5 antibody, could correspond to ORF1 polymers (**Figures 4C,D**).

We next performed subcellular fractionation of V5-tagged ORF1 expressing cells in order to gain more insight into the subcellular localization of the HEV replicase (**Figures 5A,B**). The V5-tagged ORF1 was detected by immunoblot as the full-length protein (> 180 kDa) in the soluble and membranous cytoplasmic fractions (Cs, Cm) as well as in the nuclear soluble fraction (Ns) and the nuclear envelope fraction (Ne) of p6-GLuc and p6 expression systems. The nuclear chromatin-bound fraction (Nc) only displayed a weak V5 signal in all expression systems. Also, smaller bands, migrating between 100-to-180 kDa (already detected in **Figure 3**), that could correspond to potential cleavage products of the ORF1 polyprotein, were detected in all fractions except in the nuclear chromatin bound fraction. Notably, a subtle change in the band pattern was visible in the V5-tagged ORF1 expressed in PLC3 electroporated with the p6-V1 and p6-V2: a signal was detected at 160 kDa in the Ns and Ck fractions (**Figure 5B**, 3 stars). This band was not detected either the Cs or the Cm fractions.

### **V5-tagged HEV p6 remains infectious in cell culture**

We also determined the impact of V5 insertions on HEV infectivity. Huh-7.5 cells were infected with the supernatant of PLC3 cells that were electroporated with p6-wt, p6-V1 or p6-V2 RNA (**Figure 6**). Three days post-infection, Huh-7.5 cells were processed for anti-ORF2 indirect immunofluorescence. ORF2-positive cells were counted and each positive cell focus was considered as one foci forming unit (FFU). The p6-wt, p6-V1 and p6-V2 strains produced infectious titers that were not significantly different (**Figure 6A**, Mann-Whitney statistical test), indicating that V5-epitope insertions did not alter HEV assembly and infectivity. Analysis by confocal microscopy also showed similar numbers of ORF2-positive cells and staining patterns when comparing Huh-7.5 cells that were infected with p6-wt or V5-tagged p6 (**Figure 6B**).

Of note, at 10 dpe, ORF2 protein expression was also controlled by immunoblot in the PLC3 cell supernatants that were used to infect Huh-7.5 cells (**Figure 6C**, PLC3 sup.). The ORF2 protein is detected as efficiently in all PLC3 supernatants irrespective of the electroporated p6 strain. After 3 days of infection with PLC3 supernatant producing p6-wt and V5-tagged-p6 particles, the ORF2 protein was also detected in lysates and supernatants of Huh-7.5 cells (**Figure 6C**, Huh-7.5 sup., Huh7.5

lysates). Moreover, the V5-tagged ORF1 protein could also be detected in Huh-7.5 cell lysates. These data confirm that the V5-epitope insertions do not affect production and infectivity of HEV particles.

### **Subcellular localization of the epitope-tagged ORF1 replicase and co-localization with ORF2 and ORF3 proteins**

We next took advantage of replicative epitope-tagged ORF1 constructs to analyze the subcellular localization of ORF1 replicase by confocal imaging. PLC3 cells were electroporated with p6-wt, p6-V1 and p6-V2 RNA. At 3 dpe, cells were first processed for single V5 staining. The V5 antibody mostly displayed a nuclear staining as well as cytoplasmic accumulation in the vicinity of the nucleus (**Figure 7A**, white arrowheads). Secondly, double immunostainings with antibodies directed against the V5 epitope and ORF2 or ORF3 proteins were performed. Interestingly, the ORF2 and ORF3 stainings partially overlapped with the V5 staining in peri-nuclear nugget-like substructures (**Figures 7C,D**), a finding that was corroborated by calculating the Pearson's correlation coefficients (PCC, **Figure 7B**). In line with these observations, super-resolution confocal microscopy analyses of PLC3 cells, electroporated with p6-V1 and co-labeled with either V5 / ORF2 or V5 / ORF3 antibodies, showed a total overlap of fluorescence intensities between the V5 signal and both the ORF2 and ORF3 signals (**Figures 7D,F**). Altogether these results indicate that V5-tagged ORF1, ORF2 and ORF3 proteins are co-distributed in compact structures located in the nucleus vicinity of HEV-producing cells.

Since the ORF1 protein has been largely studied in heterologous expression systems, we next wanted to compare the subcellular localization of V1-tagged ORF1 in replicative and heterologous systems. Eight hours post-transfection with the V5-tagged construct, a mostly cytoplasmic reticular labeling was observed in H7-T7-IZ cells (**Supplementary Figure 3A**). Also, in H7-TZ-IZ cells co-transfected with the V5-tagged ORF1 and ORF2/ORF3 expressing plasmids, partial staining overlaps of the V5-tagged replicase with ORF2 and ORF3 proteins were visible in the cytoplasm but also in perinuclear accumulations that often coincide with a deformation of the nucleus (**Supplementary Figures 3B,C**).

In an attempt to locate HEV replication sites, we implemented a highly sensitive technology (RNAscope®) to detect viral RNA. Three RNAscope® probes were designed to specifically hybridize to the positive- and negative- HEV RNA-strands (**Figure 8A**). The probes A and C target the positive strand of the genomic and sub-genomic HEV RNA, respectively. The probe B targets the negative strand of the genomic RNA. The p6-wt-electroporated PLC3 cells were fixed at 4 hpe, 3 and 6 dpe and, then submitted to *in situ* hybridization using probes A, B and C sequentially. A fluorescent signal was detected for each of the 3 probes in discrete perinuclear foci in the host cell as early as 4 hpe (**Figure 8B**). While fluorescent staining of the negative-sense RNA (probe B) and sub-genomic RNA (probe C)

overlapped ( $PCC_{C+B} = 0.68 \dots 0.05$ , **Figure 8C**), the staining of probe A only partially overlapped with the formers ( $PCC_{A+B} = 0.52 \dots 0.10$ ,  $PCC_{C+A} = 0.39 \dots 0.10$ , **Figure 8C**). Three dpe, the positive-stranded-RNA staining (probes A and C) further expanded all around the cell nuclei while the negative-stranded-RNA staining (probe B) remained more condensed as perinuclear foci. At 6 dpe, the staining of genomic and sub-genomic positive-sense RNA adopted a diffuse pattern in the cytoplasm with a  $PCC_{C+A}$  reaching  $0.53 \dots 0.12$ . The negative-stranded-RNA staining was closer to a dot-like fainter pattern while the staining overlap with the 2 other probes decreased ( $PCC_{A+B} = 0.38 \dots 0.27$ ,  $PCC_{C+B} = 0.44 \dots 0.29$ ). At every time points, the probe C staining surrounded the probe A staining while the probe B staining was the faintest of all.

Next, positive-sense genomic RNA (probe A) were co-labeled with the viral proteins ORF1, ORF2 and ORF3 (**Figures 8D-G**). At 3 dpe, the V5-tagged ORF1 protein co-localized with the positive-sense genomic RNA within the previously identified perinuclear foci with a strong PCC of  $0.76 \dots 0.11$  (**Figures 8D,G**). The viral RNA also co-distributed with ORF2 and ORF3 proteins at 3 dpe in p6-wt-electroporated PLC3 cells (**Figure 8G**,  $PCC_{A+ORF2} = 0.60 \dots 0.12$ ,  $PCC_{A+ORF3} = 0.73 \dots 0.06$ ). These accumulations were also located in the perinuclear proximity of the cell (**Figures 8E,F**).

### Identification of the HEV-induced substructures

Recently, the ORF2 and ORF3 proteins were reported to colocalize with cellular markers of the endocytic recycling compartment (ERC) in perinuclear substructures (Bentaleb et al., 2021). To further delineate whether the V5-tagged ORF1 was also present in these substructures, we conducted co-labeling experiments of the V5-tagged-ORF1 with ERC markers such as CD71, Rab11, PACSIN2 and EHD1 in PLC3 cells electroporated with p6-V1 (**Figure 9, Supplementary Figures 3D-F**). The V5-tagged ORF1 staining overlaps with CD71 and Rab11 staining in the perinuclear substructures (**Figures 9A,C**). Analyses of super-resolution confocal microscopy images further strengthened these observations showing a total overlap of fluorescence intensities between V5-tagged-ORF1 and CD71 (**Figure 9B**) as well as between V5-tagged ORF1 and Rab11 (**Figure 9D**). The V5-tagged ORF1 colocalizes best with Rab11 ( $PCC = 0.67 \dots 0.08$ ) whereas the colocalization is moderate with CD71 and EHD1 ( $PCC = 0.42 \dots 0.13$  and  $0.49 \dots 0.10$ , respectively, **Figure 9F**). Contrary to previous reports (Szkolnicka et al., 2019; Bentaleb et al., 2021), no colocalization was found between V5-tagged ORF1 and PACSIN2 or markers of multivesicular bodies CD63 or CD81 while CD81 labeling appeared surrounding the V5-tagged ORF1 signal (**Figure 9F, Supplementary Figures 3D-F**).

## Discussion

Due to its low expression level, its tight regulation in time and space as well as a lack of a commercial antibody (Lenggenhager et al., 2017), the non-structural ORF1 protein is the least studied of the three HEV proteins. Thus, the insertion of epitope tags within the HEV replicase appeared as a practical strategy to fulfill our goals: to characterize the subcellular localization and processing of ORF1 polyprotein. Indeed, a transposon-based approach to insert HA epitopes in the ORF1 genome has been recently used to characterize the subcellular localization of the HEV replicase (Szkolnicka et al., 2019). Similarly, we aimed at finding positions within the ORF1 where epitope tags could be inserted without disturbing viral replication. After aligning 44 HEV strains, the HVR appeared as the least conserved domain in the ORF1 sequence. In addition, while presenting the highest divergence of the entire HEV genome (Muñoz-Chimeno et al., 2020), the HVR is known to tolerate inserted fragments arising either from duplication of viral genome or from human genes which were reported to confer better replication efficacies or adaptation to cell culture (Shukla et al., 2011, 2012; Nguyen et al., 2012; Johné et al., 2014; Lhomme et al., 2014).

Recently, a cell culture model derived from the PLC/PRF/5 cell line has been established in the lab to efficiently produce HEV particles from the Kernow C-1 p6 strain (Shukla et al., 2012; Montpellier et al., 2018). In a first approach to identify non-disruptive insertion sites, the ORF1 HVR aa sequence of the Kernow C-1 p6 strain was aligned with those of common epitope tags. Five aa of the HVR were matching with the V5 tag sequence, while 3 aa had to be mutated and 4 had to be inserted to construct the full V5 epitope aa sequence (V1, **Figure 1**). Secondly, a V5 or HA epitope (V2 and H2, **Figure 1**) were inserted into the Kernow C-1 p6 strain in the position where the S19 insertion was found in a different strain (LBPR-0379) to confer a replication advantage in cell culture (Nguyen et al., 2012; Shukla et al., 2012). Lastly, an HA epitope was inserted at the C-terminus of the ORF1 genome to avoid impacting the structure of the ORF1 protein and thereby perturb replication (H1, **Figure 1**).

At first, the epitopes were inserted into the p6-GLuc replicon in order to determine the impact of the tag insertion on its replicative ability. The luciferase activity was measured over time (**Figures 2A,B, Supplementary Figure 1**). Result analyses led to the conclusion that the H1 insertion diminishes the expression of the sub-genomic genes, as luciferase activity was greatly decreased, which is likely due to the disruption of the sub-genomic promoter region (Ding et al., 2018). Therefore, insertion at the H1 position is likely to also impact replication in the p6 context but could be of use in the heterologous expression system. Next, it could be observed that the H2 and V2 insertion that were placed in the same position, impacted the subgenomic expression differently. While the p6-V2-GLuc showed similar luciferase activity to the non-tagged p6-wt-GLuc, the p6-H2-GLuc construct showed a decreased

replication efficacy. Thus, the aa sequence composition of the epitope, and not only the insertion position, may impact the replicase activity by modifying its conformational structure. Out of the 4 tagged replicons tested, replication efficacies of the p6-V1-GLuc and p6-V2-GLuc constructs appeared the least affected by epitope insertion. The luciferase activity of these constructs resembled those of the non-tagged p6-wt-GLuc. Moreover, the quantification of extracellular and intracellular viral RNA over the course of 7 days displayed similar kinetics in PLC3 cells expressing the p6-wt or the V5-tagged p6 constructs (**Figures 2C-F**), thus strengthening the fact that the V5 insertions within the ORF1 HVR did not disturb the HEV replication. In line with these results, the infectivity of the V5-tagged p6 constructs was not altered when compared to the p6-wt (**Figure 6**). Therefore, the V5-tagged constructs were selected to delineate the ORF1 features.

One of our goal was to characterize the processing of the ORF1 protein. The proteins of positive stranded RNA viruses are commonly subjected to cleavage by viral and/or cellular proteases (Ploss and Dubuisson, 2012; Gu and Rice, 2013; Baggen et al., 2021; V'kovski et al., 2021). However, in the HEV field, the literature on ORF1 cleavage is highly controversial as there is evidence for and against cleavage of the non-structural protein (LeDesma et al., 2019).

In an aim to study potential processing of HEV replicase, expression of the V5-tagged ORF1 protein was analyzed over time by immunoblotting (**Figure 3**). In the 3 different systems tested in this study, the full-length ORF1 protein and smaller bands that may correspond to potential ORF1 cleavage products were detected, especially at earlier time points. This could reflect the early need for ORF1 to replicate RNA at the onset the viral cycle. Although full-length ORF1 protein was identified by mass spectrometry with certainty, sequence identification of the smaller products was less robust due to their lower expression levels (**Table 3, Figure 4**). The ORF1 protein expressed heterologously does not seem to be processed from its N-terminus while in the p6 infectious system, more ORF1 potential cleavage products were detected and the N-terminus of the protein also seemed more stable than the C-terminus (**Table 3, Figure 4**). The expression of more numerous potential cleavage products in the p6 infectious system may suggest the requirement of all viral proteins as well as cellular proteins to achieve the full ORF1 processing. As the possibility of degradation cannot be fully excluded, we inhibited the proteasome with lactacystin and noted that the observed band pattern and ORF1 quantity remained unchanged (**Supplementary Figure 2**). Thus, the minor ORF1 products may be the result of natural viral and/or cellular processing rather than artefactual degradation. Furthermore, the ORF1 protein and its potential cleavage products were detected in different cellular compartments with slightly different patterns (**Figure 5**). For example, a band of 160 kDa is only present in the nuclear fractions enriched from the p6 cell culture system. Nevertheless, without any sequence information, it remained difficult to assess to which domain of the ORF1 protein this product may correspond.

RNA viruses generally replicate in the cytoplasm. In previous studies, the ORF1 protein was found in the cytoplasm colocalizing with the other viral proteins ORF2 and ORF3 and cellular markers of the ERGIC and Golgi (Rehman et al., 2008; Szkolnicka et al., 2019). On the other hand, the V5-tagged ORF1 proteins, expressed in the replicon, heterologous and p6 cell culture expression systems, displayed both a cytoplasmic and nuclear localization as assessed by subcellular fractionation and immunofluorescence experiments (**Figures 5,7**). The use of the Kernow C-1 p6 strain, that contains the S17 human ribosomal protein insertion in which an element could act as a nuclear localization signal (NLS), may account for this discrepancy (Kenney and Meng, 2015). Mutations of the conserved aa in the S17 NLS disrupted the replication efficacy of the p6-GLuc replicon and did not inhibit the nuclear localization as assessed by immunofluorescence staining or immunoblot analysis of subcellular fractions in the heterologous system (data not shown).

In addition, we observed perinuclear aggregations of the ORF1 protein that often coincide with a deformation of the nucleus. Recently, the ORF2 and ORF3 proteins as well as cellular markers of the ERC such as Rab11 and CD71 were reported to locate to this region upon infection (Bentaleb et al., 2021). Interestingly, we confirmed partial overlaps of the ORF1 protein with the ORF2 and ORF3 viral proteins as well as several cellular markers of the ERC, especially in the perinuclear region (**Figure 9, Supplementary Figures 3D-F**). These results indicate that the place of viral replication is in close proximity to the site of virus assembly. Indeed, in other viruses such as Dengue virus, replication and assembly take place in the same subcellular compartment (Welsch et al., 2009).

Lastly, to formerly identify the HEV replication site, we aimed at locating the negative-sense HEV RNA in the host cell. To that end, the RNAscope® technique, which enabled to specifically target and visualize the positive- and negative-RNA-strands of hepatitis C virus and the positive-RNA-strand of Zika virus, was implemented (Wang et al., 2012; Liu et al., 2019). We managed to locate positive-sense genomic and subgenomic HEV RNA as well as the negative-sense RNA in the cell (**Figure 8**). Moreover, co-distributions of the positive-sense genomic RNA with ORF1, ORF2 and ORF3 viral proteins were visible within the nugget-like perinuclear foci. These results strengthen the hypothesis that viral replication and assembly take place in close proximity in the HEV producing cells.

## Legends of figures

**Figure 1.** Localization scheme of epitope tag insertions within the ORF1 polyprotein of HEV.

**Figure 1A.** Scheme of the HEV Kernow C-1 p6 (GenBank accession number JQ679013) genome and encoded proteins. The full-length HEV genome (7.2 kb) is composed of the 5'- and 3' non coding regions (NCR) as well as the 3 open reading frames: ORF1 (purple) encoding the HEV replicase, ORF2 (red) and ORF3 (blue) encoding the capsid and a small phosphoprotein, respectively. The HEV sub-genomic RNA of 2.2kb is depicted as a thin black line. The probes used in RT-qPCR experiments are located as small colored rhombus: ORF1-specific probe (dark purple) and ORF2/ORF3-specific probe (dark blue). The full-length of the ORF1 protein cannot be represented at the scheme scale (purple dashed lines).

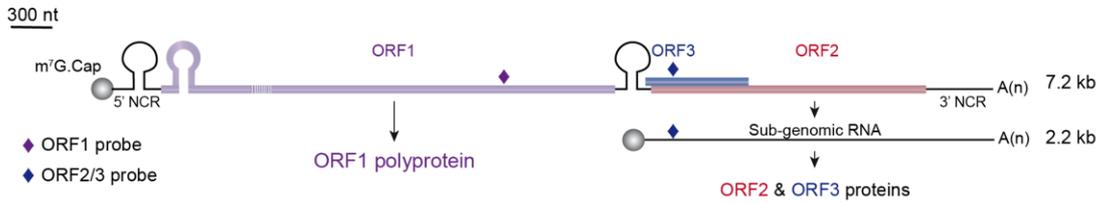
**Figure 1B.** Scheme of the HEV p6-GLuc replicon (Shukla et al., 2012; Emerson et al., 2013) genome and encoded proteins. The *Gaussia* luciferase (GLuc, green) replaces the ORF3 and the N-terminus of ORF2 in the HEV p6-GLuc replicon.

**Figure 1C.** The ORF1 is enlarged and its functional domains are designated as methyltransferase (MeT), Y domain (Y), papain-like cysteine protease (PCP), hypervariable region (HVR), macro- or X-domain (X), helicase (Hel), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Insertion position of an HA epitope at the C-terminus of ORF1 is localized (H1, arrowhead). C-terminal nucleotide and aa sequences of RdRp are detailed for the ORF1 untagged wildtype (ORF1-wt) and HA-tagged (ORF1-H1) proteins with inserted epitope sequence highlighted in blue (box).

A focus on the HVR enables to locate the human S17 ribosomal protein insertion (S17) of the HEV Kernow C-1 p6 strain (Shukla et al., 2012) and the prolin-rich region (Pro-rich). An asterisk points at the 2202-2252 region whose nucleotide and aa sequences are detailed (box).

Two other sites of insertion of V5 or HA epitopes are shown (arrowheads): V1 and V2 for V5 epitope insertions and H2 for HA epitope insertion. Part of the HVR sequences of the wild-type (ORF1-wt) as well as the epitope-tagged ORF1 are presented (ORF1-V1, ORF1-V2, ORF1-H2). Mutated nucleotides and aa residues are in red. Inserted nucleotides and aa residues are in blue.

### A HEV infectious p6 strain



### B HEV p6-GLuc replicon



### C ORF1 polyprotein

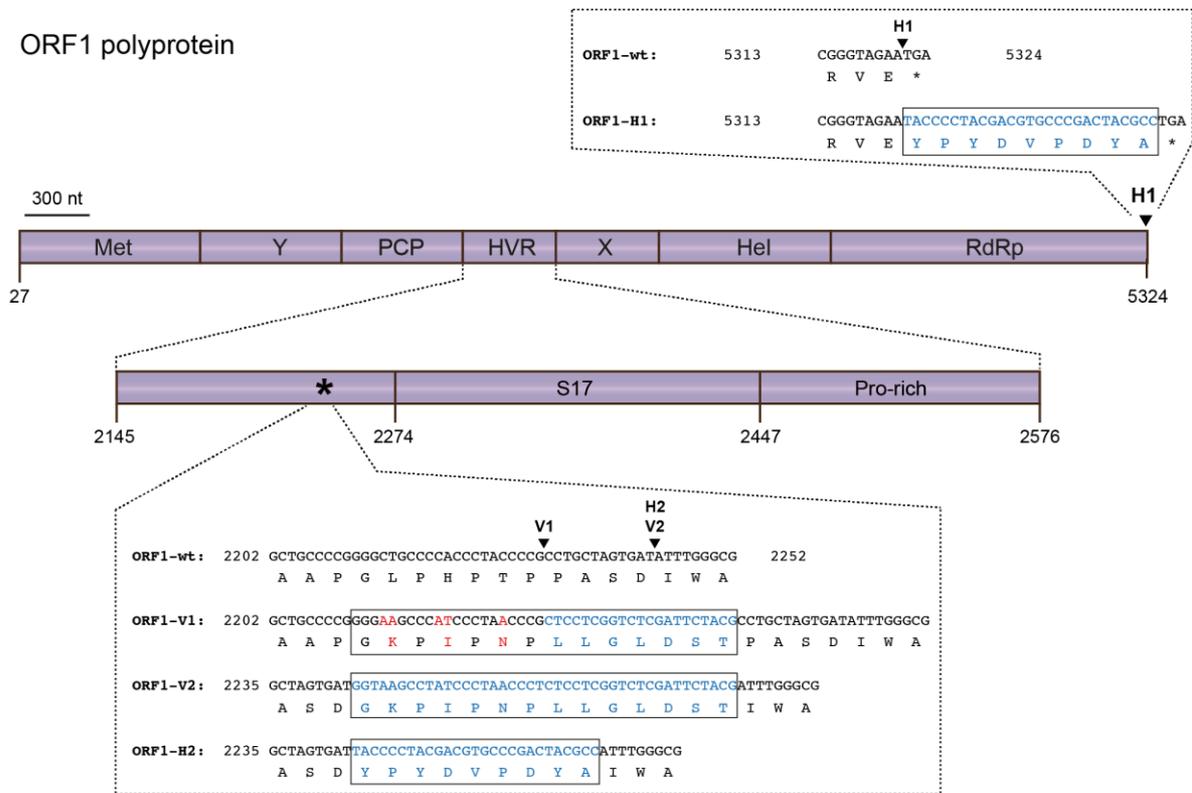
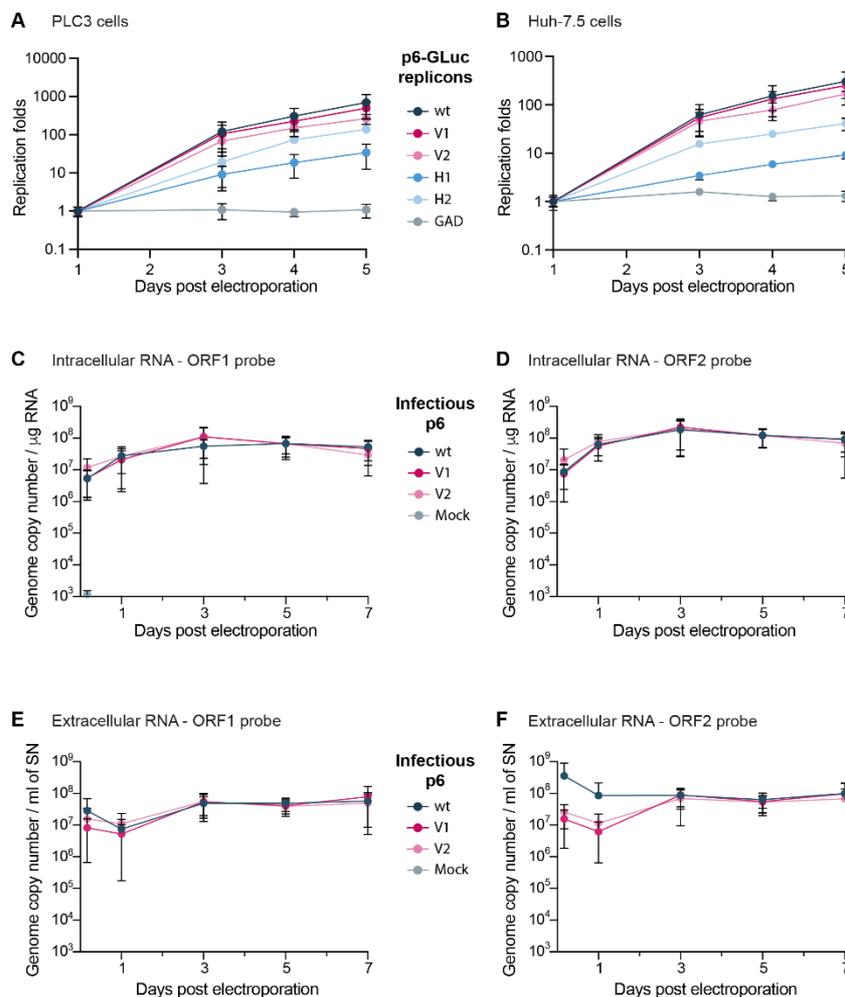


Figure 1

**Figure 2.** Replication efficacies of HEV p6 replicons and infectious strain expressing epitope-tagged polymerase.

**Figures 2A, 2B.** Replication efficacies of HEV replicons expressing tagged ORF1 in PLC3 (**Figure 2A**) and Huh-7.5 cells (**Figure 2B**) as measured by luciferase activity. The relative light units (RLU) were measured everyday for 5 days post-electroporation (dpe) by quantification of the *Gaussia* luciferase in the cell supernatants using a luminometer. Replication fold increases of the tagged p6-GLuc replicons (V1, V2, H1, H2) and non-tagged p6-GLuc replicons (wt, GAD) were normalized to 1 dpe. The p6-GAD-GLuc is a non-replicative construct that possesses a mutation from GDD to GAD which inactivates the ORF1 polymerase. Experiments were conducted three times with 3 technical replicates.

**Figures 2C-F.** HEV RNA quantification in p6 electroporated-PLC3 cells expressing wild type or epitope-tagged ORF1. Intracellular (**Figures 2C,D**) and extracellular (**Figures 2E,F**) viral RNAs were quantified at 4 h post-electroporation (hpe), 1, 3, 5 and 7 dpe by RT-qPCR targeting either ORF1 (**Figures 2C,E**) or ORF2 (**Figures 2D,F**). Mock-electroporated cells were used as negative controls. Experiments were conducted three times with 2 technical replicates.



**Figure 3. Expression of the V5-tagged ORF1 protein over time in different cellular systems.**

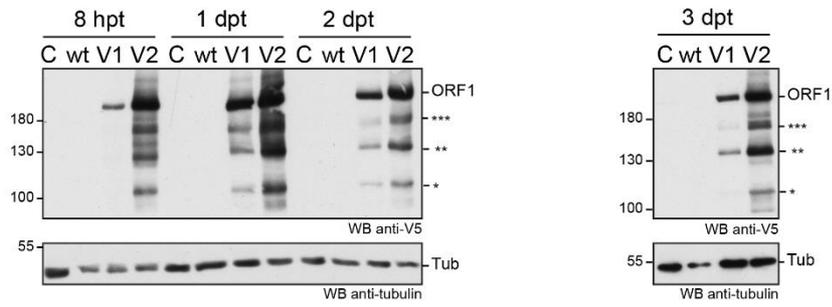
**Figure 3A.** Heterologous expression of the HEV p6 ORF1 protein. H7-T7-IZ cells were transfected with a pTM plasmid expressing the wild type untagged ORF1 protein (wt) or the V5-tagged ORF1 (V1 or V2). The H7-TZ-IZ cells constitutively express the T7 polymerase and the ORF1 gene lies under the control of the T7 promoter. Total cell lysates were collected in presence of protease inhibitors at 8 hours post-transfection (hpt) and 1, 2 and 3 days post-transfection (dpt). Mock-transfected cells served as negative control (C). The band migrating higher than 180 kDa corresponds to the full-length ORF1 protein (ORF1). The immunoblot was probed either with an anti-V5 antibody or an anti- $\alpha$ -tubulin antibody (**Table 2**) to control for even loading. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

**Figure 3B.** Expression of the ORF1 protein in the p6-GLuc replicon system. PLC3 cells were electroporated with a replicon expressing the wild type untagged ORF1 protein (wt) or the V5-tagged ORF1 (V1 or V2). Total cell lysates were collected in presence of protease inhibitors at 4, 8, 12 hpe and 1 and 3 dpe. Mock-electroporated cells served as negative control (C). The band migrating higher than 180 kDa corresponds to the full-length ORF1 protein (ORF1). The immunoblot was probed either with an anti-V5 antibody or an anti- $\alpha$ -tubulin antibody (**Table 2**) to control for even loading. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

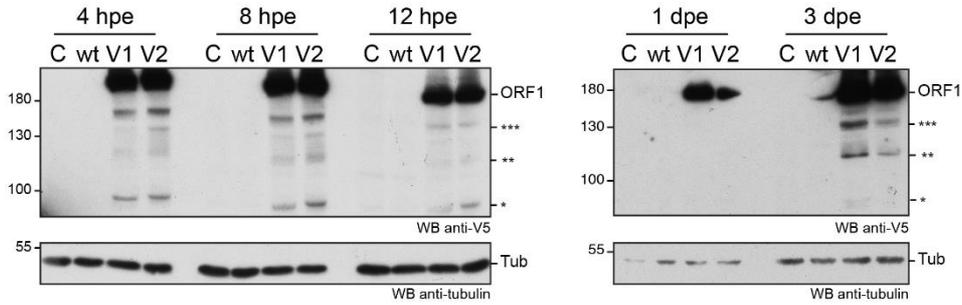
**Figure 3C.** Expression of the ORF1 protein in the infectious p6 cell culture system.

PLC3 cells were electroporated with the p6 infectious strain expressing the wild type untagged ORF1 protein (wt) or the V5-tagged ORF1 (V1 or V2). Total cell lysates were collected in presence of protease inhibitors at 4, 8, 12 hpe and 1, 3, 15, 25 dpe. Mock-electroporated cells served as negative control (C). The band migrating higher than 180 kDa corresponds to the full-length ORF1 protein (ORF1). The immunoblot was probed either with an anti-V5 antibody or an anti-ORF2 (1E6) antibody or an anti- $\alpha$ -tubulin antibody (**Table 2**) to control for even loading. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

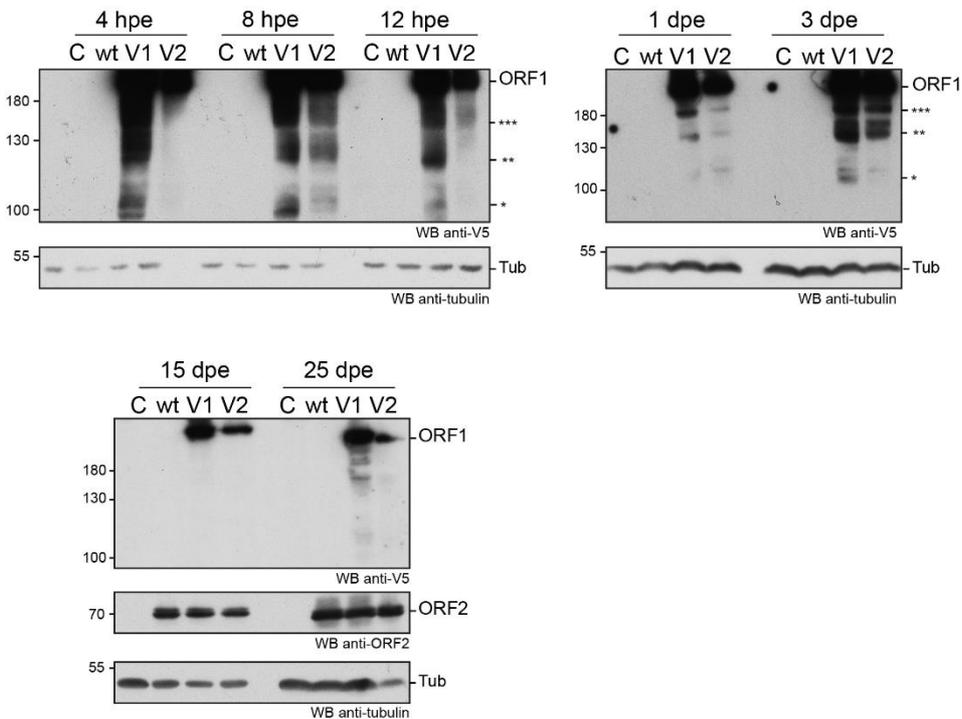
**A Heterologous expression system**



**B p6-GLuc replicon system**



**C Infectious p6 cell culture system**

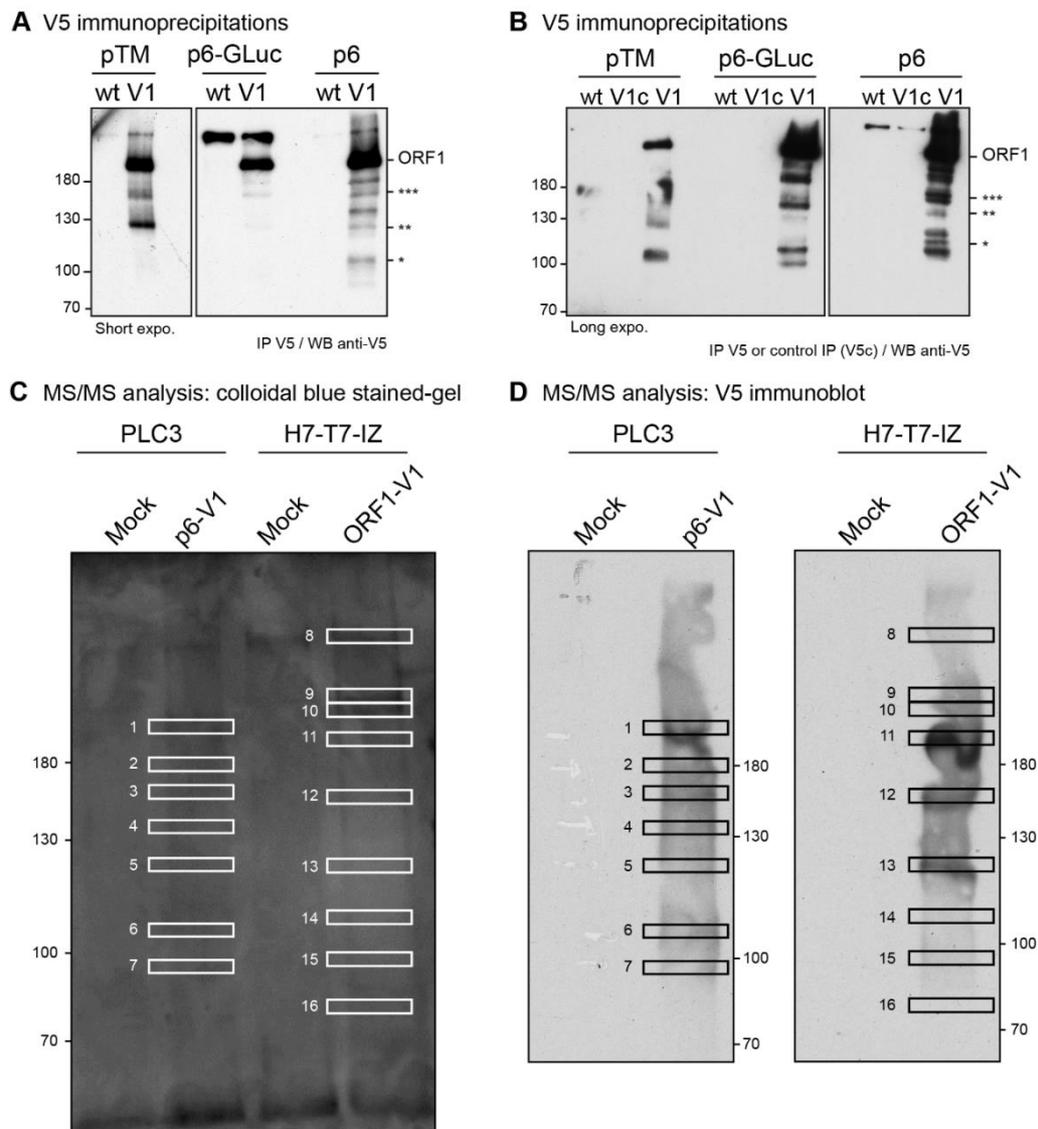


**Figure 4. Immunoprecipitation of the V5-tagged ORF1 protein expressed in different cellular systems and mass spectrometry analysis.**

**Figure 4A.** HEV p6 ORF1 protein was heterologously expressed in H7-T7-IZ cells following transfection with the pTM plasmid carrying the untagged (wt) or V5-tagged (V1) construct (left panel). One dpt, total cell lysates were immunoprecipitated with the polyclonal goat anti-V5 antibody (**Table 2**). HEV p6 protein was expressed in the replicon (p6-GLuc) and p6 cell culture (p6) systems (right panel). Three dpe, PLC3 cells lysates expressing either the untagged (wt) or the V5-tagged (V1) ORF1 proteins were immunoprecipitated using the polyclonal goat anti-V5 antibody. Immunoblots were revealed with a mouse anti-V5 monoclonal antibody (**Table 2**). Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

**Figure 4B.** In the same conditions as above, the control immunoprecipitations were conducted on the lysates expressing the V5-tagged ORF1 in all 3 systems using protein G sepharose beads without antibody (lanes V1c). The other lanes are labeled as in **Figure 4A**. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

**Figures 4C,D.** Immunoprecipitation of V5-tagged HEV replicase for mass spectrometry analysis. PLC3 cells were electroporated with the p6-V1 construct expressing a V5-tagged ORF1 (p6-V1). H7-T7-IZ cells were transfected with a pTM plasmid expressing a V5-tagged ORF1 protein (ORF1-V1). Mock-transfected or -electroporated cells were used as negative controls (Mock). Cellular lysates were immunoprecipitated with the V5 antibody (**Table 2**). Next, the eluate was partitioned in 2 fractions and resolved by SDS-PAGE electrophoresis. Most of the eluate was stained with colloidal blue (**Figure 4C**) while the remaining five per cent was probed with the anti-V5 antibody (**Figure 4D**). Following precise alignment of the revealed film and the colloidal blue stained gel, the desired bands (white rectangles) were cut from the gel and analyzed by nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after in-gel trypsin digestion (**Table 3**).

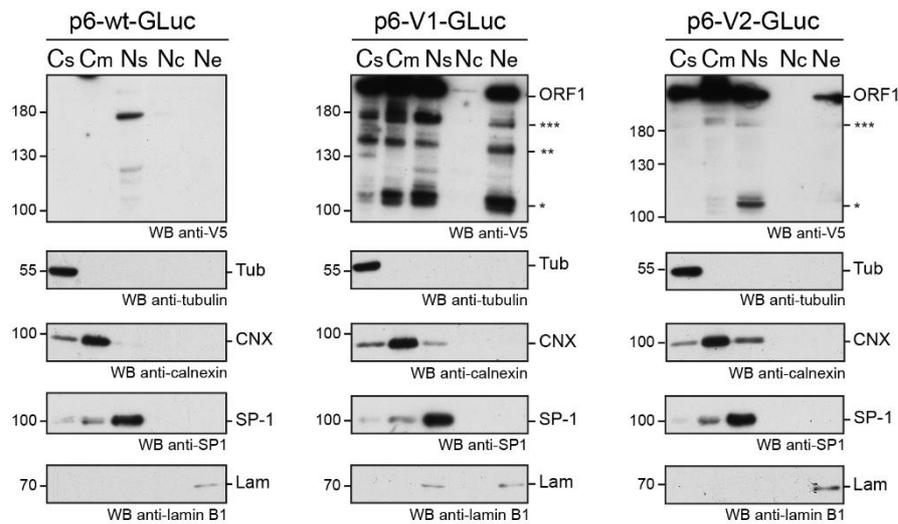


**Figure 5. The ORF1 protein is expressed in different cellular compartments.**

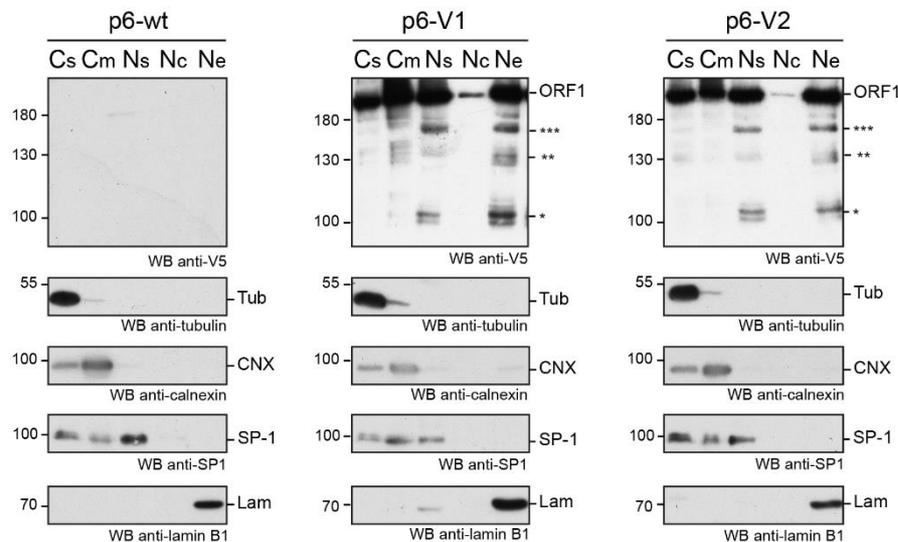
**Figure 5A.** PLC3 cells were electroporated with the p6-GLuc replicons expressing the non-tagged wildtype ORF1 (p6-wt-GLuc), and the V5-tagged ORF1 (p6-V1-GLuc, p6-V2-GLuc). Three dpe, cells were collected and cellular fractions were separated as follows: Cs = cytoplasmic soluble fraction, Cm = cytoplasmic membranous fraction, Ns = nuclear soluble fraction, Nc = nuclear chromatin-bound fraction, Ne = Nuclear envelope. Immunoblots were probed with a mouse monoclonal antibody directed against the V5 epitope (**Table 2**). Other antibodies were used to monitor for fraction enrichment: anti- $\beta$ -tubulin as a marker of the cytoplasmic soluble fraction, anti-calnexin as a marker of cytoplasmic membranous fraction, anti-SP1 as a marker of nuclear soluble fraction and anti-lamin B1 as a marker of nuclear envelope (**Table 2**). Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

**Figure 5B.** PLC3 cells were electroporated with the p6 expressing the non-tagged wildtype ORF1 (p6-wt), and the V5-tagged ORF1 (p6-V1, p6-V2). Four hpe, cells were collected and cellular fractions were separated and named as above. The above-mentioned antibodies were used to reveal the immunoblots. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

### A p6-GLuc replicon system



### B Infectious p6 cell culture system



**Figure 6.** Infection of Huh-7.5 cells by HEV p6 expressing V5-tagged ORF1 polyprotein.

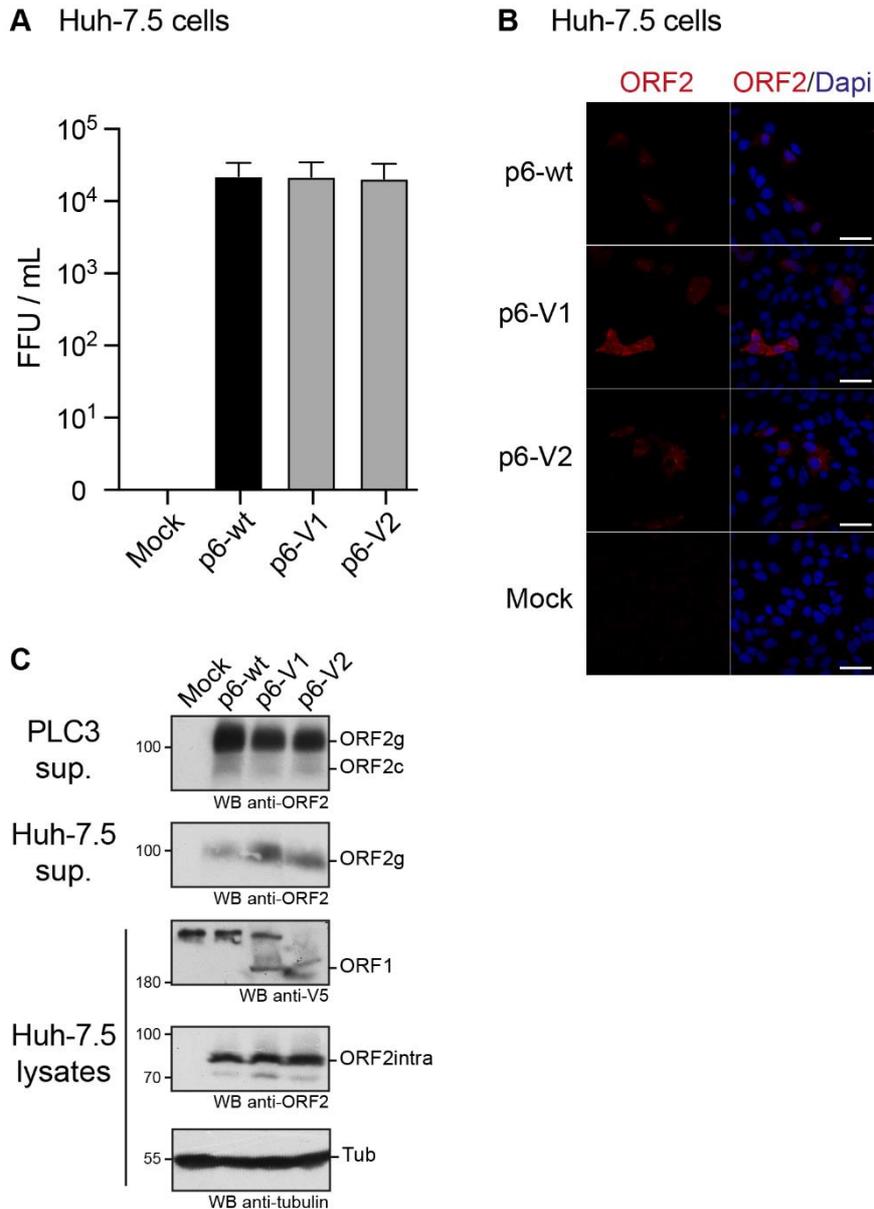
**Figure 6A.** Infectious titers of HEV p6 expressing epitope-tagged ORF1 polyprotein. Ten dpe, supernatants of PLC3 cells electroporated with p6-wt, p6-V1 or p6-V2 were collected to infect Huh-7.5 cells. Three days post-infection, Huh-7.5 cells were fixed and stained with an anti-ORF2 antibody (1E6, **Table 2**). The number of ORF2-positive cells from 3 independent experiments were counted and used to calculate infectious titers in focus forming unit (FFU/mL). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

**Figure 6B.** Immunofluorescence of HEV p6-infected Huh-7.5 cells.

Huh-7.5 cells were infected with the supernatants of PLC3 cells that were electroporated with HEV p6 expressing non-tagged ORF1 (p6-wt) or V5-tagged (p6-V1, p6-V2) replicase as mentioned above. Three days post-infection, cells were processed for anti-ORF2 immunofluorescence (1E6, red) prior to analysis by confocal microscopy. Cell nuclei were stained with Dapi (blue). Huh-7.5 cells infected with mock-electroporated PLC3 cell supernatant served as negative control (Mock). Scale bar = 50  $\mu$ m.

**Figure 6C.** Expression of epitope-tagged ORF1 and ORF2 proteins in the p6 cell culture system.

PLC3 cells were electroporated with p6-wt, p6-V1 or p6-V2. Ten dpe, total protein extracts were submitted to Western blot and probed with an anti-ORF2 antibody (1E6, first panel, PLC3 sup.). Huh-7.5 cells were infected with PLC3 supernatants. Three days post-infection, Huh-7.5 supernatants were also analyzed for ORF2 expression (1E6, second panel, Huh-7.5 sup.). In parallel, Huh-7.5 cells were lysed and total protein extracts were probed with anti-V5, -ORF2 (1E6) and  $\alpha$ -tubulin antibodies (last 3 panels, Huh-7.5 lysates). Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. ORF1 = full-length protein, ORF2g = glycosylated form of ORF2, ORF2c = cleaved form of ORF2, ORF2intra = intracellular ORF2 form, Tub =  $\alpha$ -tubulin.



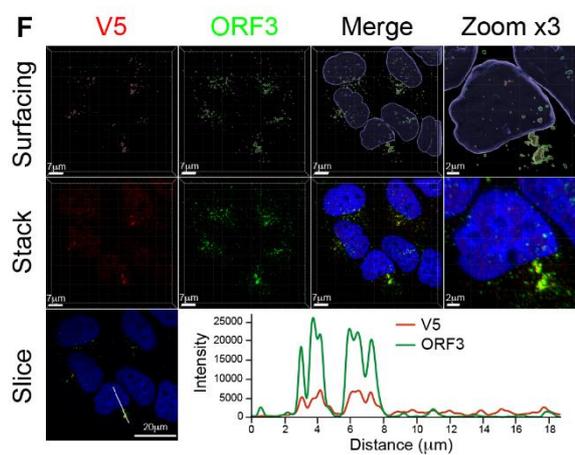
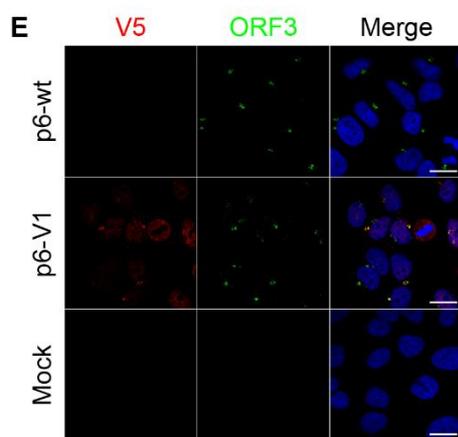
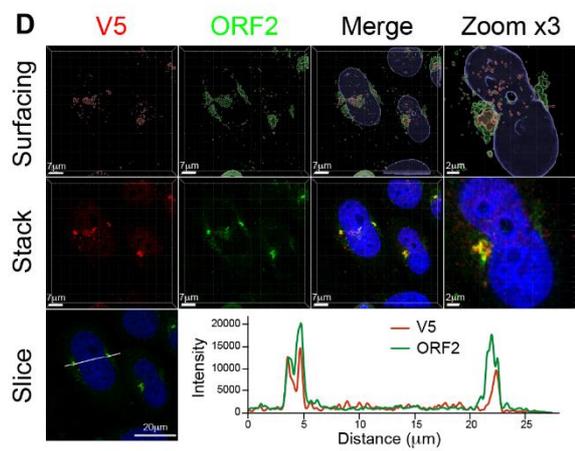
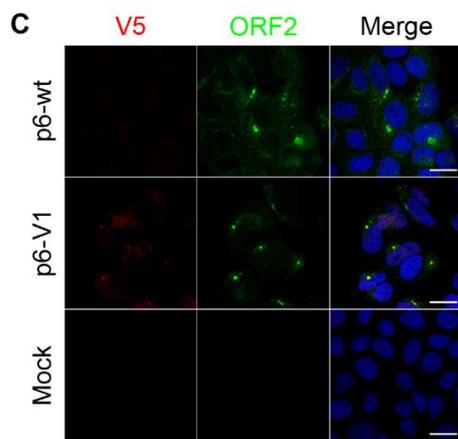
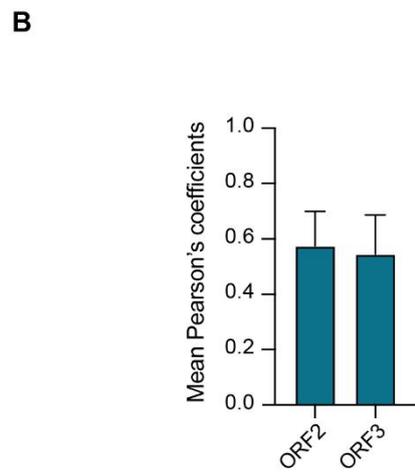
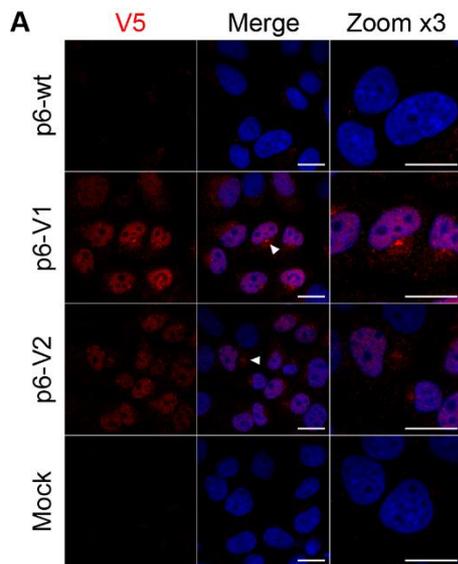
**Figure 7. Co-localization of the V5-tagged ORF1 and ORF2/ORF3 proteins in the host cell.**

**Figure 7A.** PLC3 cells were electroporated with the p6 strain expressing either the untagged (p6-wt) or the V5-tagged ORF1 (p6-V1, p6-V2) proteins. Three dpe, cells were processed for immunofluorescence using an anti-V5 antibody (**Table 2**, red) prior to analysis by confocal microscopy. Perinuclear nugget-like structures are shown (white arrowheads). The cell nuclei were stained with DAPI (blue). Mock-electroporated cells served as negative control. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**Figure 7B.** The regions of interest (ROI) were drawn around the perinuclear nugget-like structures on the immunofluorescence images taken from PLC3 cells electroporated with p6-V1 and co-labeled with antibodies (**Table 2**) directed against the V5 epitope and the ORF2 (**Figure 7C**) or the ORF3 proteins (**Figure 7E**). The ROI were used to determine Pearson's correlation coefficients (PCC) using JACoP plugin from ImageJ software. PCC means ( $\pm$  standard deviation) were calculated from 30 different ROI.

**Figures 7C-7E.** Co-labeling of the V5-tagged HEV ORF1 replicase with ORF2/ORF3 in PLC3 cells. PLC3 cells were electroporated with p6-wt or p6-V1. Three dpe, the viral proteins were co-labeled with antibodies directed against the V5 epitope (red, V5) and (i) ORF2 (1E6, green, **Figure 7C**) or (ii) ORF3 (green, **Figure 7E**) prior to analysis by confocal microscopy. Mock-electroporated cells served as negative control. Antibodies used are listed in **Table 2**. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**Figures 7D-7F.** PLC3 cells electroporated with p6-V1 and co-stained with anti-V5 and (i) anti-ORF2 (**Figure 7D**) or (ii) anti-ORF3 antibodies (**Figure 7F**) were analyzed by confocal microscopy with a high resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using the Imaris software are shown to visualize the V5-tagged ORF1/ORF2 (**Figure 7D**) or ORF1/ORF3 (**Figure 7F**) substructures. In the middle, z-stacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of V5-tagged ORF1 and ORF2 or ORF3 staining measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Scale bars show the indicated length.



**Figure 8. *In situ* labeling of positive- and negative-sense HEV RNA.**

PLC3 cells were electroporated with untagged (p6-wt) or V5-tagged (p6-V1) p6 strains. Cells were grown on coverslips, fixed at 4 hpe, 3 and 6 dpe and processed for *in situ* RNAscope® hybridization. Cell nuclei were stained with Dapi (blue). Images were taken on a confocal microscope. Mock-electroporated cells served as negative control. Scale bar = 20  $\mu$ m.

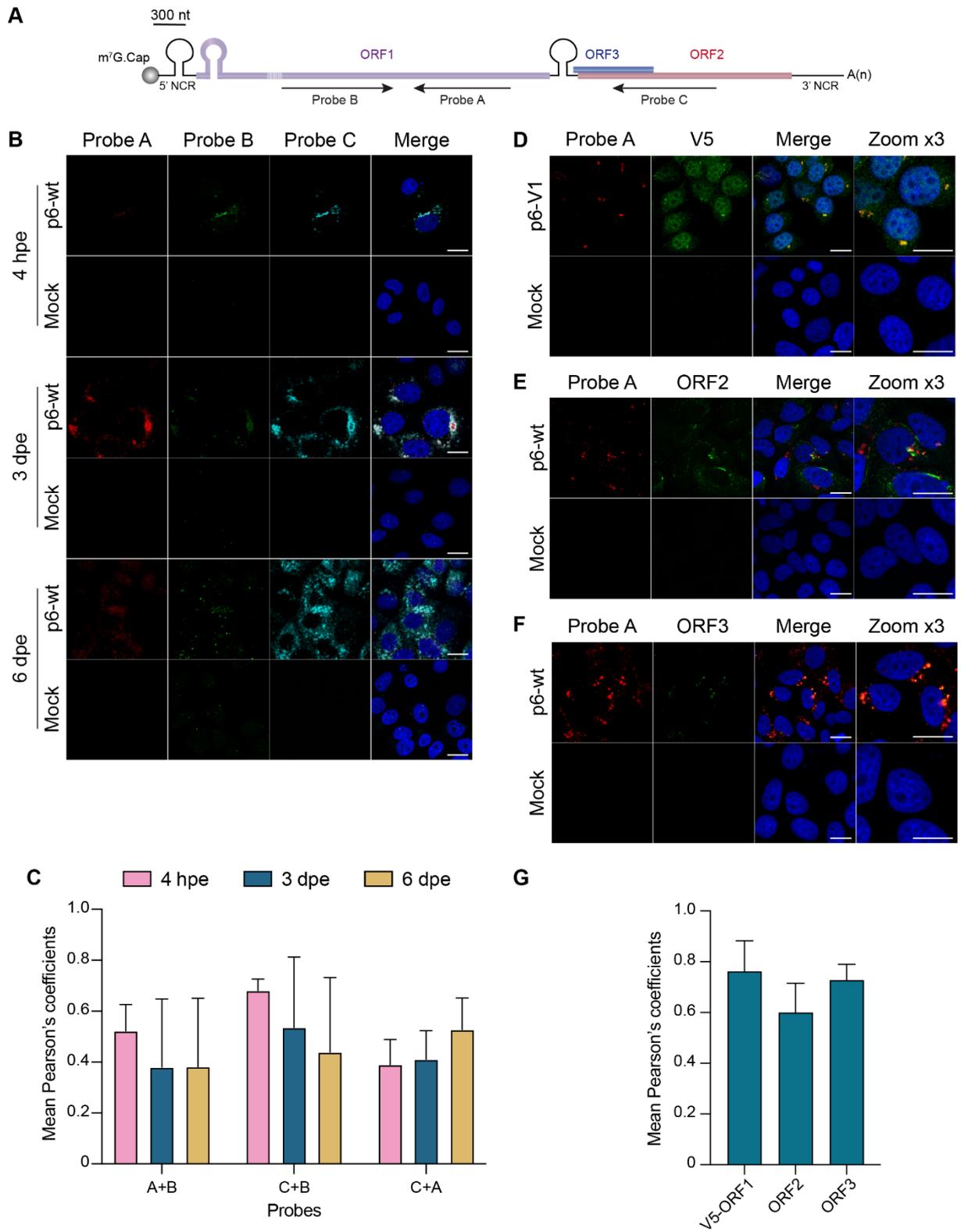
**Figure 8A.** Schematic overview of the RNAscope® probe location. Probe A targets the positive-sense genomic RNA and is located in the RdRp domain of ORF1 (purple). Probe B targets the negative-sense RNA and is also located in the RdRp but does not overlap with probe A. Probe C targets the positive-sense subgenomic RNA, by hybridizing at the ORF3 (blue) / ORF2 (red) overlap. The full-length of the ORF1 protein cannot be represented at the scheme scale (purple dashed lines).

**Figure 8B.** PLC3 cells electroporated with the p6-wt strain were sequentially stained with probes A (red), B (green) and C (cyan) at 4 hpe, 3 and 6 dpe.

**Figure 8C.** Immunofluorescence images of whole PLC3 cells electroporated with p6-wt and co-labeled with probes A, B and C were used to determine PCC using JACoP plugin from ImageJ software. PCC means ( $\pm$  standard deviation) were calculated from 30 analyzed whole cells.

**Figures 8D-8F.** Three dpe, PLC3 cells electroporated with the p6-V1 construct were stained with probe A (red) and (i) the anti-V5 antibody (green, **Figure 8D**), (ii) the anti-ORF2 (green, 1E6, **Figure 8E**) or (iii) the anti-ORF3 (green, **Figure 8F**).

**Figure 8G.** The regions of interest (ROI) were drawn around the perinuclear nugget-like structures on the immunofluorescence images taken from PLC3 cells electroporated with p6-V1 or p6-wt and co-labeled with probe A and anti-V5, anti-ORF2 or anti-ORF3 antibody (**Table 2**). Twenty ROI were used to calculate PCC ( $\pm$  standard deviation) using JACoP plugin from ImageJ software.

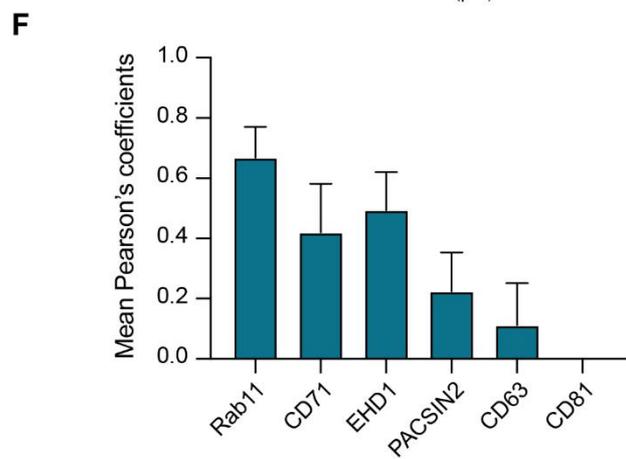
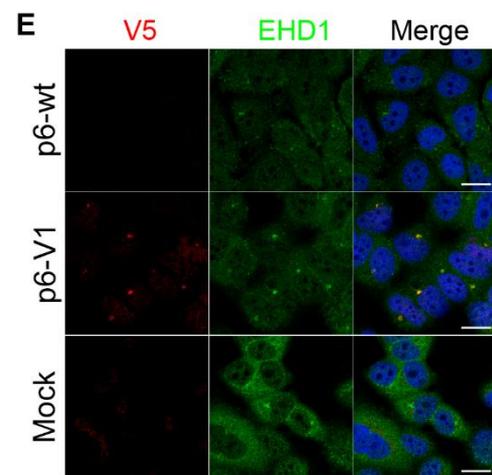
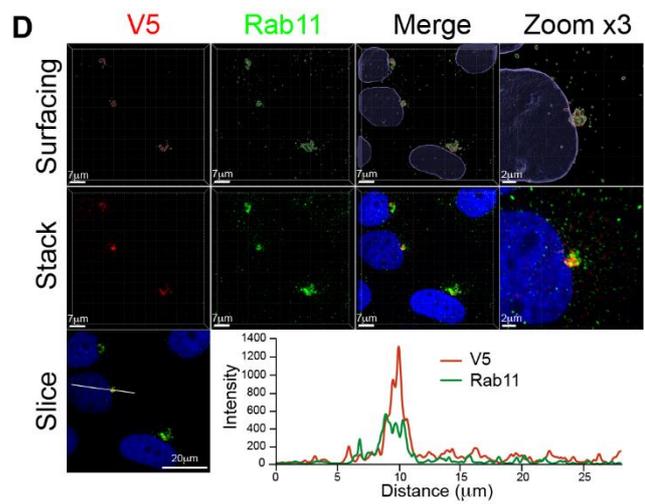
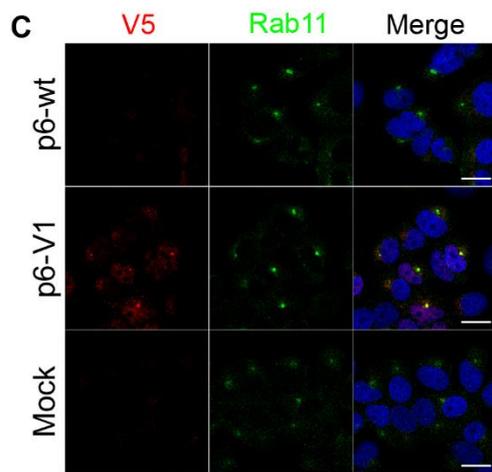
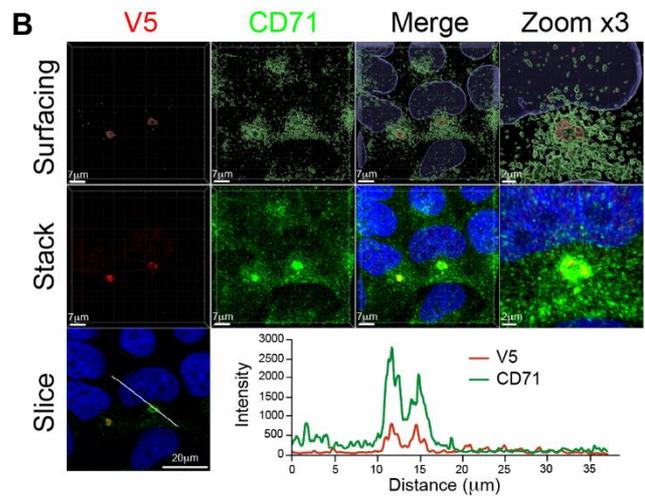
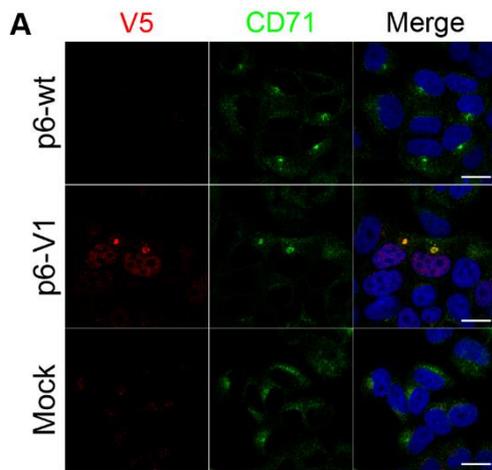


**Figure 9. Co-labeling of the HEV V5-tagged ORF1 protein with several cellular markers.**

The wt (p6-wt) and V5-tagged (p6-V1) ORF1 proteins were expressed in PLC3 cells electroporated with the p6 HEV strain. Three days post-electroporation, cells were co-labeled with anti-V5 antibody (red) and cellular markers antibodies (green) directed against CD71 (**Figures 9A,B**), Rab11 (**Figures 9C,D**), EHD1 (**Figure 9E**). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Mock-electroporated cells served as negative controls (Mock). Images were taken with a confocal microscope. Antibodies used are listed in **Table 2**. Scale bar = 20  $\mu$ m.

PLC3 cells electroporated with p6-V1 and co-stained with anti-V5 and antibodies directed against CD71 (**Figure 9B**) and Rab11 (**Figure 9D**) were analyzed by confocal microscopy with a high resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using the Imaris software are shown to visualize the V5-tagged ORF1/CD71 or Rab11 substructures. In the middle, z-stacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of V5-tagged ORF1 and CD71/Rab11 staining measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Scale bars show the indicated length.

**Figure 9F:** The regions of interest (ROI) were drawn around the perinuclear nugget-like structures on the immunofluorescence images of p6-V1 electroporated PLC3 cells co-labeled with antibodies directed against the V5 epitope and CD71, Rab11, EHD1 (**Figures 9A,C,E**) and CD63, CD81 and PACSIN2 (**Supplementary Figures 3D-F**). Thirty ROI were used to calculate PCC ( $\pm$  standard deviation) using JACoP plugin from ImageJ software.



## Tables

**Table 1.** Sequences of primers and probes used to make the epitope tagged-ORF1 constructs and to quantify the genomic and subgenomic HEV RNA by RT-qPCR. Each primer is named according to (i) the epitope insertion site (H1, H2, V1 or V2), (ii) upstream (Up) or downstream (Do) fragment, (iii) forward (F) or reverse (R) sense and (iv) external (ext) or internal (int) position. First, upstream and downstream fragments are amplified separately for each construct (*i.e.* for p6-H1-GLuc: upstream fragment amplified using H1-Up-F-ext / H1-Up-R-int and downstream fragment amplified using H1-Do-F-int / H1-Do-R-ext). Second, upstream and downstream fragments are fused thanks to the overlapping region. Third, the whole fragment containing the epitope is amplified using external primers (*i.e.* for p6-H1-GLuc: H1-Up-F-ext / H1-Do-R-ext). Note that the same primer H2-V1-V2-Do-R-ext was used for p6-H2-GLuc, p6-V1-GLuc and p6-V2-GLuc constructs. The p6-V1-GLuc construct was made using a single round of amplification and one primer pair: V1-F-ext / H2-V1-V2-Do-R-ext. Restriction sites are underlined in external primers. HA or V5 epitope sequence is highlighted in bold. Primers and probes used in RT-qPCR are listed. Fwd = forward, Rev = Reverse

Primer/probe name	Primer / probe sequence (5')	Restriction enzyme / epitope / reference
H1-Up-F-ext	<u>GTCATGCATGGTATTTGAAAATGACTTTTCGG</u>	Nsil
H1-Up-R-int	<b>GGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA</b> TTCTACCCGCTGTATGATGGAATTG	HA
H1-Do-F-int	<b>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC</b> TGAATAACATGTTTGTTCATCGCCC	HA
H1-Do-R-ext	TGGTCGCGAAGTTGCTGGCCACGGCC	NruI
H2-Up-F-ext	<u>GCGATATCCAAGGGCATGCGCCGGTTG</u>	EcoRV
H2-Up-R-int	<b>GGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA</b> ATCACTAGCAGGCGGGGTAGGG	HA
H2-Do-F-int	<b>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC</b> ATTTGGGCGTTACCACCGCCCTCCG	HA
H2-V1-V2-Do-R-ext	<u>TGCATATGTAGCAGCAACAGGTG</u>	NdeI
V1-F-ext	GAGGCGGCCGCCCTGCTTCGGCTGCTGCCCG <b>GGGAAGCCCATCCCTAACCCGCTCCTCG</b> <b>GTCTCGATTCTACGCCTGCTAGTGATATTTGGGCG</b>	NotI / V5
V2-Up-F-ext	<u>AGGCGGCCGCCCTGCT</u>	NotI
V2-Up-R-int	<b>CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC</b> ATCACTAGCAGGCGGGG TAGGG	V5
V2-Do-F-int	<b>GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGCTCGATTCTACG</b> ATTTGGGCGTTACCACCGCC CTCCG	V5
RT-qPCR - Fwd ORF1 primer	AAGACATTCTGCGCTTTGTT	Yin et al., 2017
RT-qPCR - Rev ORF1 primer	TGACTCCTATAAGCATCGC	Yin et al., 2017
RT-qPCR - ORF1 probe	CCGTGGTCCGTGCCATTGA	Yin et al., 2017
RT-qPCR - Fwd ORF2 primer	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	Jothikumar et al., 2006
RT-qPCR - Rev ORF2 primer	AGGGGTTGGTTGGATGAA	Jothikumar et al., 2006
RT-qPCR - ORF2 probe	TGATTCTCAGCCCTTCGC	Jothikumar et al., 2006
RT-qPCR - Fwd GLuc primer	TCTGTGTGGACTGCACAA	Ding et al., 2018, this study
R RT-qPCR - Rev GLuc primer	TGGATCTGCTGGCAAAGGT	Ding et al., 2018, this study
RT-qPCR - GLuc probe	GGCTTGCCAACGTGCAGTGT	Ding et al., 2018, this study

1 **Table 2.** List of primary antibodies used in this study.

Name	Target / epitope	Host species / isotype / clonality*	Supplier / reference	Antibody registry number	Dilution used in IF	Dilution used in IB/IP
V5	GKPIPPELLGLDST	Mouse IgG2a	Abcam	AB_471093	1:500	n/a
V5	GKPIPPELLGLDST	Mouse IgG2a	Invitrogen	AB_2792973	n/a	1:1000
V5	GKPIPPELLGLDST	Goat Polyclonal	Abcam	AB_307037	n/a	IP**
HA	YPYDVPDYA	Rat IgG1	Roche	AB_2687407	1:250	1:1000
HEV ORF2 (1E6)	GDSRVVIQDYDNQHEQDRPTPSA	Mouse IgG2b	Millipore	AB_827236	1:800	1:1000
HEV ORF3	ANPPDHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR	Rabbit Polyclonal	S. Emerson (Graff et al., 2005)	n/a	1:1000	n/a
CD63	Tetraspanin - Large extracellular loop	Mouse IgG1	BD Pharmingen	AB_396297	1:100	n/a
CD71	Transferrin receptor	Mouse IgG1	Santa Cruz	AB_1120670	1:100	n/a
CD81	Tetraspanin - Large extracellular loop	Mouse IgG1	S. Levy (Oren et al., 1990)	AB_627192	1:100	n/a
Rab11	Rab11	Rabbit (D4F5)	Cell Signaling	AB_10693925	1:100	n/a
MICAL-L1	Molecule Interacting with CasL-like1	Rabbit Polyclonal	Abcam	n/a	1:100	n/a
EHD1	Eps15 homology domain protein 1	Rabbit Polyclonal	Abcam	AB_10864800	1:1000	n/a
PACSIN2	Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 2	Rabbit Polyclonal	MyBiosource	n/a	1:1000	n/a
$\gamma$ -Tubulin	$\gamma$ -Tubulin N-terminal region	Mouse IgG1	Sigma-Aldrich	AB_532292	n/a	1:4000
Lamin B1	Nuclear envelope marker	Rabbit Polyclonal	Abcam	AB_443298	n/a	1:1000
Calnexin	Human Calnexin - ER membrane marker	Rabbit Polyclonal	Abcam	AB_2069006	n/a	1:1000

2 \*When clonality is not mentioned, the antibody is monoclonal. \*The antibody quantity used in immunoprecipitation is given in the Materials and Methods  
3 section. IF = immunofluorescence; IB = immunoblot; IP = immunoprecipitation; n/a = non applicable.

**Table 3.** Mass spectrometry analysis.

<b>Band number / construct</b>	<b>Coverage (%)</b>	<b>Number of identified peptides</b>	<b>N-term. identified peptides (score)</b>	<b>C-term. identified peptides (score)</b>
1 / p6-V1	38	129	1-8 (14)*	1758-1777(25)
2 / p6-V1	32	87	41-53(78)	1720-1734(65)
3 / p6-V1	31	68	86-94(49)	1720-1734(95)
4 / p6-V1	32	83	41-53(88)*	1695-1706(41)
5 / p6-V1	30	68	41-53(77)	1720-1734(79)
6 / p6-V1	20	48	41-53(72)	1651-1662(29)
7 / p6-V1	18	41	86-94(62)*	1403-1414(61)
8 / ORF1-V1	39	125	41-53(102)*	1720-1734(69)
9 / ORF1-V1	55	321	1-8(18)*	1758-1777(87)*
10 / ORF1-V1	71	672	1-8(14)*	1758-1777(87)*
11 / ORF1-V1	35	195	1-8(17)*	1405-1414(51)*
12 / ORF1-V1	40	185	1-8(24)*	1651-1662(58)
13 / ORF1-V1	31	102	1-8(24)*	1695-1706(30)
14 / ORF1-V1	19	75	1-8(25)*	1651-1662(32)
15 / ORF1-V1	17	63	1-8(18)*	1390-1398(49)
16 / ORF1-V1	17	66	1-8(24)*	1390-1398(40)

The full-length ORF1-V1 of the p6 Kernow C1 strain is 1779 aa in length. Bands 8-10 were visible on the colloidal blue stained gel but were not detected by the V5 antibody. Peptides with a cutoff ion score below 25 were not considered unless they were detected more than once. In that case, the highest score is shown. Peptides identified more than once are identified by \*. Peptides less than 7 and more than 30 aa residues were not detected.

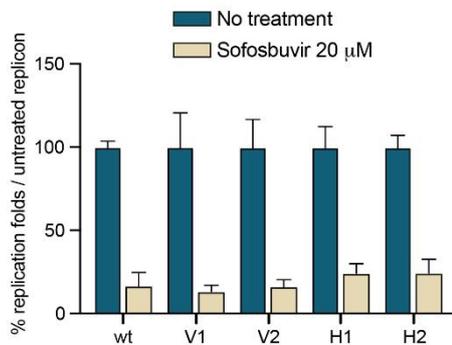
## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary Figure 1.** Replication inhibition of p6-GLuc replicons and p6 infectious strains in PLC3 and Huh-7.5 cells in presence of sofosbuvir.

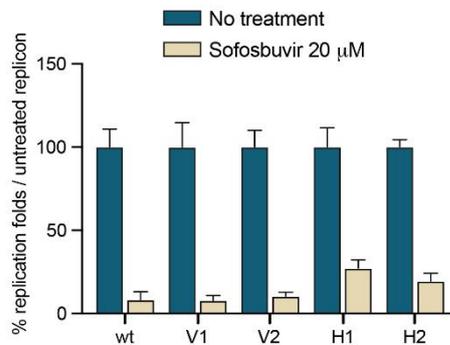
**Supplementary Figures 1A,B.** Replication efficacies of HEV replicons expressing tagged ORF1 in PLC3 and Huh-7.5 cells treated with sofosbuvir. Cells were electroporated with the tagged p6-GLuc replicons (V1, V2, H1, H2) or untagged p6-GLuc replicons (wt). Four hpe, sofosbuvir, an effective polymerase inhibitor, was added to the cell medium at a final concentration of 20  $\mu$ M. The relative light units (RLU) were measured at 5 dpe by quantification of the *Gaussia* luciferase in the cell supernatants using a luminometer. Replication fold increases were normalized to 1 dpe. Percentages of replication were calculated to the non-treated corresponding construct. Experiments were conducted three times with 3 technical replicates.

**Supplementary Figure 1C.** Immunofluorescence of p6-electroporated PLC3 cells in presence of sofosbuvir (20  $\mu$ M). Three dpe with the infectious p6-wt, p6-V1 or p6-V2 constructs, PLC3 cells were processed for immunostaining using an anti-ORF2 antibody (red, 1E6, **Table 2**) prior to confocal microscopy analysis. Cell nuclei were stained with Dapi (blue). Mock-electroporated PLC3 cells served as negative control. Scale bar = 50  $\mu$ M.

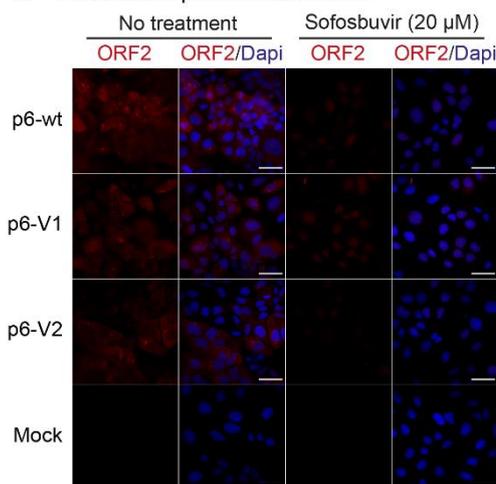
**A** PLC3 cells / p6-GLuc replicons



**B** Huh-7.5 cells / p6-GLuc replicons



**C** PLC3 cells / p6 infectious strain

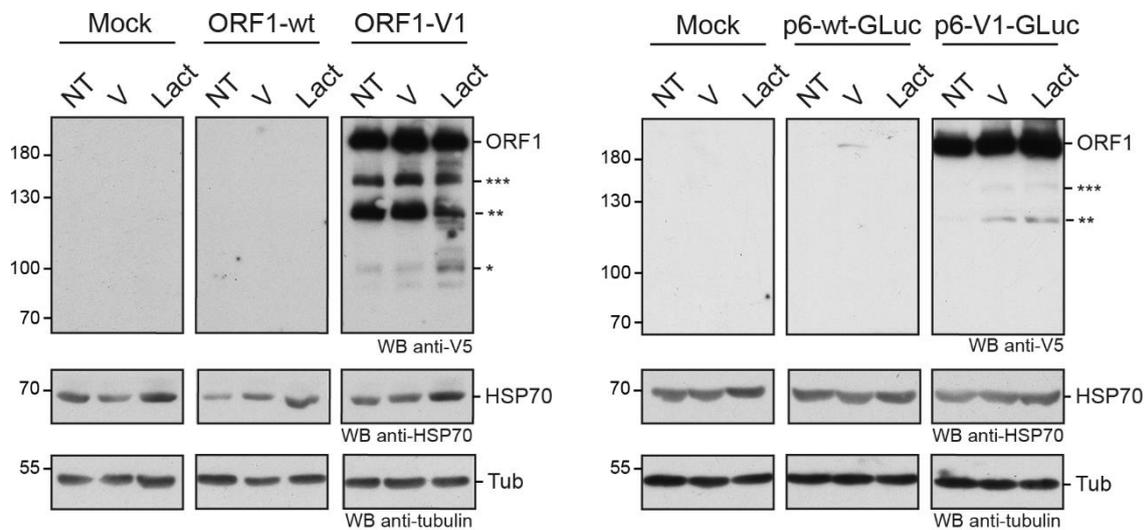


**Supplementary Figure 2. Proteasome inhibition by lactacystin.**

H7-T7-IZ cells were transfected with the pTM expressing the untagged ORF1 (ORF1-wt) or the V5-tagged ORF1 (ORF1-V1, **Supplementary Figure 2A**). PLC3 cells were electroporated with the p6-GLuc replicons expressing the untagged ORF1 (p6-wt-GLuc) or the V5-tagged ORF1 (p6-V1-GLuc, **Supplementary Figure 2B**). One dpt of H7-T7-IZ and 3 dpe of PLC3 cells, a specific proteasome inhibitor lactacystin (30  $\mu$ M, Sigma Aldrich) was applied for 8 hours and total cell lysates were collected in presence of protease inhibitors. The band migrating higher than 180 kDa corresponds to the full-length ORF1 protein (ORF1). Mock-transfected cells served as negative control (Mock). Immunoblots were probed with antibodies directed against the V5 epitope, HSP70 and  $\alpha$ -tubulin (Tub) proteins (**Table 2**). HSP70 and  $\alpha$ -tubulin are detected to monitor for efficient proteasome inhibition and for even protein loading, respectively. NT: non-treated samples; V: vehicle-treated samples (methanol); Lact: lactacystin-treated samples. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons. Stars indicate lower molecular weight ORF1 products.

**A** Heterologous expression system

**B** p6-GLuc replicon system



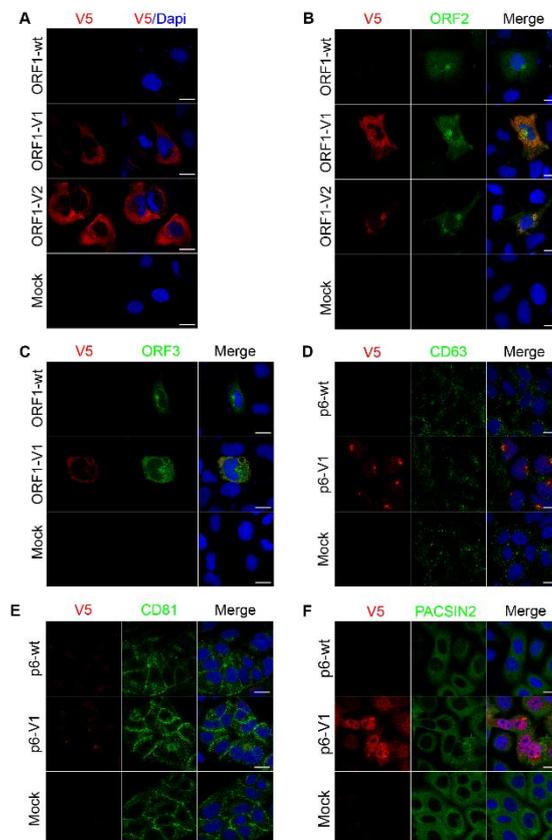
Supplementary Figure 2

### Supplementary Figure 3. Co-localization of the HEV proteins in the host cell.

**Figure 3A.** Eight hpt, H7-T7-IZ cells expressing either the wildtype ORF1 (ORF1-wt) or the V5-tagged ORF1 proteins (ORF1-V1, ORF1-V2) were processed for anti-V5 immunostaining (red, **Table 2**) prior to analysis by confocal microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Mock-transfected cells served as negative control. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**Figures 3B,C.** Co-labeling of the V5-tagged HEV replicase with ORF2 or ORF3 in H7-T7-IZ cells. Cells were treated as above. Then, the V5-tagged ORF1 protein (V5 antibody, red) was co-labeled with the ORF2 (green, **Figure 3B**) or the ORF3 (green, **Figure 3C**) proteins prior to analysis by confocal microscopy. Used antibodies are listed in **Table 2**. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**Figures 3D-F.** Co-labeling of the HEV V5-tagged ORF1 protein with several cellular markers. The wt (p6-wt) and V5-tagged (p6-V1) ORF1 proteins were expressed in PLC3 cells electroporated with the p6 HEV infectious strain. Three dpe, cells were co-labeled with anti-V5 antibody (red) and cellular markers antibodies (green) directed against CD63 (**Figure 3D**), CD81 (**Figure 3E**) and PACSIN2 (**Figure 3F**) prior to confocal microscopy analysis. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Mock-electroporated cells served as negative controls (Mock). Scale bar = 20  $\mu$ m.



**Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Author Contributions**

K.M., C.B., K.H., C.M., V.A., C.M., J-M.-F., M.F., C.C., Y.R., C.L., J.D., L.C. and C-M.A-D. performed research and/or analyzed data.

C-M.A-D. and K.M. wrote the paper.

**Funding**

This work was supported by a grant from the French agency ANRS-Maladies infectieuses émergentes. K.M. was supported by a fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education. C.B. and K.H. were supported by fellowships from the French agency ANRS-Maladies infectieuses émergentes. M.F. was supported by a fellowship from the Pasteur Institute and Région Hauts-de-France.

**Acknowledgments**

We thank Suzanne U Emerson (NIH, USA), Jérôme Gouttenoire (University of Lausanne) and Ralph Bartenschlager (University of Heidelberg) for providing us with reagents.

## References

- Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S., and Daelemans, D. (2021). Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol* 6, 1219–1232. doi:10.1038/s41564-021-00958-0.
- Bentaleb, C., Hervouet, K., Montpellier, C., Camuzet, C., Burlaud-Gaillard, J., Ferrié, M., et al. (2021). The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for Hepatitis E Virus. *Biorxiv*, 2021.10.14.464345. doi:10.1101/2021.10.14.464345.
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J., and Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of hepatology* 65, 200–212. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.045.
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J. M. V., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., et al. (2017). Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 1147–1152. doi:10.1073/pnas.1614955114.
- Ding, Q., Nimgaonkar, I., Archer, N. F., Bram, Y., Heller, B., Schwartz, R. E., et al. (2018). Identification of the Intragenomic Promoter Controlling Hepatitis E Virus Subgenomic RNA Transcription. *mBio* 9, 23–15. doi:10.1128/mbio.00769-18.
- Emerson, S. U., Nguyen, H. T., Torian, U., Mather, K., and Firth, A. E. (2013). An essential RNA element resides in a central region of hepatitis E virus ORF2. *Journal of General Virology* 94, 1468–1476. doi:10.1099/vir.0.051870-0.
- Farhat, R., Ankavay, M., Lebsir, N., Gouttenoire, J., Jackson, C. L., Wychowski, C., et al. (2018). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cellular microbiology* 20. doi:10.1111/cmi.12804.
- Gouttenoire, J., Pollán, A., Abrami, L., Oechslin, N., Mauron, J., Matter, M., et al. (2018). Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLoS Pathogens* 14, e1007471. doi:10.1371/journal.ppat.1007471.
- Graff, J., Nguyen, H., Yu, C., Elkins, W. R., Claire, M. St., Purcell, R. H., et al. (2005). The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. *J Virol* 79, 6680–6689. doi:10.1128/jvi.79.11.6680-6689.2005.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., and Emerson, S. U. (2006). A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. *J Virol* 80, 5919–5926. doi:10.1128/jvi.00046-06.
- Gu, M., and Rice, C. M. (2013). Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required for replicase assembly and function. *Curr Opin Virol* 3, 129–136. doi:10.1016/j.coviro.2013.03.013.
- Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R. G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P., et al. (2014). An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *Journal of viral hepatitis* 21, 447–456. doi:10.1111/jvh.12157.

- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J., and Hill, V. R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods* 131, 65–71. doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.004.
- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., et al. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 3, 17086–16. doi:10.1038/nrdp.2017.86.
- Kenney, S. P., and Meng, X.-J. (2015). Identification and Fine Mapping of Nuclear and Nucleolar Localization Signals within the Human Ribosomal Protein S17. *PLoS one* 10, e0124396-17. doi:10.1371/journal.pone.0124396.
- Kenney, S. P., and Meng, X.-J. (2019). Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9. doi:10.1101/cshperspect.a031724.
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., and Bradley, D. W. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8259–8263.
- LeDesma, R., Nimgaonkar, I., and Ploss, A. (2019). Hepatitis E Virus Replication. *Viruses* 11. doi:10.3390/v11080719.
- Lenggenhager, D., Gouttenoire, J., Malehmir, M., Bawohl, M., Honcharova-Biletska, H., Kreutzer, S., et al. (2017). Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *Journal of Hepatology* 67, 471–479. doi:doi:10.1016/j.jhep.2017.04.002.
- Lhomme, S., Abravanel, F., Dubois, M., Sandres-Saune, K., Mansuy, J.-M., Rostaing, L., et al. (2014). Characterization of the polyproline region of the hepatitis E virus in immunocompromised patients. *Journal of virology* 88, 12017–12025. doi:10.1128/jvi.01625-14.
- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J., and Kamar, N. (2020). Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *Journal of clinical medicine* 9. doi:10.3390/jcm9020331.
- Liao, W., Li, X., Mancini, M., and Chan, L. (2006). Proteasome inhibition induces differential heat shock protein response but not unfolded protein response in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 99, 1085–1095. doi:10.1002/jcb.20996.
- Liu, D., Tedbury, P. R., Lan, S., Huber, A. D., Puray-Chavez, M. N., Ji, J., et al. (2019). Visualization of Positive and Negative Sense Viral RNA for Probing the Mechanism of Direct-Acting Antivirals against Hepatitis C Virus. *Viruses* 11, 1039. doi:10.3390/v11111039.
- Montpellier, C., Wychowski, C., Sayed, I. M., Meunier, J.-C., Saliou, J.-M., Ankavay, M., et al. (2018). Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* 154, 211-223.e8. doi:10.1053/j.gastro.2017.09.020.
- Muñoz-Chimeno, M., Cenalmor, A., Garcia-Lugo, M. A., Hernandez, M., Rodriguez-Lazaro, D., and Avellon, A. (2020). Proline-Rich Hypervariable Region of Hepatitis E Virus: Arranging the Disorder. *Microorg* 8, 1417. doi:10.3390/microorganisms8091417.

- Nguyen, H. T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R. E., Thompson, E., 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. *J Gen Virol* 93, 526–530. doi:10.1099/vir.0.037259-0.
- Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R. E., and Ploss, A. (2018). Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nature Publishing Group* 15, 96–110. doi:10.1038/nrgastro.2017.150.
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., and Levy, S. (1990). TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 10, 4007–4015. doi:10.1128/mcb.10.8.4007.
- Pérez-Gracia, M. T., Suay-García, B., and Mateos-Lindemann, M. L. (2017). Hepatitis E and pregnancy: current state. *Rev Med Virol* 27, e1929. doi:10.1002/rmv.1929.
- Ploss, A., and Dubuisson, J. (2012). New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* 61, i25. doi:10.1136/gutjnl-2012-302048.
- Proudfoot, A., Hyrina, A., Holdorf, M., Frank, A. O., and Bussiere, D. (2019). First Crystal Structure of a Nonstructural Hepatitis E Viral Protein Identifies a Putative Novel Zinc-Binding Protein. *Journal of virology* 93. doi:10.1128/jvi.00170-19.
- Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H., and Panda, S. K. (2008). Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370, 77–92. doi:10.1016/j.virol.2007.07.036.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., et al. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens* 8, e1003056. doi:10.1371/journal.ppat.1003056.
- Schofield, D. J., Glamann, J., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2000). Identification by Phage Display and Characterization of Two Neutralizing Chimpanzee Monoclonal Antibodies to the Hepatitis E Virus Capsid Protein. *J Virol* 74, 5548–5555. doi:10.1128/jvi.74.12.5548-5555.2000.
- Shiota, T., Li, T.-C., Yoshizaki, S., Kato, T., Wakita, T., and Ishii, K. (2013). The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. *Journal of virology* 87, 6031–6036. doi:10.1128/jvi.00444-13.
- Shukla, P., Nguyen, H. T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R. E., 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, 5697–5707. doi:10.1128/jvi.00146-12.
- Shukla, P., Nguyen, H. T., Torian, U., Engle, R. E., Faulk, K., Dalton, H. R., 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, 2438–2443. doi:10.1073/pnas.1018878108.
- Smith, D. B., and Simmonds, P. (2018). Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. *Csh Perspect Med* 8, a031880. doi:10.1101/cshperspect.a031880.

- Szkolnicka, D., Pollán, A., Silva, N. D., Oechslin, N., Gouttenoire, J., and Moradpour, D. (2019). Recombinant Hepatitis E Viruses Harboring Tags in the ORF1 Protein. *Journal of virology* 93. doi:10.1128/jvi.00459-19.
- Thi, V. L. D., Debing, Y., Wu, X., Rice, C. M., Neyts, J., Moradpour, D., et al. (2016). Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology* 150, 82-85.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.011.
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6.
- Wang, B., and Meng, X.-J. (2021). Structural and Molecular Biology of Hepatitis E Virus. *Comput Struct Biotechnology J* 19, 1907–1916. doi:10.1016/j.csbj.2021.03.038.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., et al. (2012). RNAscope A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagnostics* 14, 22–29. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- Webb, G. W., and Dalton, H. R. (2020). Hepatitis E: an expanding epidemic with a range of complications. *Clin Microbiol Infec* 26, 828–832. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.039.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., et al. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007.
- Yin, X., Li, X., Ambardekar, C., Hu, Z., Lhomme, S., and Feng, Z. (2017). Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathogens* 13, e1006417. doi:10.1371/journal.ppat.1006417.
- Young, J. T. F., and Heikkila, J. J. (2010). Proteasome inhibition induces hsp30 and hsp70 gene expression as well as the acquisition of thermotolerance in *Xenopus laevis* A6 cells. *Cell Stress Chaperones* 15, 3236334. doi:10.1007/s12192-009-0147-4.
- WHO. (2021). Hepatitis E: fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>

## **Références bibliographiques**

- Abravanel, F., Lhomme, S., El Costa, H., Schwartz, B., Peron, J.-M., Kamar, N., Izopet, J., 2017. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerg Infect Dis* 23, 1191–1193. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170318>
- Abravanel, F., Nicot, F., Lhomme, S., Cazabat, M., Drumel, T., Velay, A., Latour, J., Belliere, J., Cintas, P., Kamar, N., Izopet, J., 2021. Hepatitis E Virus Quasispecies in Cerebrospinal Fluid with Neurological Manifestations. *Vaccines* 9, 1205. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101205>
- Abravanel, F., Pique, J., Couturier, E., Nicot, F., Dimeglio, C., Lhomme, S., Chiabrando, J., Saune, K., Péron, J.-M., Kamar, N., Evrard, S., de Valk, H., Cintas, P., Izopet, J., 2018. Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *Journal of Infection* 77, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.007>
- ACS Full Text Snapshot, n.d.
- Aggarwal, R., 2013. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 24–33. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.187>
- Aggarwal, R., Krawczynski, K., 2000. Hepatitis E: An overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15, 9–20. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02006.x>
- Aggarwal, R., Naik, S., 2009. Epidemiology of hepatitis E: Current status. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 1484–1493. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05933.x>
- Aggarwal, R., Shukla, R., Jameel, S., Agrawal, S., Puri, P., Gupta, V.K., Patil, A.P., Naik, S., 2007. T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *Journal of Viral Hepatitis* 14, 283–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00796.x>
- 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, 87–101. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0819>
- Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S., 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 161, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.011>
- Ahola, T., den Boon, J.A., Ahlquist, P., 2000. Helicase and Capping Enzyme Active Site Mutations in Brome Mosaic Virus Protein 1a Cause Defects in Template Recruitment, Negative-Strand RNA Synthesis, and Viral RNA Capping. *J Virol* 74, 8803–8811.
- Ahola, T., Karlin, D.G., 2015. Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biol Direct* 10, 16. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0050-0>
- Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H., Kääriäinen, L., 1997. Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *Journal of Virology* 71, 392–397. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.1.392-397.1997>
- Akanbi, O.A., Harms, D., Wang, B., Opaleye, O.O., Adesina, O., Osundare, F.A., Ogunniyi, A., Naidoo, D., Devaux, I., Wondimagegnehu, A., Peter, C., Ifeanyi, O., Ogundiran, O., Ugochukwu, U., Mba, N., Omilabu, S.A., Ihekweazu, C., Bock, C.-T., 2019. Complete Genome Sequence of a Hepatitis E Virus Genotype 1e Strain from an Outbreak in Nigeria, 2017. *Microbiology Resource Announcements* 8, e01378-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01378-18>
- Al-Ayoubi, J., Behrendt, P., Bremer, B., Suneetha, P.V., Gisa, A., Rinker, F., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Kraft, A.R.M., 2018. Hepatitis E virus ORF 1 induces proliferative and functional T-cell responses in patients with ongoing and resolved hepatitis E. *Liver International* 38, 266–277. <https://doi.org/10.1111/liv.13521>

- Alirezaei, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., Harkins, S., Whitton, J.L., 2015. Coxsackievirus can exploit LC3 in both autophagy-dependent and-independent manners in vivo. *Autophagy* 11, 1389–1407.
- Allweiss, L., Gass, S., Giersch, K., Groth, A., Kah, J., Volz, T., Rapp, G., Schöbel, A., Lohse, A.W., Polywka, S., Pischke, S., Herker, E., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2016. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *Journal of Hepatology* 64, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.011>
- Alric, Laurent; Bonnet, Delphine; Beynes-rauzy, Odile; Izopet, Jacques; Kamar, Nassim., 2011. Definitive Clearance of a Chronic Hepatitis E Virus Infection With Ribavirin Treatment - ProQuest [WWW Document]. URL <https://www.proquest.com/openview/26ee8079c211a76531b819ea7654542e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2041977> (accessed 8.29.21).
- Al-Sadeq, D., Majdalawieh, A., Mesleh, A., Abdalla, O., Nasrallah, G., 2018. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *Journal of Medical Microbiology* 67. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000706>
- Amako, Y., Syed, G.H., Siddiqui, A., 2011. Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *Journal of Biological Chemistry* 286, 11265–11274.
- Anang, S., Subramani, C., Nair, V.P., Kaul, S., Kaushik, N., Sharma, C., Tiwari, A., Ranjith-Kumar, C.T., Surjit, M., 2016. Identification of critical residues in Hepatitis E virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and ORF3 proteins. *Sci Rep* 6, 25133. <https://doi.org/10.1038/srep25133>
- Angelini, M.M., Akhlaghpour, M., Neuman, B.W., Buchmeier, M.J., 2021. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio* 4, e00524-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13>
- Ankavay, M., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2018. Le virus de l'hépatite E-Un virus méconnu qui se dévoile. *médecine/sciences* 34, 1071–1078.
- Ankavay, M., Montpellier, C., Sayed, I.M., Saliou, J.-M., Wychowski, C., Saas, L., Duvet, S., Aliouat-Denis, C.-M., Farhat, R., de Masson d'Autume, V., Meuleman, P., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2019. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep* 9, 6243. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42737-2>
- Ansari, I.H., Nanda, S.K., Durgapal, H., Agrawal, S., Mohanty, S.K., Gupta, D., Jameel, S., Panda, S.K., 2000. Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1). *Journal of Medical Virology* 60, 275–283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(200003\)60:3<275::AID-JMV5>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(200003)60:3<275::AID-JMV5>3.0.CO;2-9)
- Anty, R., Ollier, L., Peron, J.M., Nicand, E., Cannavo, I., Bongain, A., Giordanengo, V., Tran, A., 2012. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *Journal of Clinical Virology* 54, 76–78.
- Arankalle, 1998. Role of immune serum globulins in pregnant women during an epidemic of hepatitis E - [WWW Document]. URL [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2893.1998.00096.x?casa\\_token=f5Rgm0oNIugAAAAA:PNAE4AOrIGDBP8I56mleOyBrgKGW-UaBB9WfQtOTHx2NBv9-qCmHKwbtk8zIkYvwTEWFLMSDPyGD0\\_DCsg](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2893.1998.00096.x?casa_token=f5Rgm0oNIugAAAAA:PNAE4AOrIGDBP8I56mleOyBrgKGW-UaBB9WfQtOTHx2NBv9-qCmHKwbtk8zIkYvwTEWFLMSDPyGD0_DCsg) (accessed 8.29.21).
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S., Chobe, L.P., Nair, R., Banerjee, K., 1995. Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different Indian isolates of hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology* 46, 358–363. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890460411>

- Arankalle, V.A., Favorov, M.O., Chadha, M.S., Phule, D.M., Banerjee, K., 1993. Rhesus monkeys infected with hepatitis E virus (HEV) from the former USSR are immune to subsequent challenge with an Indian strain of HEV. *Acta Virol* 37, 515–518.
- Arankalle, V.A., Ticehurst, J., Sreenivasan, M.A., Kapikian, A.Z., Popper, H., Pavri, K.M., Purcell, R.H., 1988. AETIOLOGICAL ASSOCIATION OF A VIRUS-LIKE PARTICLE WITH ENTERICALLY TRANSMITTED NON-A, NON-B HEPATITIS. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8585 331, 550–554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91351-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91351-7)
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H., 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40, W597–W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Aslan, A.T., Balaban, H.Y., 2020. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroenterol* 26, 5543–5560. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543>
- Bagdassarian, E., Doceul, V., Pellerin, M., Demange, A., Meyer, L., Jouvenet, N., Pavio, N., 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, 726. <https://doi.org/10.3390/v10120726>
- Bakhache, W., Couderc, É., Neyret, A., Briant, L., 2019. Architecture et biogenèse des organelles de réplication des virus à ARN de polarité positive. *Virologie* 23, 160–175. <https://doi.org/10.1684/vir.2019.0779>
- Balaban, H.Y., Aslan, A.T., Akdoğan Kittana, F.N., Alp, A., Dağ, O., Ayar, Ş.N., Vahabov, C., Şimşek, C., Yıldırım, T., Göker, H., Ergünay, K., Erdem, Y., Büyükaşık, Y., Şimşek, H., 2021. Hepatitis E virus seroprevalence and associated risk factors in high-risk groups: A cross-sectional study from Turkey (preprint). *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.21250429>
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., Poleschuk, V.F., 1983. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *INT* 20, 23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>
- Bazerbachi, F., Haffar, S., Garg, S.K., Lake, J.R., 2016. Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. *Gastroenterology Report* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/gov042>
- Behrendt, Birgit Bremer, Daniel Todt, Richard J. P. Brown, Albert Heim, Michael P. Manns, Eike Steinmann, Heiner Wedemeyer, 2016. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection | *The Journal of Infectious Diseases* | Oxford Academic [WWW Document]. URL <https://academic.oup.com/jid/article/214/3/361/2577407?login=true> (accessed 8.31.21).
- Behrendt, P., Lüth, S., Dammermann, W., Drave, S., Brown, R.J.P., Todt, D., Schnoor, U., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Pischke, S., Iking-Konert, C., 2017. Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNF $\alpha$  treatment. *Joint Bone Spine* 84, 217–219. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.017>
- Belov, G.A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E., 2008. A Critical Role of a Cellular Membrane Traffic Protein in Poliovirus RNA Replication. *PLOS Pathogens* 4, e1000216. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000216>
- Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R., Ehrenfeld, E., 2012a. Complex

- Dynamic Development of Poliovirus Membranous Replication Complexes. *J Virol* 86, 302–312. <https://doi.org/10.1128/JVI.05937-11>
- Belov, G.A., van Kuppeveld, F.J., 2012. (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Current Opinion in Virology, Virus replication in animals and plants* 2, 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.006>
- Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Ali, R., Dalton, H., 2010. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *Journal of Medical Virology* 82, 799–805. <https://doi.org/10.1002/jmv.21656>
- Berg, B. van den, Eijk, A.A. van der, Pas, S.D., Hunter, J.G., Madden, R.G., Tio-Gillen, A.P., Dalton, H.R., Jacobs, B.C., 2014. Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology* 82, 491–497. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000111>
- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., Mateu, G., Grakoui, A., Randall, G., 2009. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7577–7582.
- Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., Randall, G., 2011. Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication  $\nu$ . *J Virol* 85, 8870–8883. <https://doi.org/10.1128/JVI.00059-11>
- Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Pavio, N., Van der Poel, W.H., Banks, M., 2013. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerging infectious diseases* 19, 264.
- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160, 220–226. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90063-8)
- Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y., Bossart, W., 1983. Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology* 131, 39–48. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90531-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90531-7)
- Biliotti, E., Franchi, C., Spaziante, M., Garbuglia, A.R., Volpicelli, L., Palazzo, D., De Angelis, M., Esvan, R., Taliani, G., 2018. Autochthonous acute hepatitis E: treatment with sofosbuvir and ribavirin. *Infection* 46, 725–727. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1168-7>
- Bird, S.W., Maynard, N.D., Covert, M.W., Kirkegaard, K., 2014. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 13081–13086.
- Bishé, B., Syed, G.H., Field, S.J., Siddiqui, A., 2012. Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in hepatitis C virus secretion. *Journal of Biological Chemistry* 287, 27637–27647.
- Borkakoti, J., Ahmed, G., Kar, P., 2016. Report of a novel C1483W mutation in the hepatitis E virus polymerase in patients with acute liver failure. *Infection, Genetics and Evolution* 44, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.030>
- Borkakoti, J., Ahmed, G., Rai, A., Kar, P., 2017. Report of novel H105R, D29N, V27A mutations in the methyltransferase region of the HEV genome in patients with acute liver failure. *Journal of Clinical Virology* 91, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.017>

- Boutrouille, A., Bakkali-Kassimi, L., Crucière, C., Pavio, N., 2007. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *Journal of clinical microbiology* 45, 2009–2010.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., van der Poel, W.H., 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Veterinary Research* 5, 1–12.
- Bradley, D.W., Krawczynski, K., Cook, E.H., McCaustland, K.A., Humphrey, C.D., Spelbring, J.E., Myint, H., Maynard, J.E., 1987. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *PNAS* 84, 6277–6281. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.17.6277>
- Brochot, E., Castelain, S., Duverlie, G., Capron, D., Nguyen-Khac, E., François, C., 2010. Ribavirin monitoring in chronic hepatitis C therapy: anaemia versus efficacy. *Antivir Ther* 15, 687–95.
- Brown, A., Halliday, J.S., Swadling, L., Madden, R.G., Bendall, R., Hunter, J.G., Maggs, J., Simmonds, P., Smith, D.B., Vine, L., McLaughlin, C., Collier, J., Bonsall, D., Jeffery, K., Dunachie, S., Klenerman, P., Izopet, J., Kamar, N., Dalton, H.R., Barnes, E., 2016. Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. *Hepatology* 64, 1934–1950. <https://doi.org/10.1002/hep.28819>
- Bu, Q., Wang, X., Wang, L., Liu, P., Geng, J., Wang, M., Han, J., Zhu, Y., Zhuang, H., 2012. Hepatitis E virus genotype 4 isolated from a patient with liver failure: Full-length sequence analysis showing potential determinants of virus pathogenesis. *Archives of virology* 158. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1488-3>
- Burger, K.N.J., Demel, R.A., Schmid, S.L., de Kruijff, B., 2000. Dynamin Is Membrane-Active: Lipid Insertion Is Induced by Phosphoinositides and Phosphatidic Acid. *Biochemistry* 39, 12485–12493. <https://doi.org/10.1021/bi000971r>
- Caldas, L.A., Carneiro, F.A., Higa, L.M., Monteiro, F.L., da Silva, G.P., da Costa, L.J., Durigon, E.L., Tanuri, A., de Souza, W., 2020. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci Rep* 10, 16099. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73162-5>
- 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, 13040–13044. <https://doi.org/10.1128/JVI.01475-10>
- Cao, D., Ni, Y.-Y., Meng, X.-J., 2018. Substitution of amino acid residue V1213 in the helicase domain of the genotype 3 hepatitis E virus reduces virus replication. *Virol J* 15, 32. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0943-5>
- Capelli, N., Marion, O., Dubois, M., Allart, S., Bertrand-Michel, J., Lhomme, S., Abravanel, F., Izopet, J., Chapuy-Regaud, S., 2019. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *Journal of Virology* 93, e01207-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01207-18>
- Chang, J., Guo, J.-T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., Block, T.M., 2008. Liver-Specific MicroRNA miR-122 Enhances the Replication of Hepatitis C Virus in Nonhepatic Cells. *Journal of Virology* 82, 8215–8223. <https://doi.org/10.1128/JVI.02575-07>
- Chen, H.Y., Lu, Y., Howard, T., Anderson, D., Fong, P.Y., Hu, W.-P., Chia, C.P., Guan, M., 2005. Comparison of a New Immunochromatographic Test to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Hepatitis

- E Virus in Human Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 12, 593–598. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.593-598.2005>
- Chen, Y., Liu, B., Sun, Y., Li, H., Du, T., Nan, Y., Hiscox, J.A., Zhou, E.-M., Zhao, Q., 2018. Characterization of Three Novel Linear Neutralizing B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Swine Hepatitis E Virus. *Journal of Virology* 92, e00251-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00251-18>
- Chilaka, V.N., Konje, J.C., 2021. Viral Hepatitis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 256, 287–296.
- Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., Randall, G., 2012. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS pathogens* 8, e1002466.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R., 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *The Journal of infectious diseases* 202, 825–834.
- Cordeiro, G., 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *The EMBO Journal* 22, 1953–1958. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg209>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., Bartenschlager, R., 2017. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports* 18, 2113–2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Cossaboom, C.M., Córdoba, L., Dryman, B.A., Meng, X.-J., 2011. Hepatitis E Virus in Rabbits, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 2047–2049. <https://doi.org/10.3201/eid1711.110428>
- D’Agostino, L., Nie, Y., Goswami, S., Tong, K., Yu, S., Bandyopadhyay, S., Flores, J., Zhang, X., Balasubramanian, I., Joseph, I., 2019. Recycling endosomes in mature epithelia restrain tumorigenic signaling. *Cancer research* 79, 4099–4112.
- Dales, S., Eggers, H.J., Tamm, I., Palade, G.E., 1965. Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* 26, 379–389.
- Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Tedder, R.S., Ijaz, S., 2009. Persistent Carriage of Hepatitis E Virus in Patients with HIV Infection. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc0903778>. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0903778>
- Dalton, H.R., Kamar, N., van Eijk, J.J.J., Mclean, B.N., Cintas, P., Bendall, R.P., Jacobs, B.C., 2016. Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol* 12, 77–85. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.234>
- De Biase, D., Prisco, F., Piegari, G., Ilsami, A., d’Aquino, I., Baldassarre, V., Zito Marino, F., Franco, R., Papparella, S., Paciello, O., 2021. RNAScope in situ Hybridization as a Novel Technique for the Assessment of c-KIT mRNA Expression in Canine Mast Cell Tumor. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.591961>
- de Castro, I.F., Volonté, L., Risco, C., 2013. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cellular Microbiology* 15, 24–34. <https://doi.org/10.1111/cmi.12029>
- Debing, Y., Emerson, S.U., Wang, Y., Pan, Q., Balzarini, J., Dallmeier, K., Neyts, J., 2014a. Ribavirin Inhibits In Vitro Hepatitis E Virus Replication through Depletion of Cellular GTP Pools and Is Moderately Synergistic with Alpha Interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 267–273. <https://doi.org/10.1128/AAC.01795-13>
- Debing, Y., Gisa, A., Dallmeier, K., Pischke, S., Bremer, B., Manns, M., Wedemeyer, H., Suneetha, P.V., Neyts, J., 2014b. A Mutation in the Hepatitis E Virus RNA Polymerase Promotes Its Replication and Associates With Ribavirin Treatment Failure in Organ

- Transplant Recipients. *Gastroenterology* 147, 1008-1011.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.040>
- Debing, Y., Ramière, C., Dallmeier, K., Piorkowski, G., Trabaud, M.-A., Lebossé, F., Scholtès, C., Roche, M., Legras-Lachuer, C., de Lamballerie, X., André, P., Neyts, J., 2016. Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. *Journal of Hepatology* 65, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.002>
- Decroly, E., Debarnot, C., Ferron, F., Bouvet, M., Coutard, B., Imbert, I., Gluais, L., Papageorgiou, N., Sharff, A., Bricogne, G., Ortiz-Lombardia, M., Lescar, J., Canard, B., 2011. Crystal Structure and Functional Analysis of the SARS-Coronavirus RNA Cap 2'-O-Methyltransferase nsp10/nsp16 Complex. *PLOS Pathogens* 7, e1002059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002059>
- Deniel, C., Coton, T., Brardjanian, S., Guisset, M., Nicand, E., Simon, F., 2011. Acute pancreatitis: A rare complication of acute hepatitis E. *Journal of Clinical Virology* 51, 202–204. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.04.009>
- Devhare, P., Sharma, K., Mhaindarkar, V., Arankalle, V., Lole, K., 2014. Analysis of helicase domain mutations in the hepatitis E virus derived from patients with fulminant hepatic failure: Effects on enzymatic activities and virus replication. *Virus Research* 184, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.018>
- Devhare, P.B., Chatterjee, S.N., Arankalle, V.A., Lole, K.S., 2013. Analysis of Antiviral Response in Human Epithelial Cells Infected with Hepatitis E Virus. *PLOS ONE* 8, e63793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063793>
- Devhare, P.B., Desai, S., Lole, K.S., 2016. Innate immune responses in human hepatocyte-derived cell lines alter genotype 1 hepatitis E virus replication efficiencies. *Scientific reports* 6, 1–10.
- Diestra, E., Fontana, J., Guichard, P., Marco, S., Risco, C., 2009. Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 165, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.11.009>
- Ding, B., Cui, B., Gao, M., Li, Z., Xu, C., Fan, S., He, W., 2017b. Knockdown of ras-related protein 25 (Rab25) inhibits the in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of human glioblastoma multiforme cells. *Oncology research* 25, 331.
- Ding, Ila Nimgaonkar, Nicholas F. Archer, Yaron Bram, Brigitte Heller, Robert E. Schwartz, and Alexander Ploss, 2018. Identification of the Intragenomic Promoter Controlling Hepatitis E Virus Subgenomic RNA Transcription | *mBio* [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.00769-18> (accessed 9.1.21).
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J.M.V., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J.E., Ploss, A., 2017a. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *PNAS* 114, 1147–1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614955114>
- Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A., Pavio, N., 2016. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses* 8, 270.
- Donnelly, M.C., Imlach, S.N., Abravanel, F., Ramalingam, S., Johannessen, I., Petrik, J., Fraser, A.R., Campbell, J.D.M., Bramley, P., Dalton, H.R., Hayes, P.C., Kamar, N., Simpson, K.J., 2017b. Sofosbuvir and Daclatasvir Anti-Viral Therapy Fails to Clear HEV Viremia and Restore Reactive T Cells in a HEV/HCV Co-Infected Liver Transplant Recipient. *Gastroenterology* 152, 300–301. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.060>
- Donnelly, M.C., Scobie, L., Crossan, C.L., Dalton, H., Hayes, P.C., Simpson, K.J., 2017a.

- hepatitis E—a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 46, 126–141.
- Döring, T., Zeyen, L., Bartusch, C., Prange, R., 2018. Hepatitis B virus subverts the autophagy elongation complex Atg5-12/16L1 and does not require Atg8/LC3 lipidation for viral maturation. *Journal of virology* 92, e01513-17.
- Drave, S.A., Debing, Y., Walter, S., Todt, D., Engelmann, M., Friesland, M., Wedemeyer, H., Neyts, J., Behrendt, P., Steinmann, E., 2016. Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *Journal of Viral Hepatitis* 23, 512–521. <https://doi.org/10.1111/jvh.12515>
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., Chisari, F.V., 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14046–14051.
- Drinane, M., Wang, X.J., Watt, K., 2019. Sofosbuvir and Ribavirin Eradication of Refractory Hepatitis E in an Immunosuppressed Kidney Transplant Recipient. *Hepatology* 69, 2297–2299. <https://doi.org/10.1002/hep.30428>
- Drobeniuc, J., Meng, J., Reuter, G., Greene-Montfort, T., Khudyakova, N., Dimitrova, Z., Kamili, S., Teo, C.-G., 2010. Serologic Assays Specific to Immunoglobulin M Antibodies against Hepatitis E Virus: Pangenotypic Evaluation of Performances. *Clinical Infectious Diseases* 51, e24–e27. <https://doi.org/10.1086/654801>
- Dye, B.T., Miller, D.J., Ahlquist, P., 2005. In Vivo Self-Interaction of Nodavirus RNA Replicase Protein A Revealed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Virol* 79, 8909–8919. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8909-8919.2005>
- e12804 CMI-17-0209.R1, n.d.
- Egger, D., Pasamontes, L., Bolten, R., Boyko, V., Bienz, K., 1996. Reversible dissociation of the poliovirus replication complex: functions and interactions of its components in viral RNA synthesis. *Journal of Virology* 70, 8675–8683. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.12.8675-8683.1996>
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology* 76, 5974–5984.
- Eijk, J.J.J. van, Dalton, H.R., Ripellino, P., Madden, R.G., Jones, C., Fritz, M., Gobbi, C., Melli, G., Pasi, E., Herrod, J., Lissmann, R.F., Ashraf, H.H., Abdelrahim, M., Masri, O.A.B.A.L., Fraga, M., Benninger, D., Kuntzer, T., Aubert, V., Sahli, R., Moradpour, D., Blasco-Perrin, H., Attarian, S., Gérolami, R., Colson, P., Giordani, M.T., Hartl, J., Pischke, S., Lin, N.X., Mclean, B.N., Bendall, R.P., Panning, M., Peron, J.-M., Kamar, N., Izopet, J., Jacobs, B.C., Alfen, N. van, Engelen, B.G.M. van, 2017. Clinical phenotype and outcome of hepatitis E virus-associated neuralgic amyotrophy. *Neurology* 89, 909–917. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004297>
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005. Thermal Stability of Hepatitis E Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 192, 930–933. <https://doi.org/10.1086/432488>
- Emerson, S.U., Nguyen, H., Graff, J., Stephany, D.A., Brockington, A., Purcell, R.H., 2004. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *Journal of virology* 78, 4838–4846.
- Emerson, S.U., Nguyen, H.T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., Purcell, R.H., 2010. Release of Genotype 1 Hepatitis E Virus from Cultured Hepatoma and Polarized Intestinal Cells Depends on Open Reading Frame 3 Protein and Requires an Intact PXXP Motif. *J Virol* 84, 9059–9069. <https://doi.org/10.1128/JVI.00593-10>

- Emerson, S.U., Nguyen, H.T., Torian, U., Mather, K., Firth, A.E., 2013. An essential RNA element resides in a central region of hepatitis E virus ORF2. *J Gen Virol* 94, 1468–1476. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051870-0>
- Emerson, S.U., Zhang, M., Meng, X.-J., Nguyen, H., Claire, M.S., Govindarajan, S., Huang, Y.K., Purcell, R.H., 2001. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 15270–15275.
- Extra-hepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection - Woolson - 2014 - *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* - Wiley Online Library, n.d.
- Eymieux, S., Rouillé, Y., Terrier, O., Seron, K., Blanchard, E., Rosa-Calatrava, M., Dubuisson, J., Belouzard, S., Roingard, P., 2021a. Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 3565–3576.
- Eymieux, S., Uzbekov, R., Rouillé, Y., Blanchard, E., Hourieux, C., Dubuisson, J., Belouzard, S., Roingard, P., 2021b. Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress. *Cells* 10, 2047. <https://doi.org/10.3390/cells10082047>
- Fahmy, A.M., Labonté, P., 2017. The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wild-type membranous web formation. *Scientific reports* 7, 1–13.
- Farhat, R., Ankavay, M., Lebsir, N., Gouttenoire, J., Jackson, C.L., Wychowski, C., Moradpour, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Cocquerel, L., 2018. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cellular Microbiology* 20, e12804. <https://doi.org/10.1111/cmi.12804>
- Farkash, E.A., Wilson, A.M., Jentzen, J.M., 2020. Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2. *JASN* 31, 1683–1687. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020040432>
- Farmer, T., Xie, S., Naslavsky, N., Stöckli, J., James, D.E., Caplan, S., 2021. Defining the protein and lipid constituents of tubular recycling endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 296. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015992>
- Feld, J.J., Jacobson, I.M., Sulkowski, M.S., Poordad, F., Tatch, F., Pawlotsky, J.-M., 2017. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver International* 37, 5–18.
- Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K.L., Lemon, S.M., 2014. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annual Review of Virology* 1, 539–560. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085359>
- Ferlin, J., Farhat, R., Belouzard, S., Cocquerel, L., Bertin, A., Hober, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2018. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology* 99, 1086–1096. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001099>
- Fernández de Castro, I., Fernández, J.J., Barajas, D., Nagy, P.D., Risco, C., 2017. Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *Journal of Cell Science* 130, 260–268. <https://doi.org/10.1242/jcs.181586>
- Fernández de Castro, I., Tenorio, R., Risco, C., 2021. Virus Factories. *Encyclopedia of Virology* 495–500.
- Ferraris, P., Blanchard, E., Roingard, P. 2010, 2010. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* 91,

- 2230–2237. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022186-0>
- Ferro, E., Bosia, C., Campa, C.C., 2021. RAB11-Mediated Trafficking and Human Cancers: An Updated Review. *Biology* 10, 26. <https://doi.org/10.3390/biology10010026>
- Fontana, J., López-Iglesias, C., Tzeng, W.-P., Frey, T.K., Fernández, J.J., Risco, C., 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* 405, 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.043>
- Fontana, J., Tzeng, W.-P., Calderita, G., Fraile-Ramos, A., Frey, T.K., Risco, C., 2007. Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cellular microbiology* 9, 875–890.
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., Sironi, M., 2018. Origin and dispersal of Hepatitis E virus. *Emerging Microbes & Infections* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0009-6>
- Fousekis, F.S., Mitselos, I.V., Christodoulou, D.K., 2020. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus: An overview. *Clin Mol Hepatol* 26, 16–23. <https://doi.org/10.3350/cmh.2019.0082>
- Fritz, M., Berger, B., Schemmerer, M., Endres, D., Wenzel, J.J., Stich, O., Panning, M., 2018. Pathological Cerebrospinal Fluid Findings in Patients With Neuralgic Amyotrophy and Acute Hepatitis E Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 217, 1897–1901. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy128>
- Frolova, E., Gorchakov, R., Garmashova, N., Atasheva, S., Vergara, L.A., Frolov, I., 2006. Formation of nsP3-Specific Protein Complexes during Sindbis Virus Replication. *J Virol* 80, 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4122-4134.2006>
- Fu, R.M., Decker, C.C., Dao Thi, V.L., 2019. Cell Culture Models for Hepatitis E Virus. *Viruses* 11, 608. <https://doi.org/10.3390/v11070608>
- Gallian, P., Lhomme, S., Piquet, Y., Sauné, K., Abravanel, F., Assal, A., Tiberghien, P., Izopet, J., 2014. Hepatitis E Virus Infections in Blood Donors, France. *Emerg Infect Dis* 20, 1914–1917. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140516>
- Gallian, P., Pouchol, E., Djoudi, R., Lhomme, S., Mouna, L., Gross, S., Bierling, P., Assal, A., Kamar, N., Mallet, V., Roque-Afonso, A.-M., Izopet, J., Tiberghien, P., 2019. Transfusion-Transmitted Hepatitis E Virus Infection in France. *Transfusion Medicine Reviews* 33, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.06.001>
- Geng, Y., Zhao, C., Huang, W., Harrison, T.J., Zhang, H., Geng, K., Wang, Y., 2016. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *Journal of Hepatology* 64, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.034>
- Gisa, A., Suneetha, P.V., Behrendt, P., Pischke, S., Bremer, B., Falk, C.S., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Kraft, A.R.M., 2016. Cross-genotype-specific T-cell responses in acute hepatitis E virus (HEV) infection. *Journal of Viral Hepatitis* 23, 305–315. <https://doi.org/10.1111/jvh.12495>
- Glitscher, M., Hildt, E., 2021. Hepatitis E virus egress and beyond—the manifold roles of the viral ORF3 protein. *Cellular Microbiology* e13379.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2010. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* 84, 773–787.
- Gouilly, J., Chen, Q., Siewiera, J., Cartron, G., Levy, C., Dubois, M., Al-Daccak, R., Izopet, J., Jabrane-Ferrat, N., El Costa, H., 2018. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat Commun* 9, 4748. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07200-2>
- Gouttenoire, J., Pollán, A., Abrami, L., Oechslin, N., Mauron, J., Matter, M., Oppliger, J.,

- Szkolnicka, D., Thi, V.L.D., Goot, F.G. van der, Moradpour, D., 2018. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLOS Pathogens* 14, e1007471. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007471>
- Graff, Hanh Nguyen, Claro Yu, William R. Elkins, Marisa St. Claire, Robert H. Purcell, and Suzanne U. Emerson, 2005b. The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques | *Journal of Virology* [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.79.11.6680-6689.2005> (accessed 9.1.21).
- Graff, J., Nguyen, H., Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., St. Claire, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2005a. In vitro and in vivo mutational analysis of the 3'-terminal regions of hepatitis E virus genomes and replicons. *Journal of virology* 79, 1017–1026.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. *Journal of Virology* 80, 5919–5926. <https://doi.org/10.1128/JVI.00046-06>
- Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>
- Gupta, J., Kaul, S., Srivastava, A., Kaushik, N., Ghosh, S., Sharma, C., Batra, G., Banerjee, M., Shalimar, Nayak, B., Ranjith-Kumar, C.T., Surjit, M., 2020. Expression, Purification and Characterization of the Hepatitis E Virus Like-Particles in the *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology* 11, 141. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00141>
- Guthmann, J.-P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.-Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R.F., Ciglenecki, I., Nicand, E., Guerin, P.J., 2006. A Large Outbreak of Hepatitis E among a Displaced Population in Darfur, Sudan, 2004: The Role of Water Treatment Methods. *Clinical Infectious Diseases* 42, 1685–1691. <https://doi.org/10.1086/504321>
- Haffar, S., Kaur, R.J., Wang, Z., Prokop, L.J., Murad, M.H., Bazerbachi, F., 2018. Acute liver failure caused by hepatitis E virus genotype 3 and 4: a systematic review and pooled analysis. *Liver International* 38, 1965–1973.
- Hafirassou, M.L., Meertens, L., Umaña-Diaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., Kümmerer, B.M., Delaugerre, C., Roingard, P., Vidalain, P.-O., 2017. A global interactome map of the dengue virus NS1 identifies virus restriction and dependency host factors. *Cell reports* 21, 3900–3913.
- Hakim, M.S., Ikram, A., Zhou, J., Wang, W., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2017. Immunity against hepatitis E virus infection: Implications for therapy and vaccine development. *Reviews in Medical Virology* 28, e1964. <https://doi.org/10.1002/rmv.1964>
- HAL PDF Full Text, n.d.
- Haldipur, B., Bhukya, P.L., Arankalle, V., Lole, K., 2018. Positive Regulation of Hepatitis E Virus Replication by MicroRNA-122. *J Virol* 92, e01999-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01999-17>
- Hall, R.A., Khromykh, A.A., Mackenzie, J.M., Scherret, J.H., Khromykh, T.I., Mackenzie, J.S., 1999. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology* 264, 66–75.
- Han, J., Lei, Y., Liu, L., Liu, P., Xia, J., Zhang, Y., Zeng, H., Wang, Lin, Wang, Ling, Zhuang, H., 2014. SPF Rabbits Infected with Rabbit Hepatitis E Virus Isolate Experimentally Showing the Chronicity of Hepatitis. *PLOS ONE* 9, e99861.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099861>

- Harak, C., Lohmann, V., 2015. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology*, 60th Anniversary Issue 479–480, 418–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.029>
- Harak, C., Meyrath, M., Romero-Brey, I., Schenk, C., Gondeau, C., Schult, P., Esser-Nobis, K., Saeed, M., Neddermann, P., Schnitzler, P., 2016. Tuning a cellular lipid kinase activity adapts hepatitis C virus to replication in cell culture. *Nature microbiology* 2, 1–14.
- He, M., Wang, M., Huang, Y., Peng, W., Zheng, Z., Xia, N., Xu, J., Tian, D., 2016. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF- $\kappa$ B Signaling via TRADD and RIP1. *Sci Rep* 6, 27597. <https://doi.org/10.1038/srep27597>
- Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., LaCount, D.J., Kuhn, R.J., Randall, G., 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *PNAS* 107, 17345–17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107>
- Hervouet, K., Ferrié, M., Ankavay, M., Camuzet, C., Alexandre, V., Dembélé, A., Lecoœur, C., Foe, A.T., Bouquet, P., Hot, D., 2021. The fate of Hepatitis E virus capsid protein is regulated by an Arginine-Rich Motif. *bioRxiv*.
- Hewitt, P.E., Ijaz, S., Brailsford, S.R., Brett, R., Dicks, S., Haywood, B., Kennedy, I.T.R., Kitchen, A., Patel, P., Poh, J., Russell, K., Tettmar, K.I., Tossell, J., Ushiro-Lumb, I., Tedder, R.S., 2014. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *The Lancet* 384, 1766–1773. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61034-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61034-5)
- Hirata, Y., Ikeda, K., Sudoh, M., Tokunaga, Y., Suzuki, A., Weng, L., Ohta, M., Tobita, Y., Okano, K., Ozeki, K., Kawasaki, K., Tsukuda, T., Katsume, A., Aoki, Y., Umehara, T., Sekiguchi, S., Toyoda, T., Shimotohno, K., Soga, T., Nishijima, M., Taguchi, R., Kohara, M., 2012. Self-Enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLOS Pathogens* 8, e1002860. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002860>
- Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z., Jameel, S., 2015. Hepatitis E Virus Enters Liver Cells Through a Dynamin-2, Clathrin and Membrane Cholesterol-Dependent Pathway. *Traffic* 16, 398–416. <https://doi.org/10.1111/tra.12260>
- Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., Jameel, S., 2013. Molecular Virology of Hepatitis E Virus. *Semin Liver Dis* 33, 3–14. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338110>
- Hollinshead, M., Johns, H.L., Sayers, C.L., Gonzalez-Lopez, C., Smith, G.L., Elliott, G., 2012. Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *The EMBO journal* 31, 4204–4220.
- Hoofnagle, J.H., Nelson, K.E., Purcell, R.H., 2012. Hepatitis E. *N Engl J Med* 367, 1237–1244. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1204512>
- Hopfer, H., Herzig, M.C., Gosert, R., Menter, T., Hench, J., Tzankov, A., Hirsch, H.H., Miller, S.E., 2020. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues. *Histopathology* 78, 358–370. <https://doi.org/10.1111/his.14264>
- Horvatits, T., Pischke, S., 2018. Extrahepatic manifestations and HEV, the genotype matters. *EBioMedicine* 36, 3–4. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.004>
- Horvatits, T., Schulze zur Wiesch, J., Lütgehetmann, M., Lohse, A.W., Pischke, S., 2019. The Clinical Perspective on Hepatitis E. *Viruses* 11, 617. <https://doi.org/10.3390/v11070617>
- Howe, E.N., Burnette, M.D., Justice, M.E., Schnepf, P.M., Hedrick, V., Clancy, J.W., Guldner,

- I.H., Lamere, A.T., Li, J., Aryal, U.K., 2020. Rab11b-mediated integrin recycling promotes brain metastatic adaptation and outgrowth. *Nature communications* 11, 1–15.
- Hu, W.P., Lu, Y., Precioso, N.A., Chen, H.Y., Howard, T., Anderson, D., Guan, M., 2008. Double-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Hepatitis E Virus-Specific Antibodies in Human or Swine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 1151–1157. <https://doi.org/10.1128/CVI.00186-07>
- Huang, F., Li, Y., Yu, W., Jing, S., Wang, J., Long, F., He, Z., Yang, C., Bi, Y., Cao, W., Liu, C., Hua, X., Pan, Q., 2016. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* 64, 350–359. <https://doi.org/10.1002/hep.28668>
- Huang, F., Zhang, W., Gong, G., Yuan, C., Yan, Y., Yang, S., Cui, L., Zhu, J., Yang, Z., Hua, X., 2009. Experimental infection of Balb/c nude mice with Hepatitis E virus. *BMC Infectious Diseases* 9, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-93>
- Huang, Feiyan, Wenhai, Jianwen Situ<sup>1</sup>, Lijie Fu<sup>3</sup>, Zhanlong He<sup>2</sup>, Hao Dong<sup>3</sup>, Chenchen Yang<sup>1</sup>, Yunlong Li<sup>1</sup>, Fan Yang<sup>1</sup>, Daqiao Wei<sup>1</sup>, 2018. High prevalence of hepatitis E virus in semen of infertile male and causes testis damage [WWW Document]. URL <https://gut.bmj.com/content/67/6/1199.abstract> (accessed 8.31.21).
- Huang, T. Opriessnig, P. G. Halbur, and X. J. Meng, 2007. Initiation at the Third In-Frame AUG Codon of Open Reading Frame 3 of the Hepatitis E Virus Is Essential for Viral Infectivity In Vivo | Journal of Virology [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.02259-06> (accessed 9.1.21).
- Husain, M.M., Srivastava, R., Akondy, R., Aggarwal, R., Jameel, S., Naik, S., 2011. Evidence of Hepatitis E Virus Exposure among Seronegative Healthy Residents of an Endemic Area. *INT* 54, 139–143. <https://doi.org/10.1159/000319840>
- Hutagalung, A.H., Novick, P.J., 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews* 91, 119–149.
- Ichiyama, K., Yamada, K., Tanaka, T., Nagashima, S., Jirintai, Takahashi, M., Okamoto, H., 2009. Determination of the 5'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. *Arch Virol* 154, 1945–1951. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0538-y>
- Im, S.W.K., Zhang, J.Z., Zhuang, H., Che, X.Y., Zhu, W.F., Xu, G.M., Li, K., Xia, N.S., Ng, Mun.H., 2001. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* 19, 3726–3732. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00100-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00100-1)
- Innis, B.L., Lynch, J.A., 2018. Immunization against Hepatitis E. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a032573. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032573>
- Inoue, J., Takahashi, M., Mizuo, H., Suzuki, K., Aikawa, T., Shimosegawa, T., Okamoto, H., 2009. Nucleotide Substitutions of Hepatitis E Virus Genomes Associated with Fulminant Hepatitis and Disease Severity. *Tohoku J. Exp. Med.* 218, 279–284. <https://doi.org/10.1620/tjem.218.279>
- Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeu, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., Guérin, J.-L., 2012. Hepatitis E Virus Strains in Rabbits and Evidence of a Closely Related Strain in Humans, France. *Emerg Infect Dis* 18, 1274–1281. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120057>
- Izopet, J., Labrique, A.B., Basnyat, B., Dalton, H.R., Kmush, B., Heaney, C.D., Nelson, K.E., Ahmed, Z.B., Zaman, K., Mansuy, J.-M., Bendall, R., Sauné, K., Kamar, N., Arjyal, A., Karkey, A., Dongol, S., Prajapati, K.G., Adhikary, D., 2015. Hepatitis E virus

- seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. *Journal of Clinical Virology* 70, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.103>
- Izopet, J., Tremeaux, P., Marion, O., Miguères, M., Capelli, N., Chapuy-Regaud, S., Mansuy, J.-M., Abravanel, F., Kamar, N., Lhomme, S., 2019. Hepatitis E virus infections in Europe. *Journal of Clinical Virology* 120, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.09.004>
- Jebblaoui, A., Haim-Boukobza, S., Marchadier, E., Mokhtari, C., Roque-Afonso, A.-M., 2013. Genotype 4 Hepatitis E Virus in France: An Autochthonous Infection With a More Severe Presentation. *Clinical Infectious Diseases* 57, e122–e126. <https://doi.org/10.1093/cid/cit291>
- Jeong, B.Y., Cho, K.H., Jeong, K.J., Park, Y.-Y., Kim, J.M., Rha, S.Y., Park, C.G., Mills, G.B., Cheong, J.-H., Lee, H.Y., 2018. Rab25 augments cancer cell invasiveness through a  $\beta$ 1 integrin/EGFR/VEGF-A/Snail signaling axis and expression of fascin. *Experimental & molecular medicine* 50, e435–e435.
- Jha, A.K., Kumar, G., Dayal, V.M., Ranjan, A., Suchismita, A., 2021. Neurological manifestations of hepatitis E virus infection: An overview. *World J Gastroenterol* 27, 2090–2104. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i18.2090>
- Jiang, T., Christian, P., Khatry, S.K., Wu, L., West, K.P., Jr, 2005. Micronutrient Deficiencies in Early Pregnancy Are Common, Concurrent, and Vary by Season among Rural Nepali Pregnant Women. *The Journal of Nutrition* 135, 1106–1112. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1106>
- Jirintai, S., Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo, J.B., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Research* 185, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.002>
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bönig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., Ulrich, R.G., 2010. Novel Hepatitis E Virus Genotype in Norway Rats, Germany. *Emerg Infect Dis* 16, 1452–1455. <https://doi.org/10.3201/eid1609.100444>
- Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P., Hofmann, J., 2014. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *Journal of Viral Hepatitis* 21, 447–456. <https://doi.org/10.1111/jvh.12157>
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods* 131, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>
- Ju, X., Xiang, G., Gong, M., Yang, R., Qin, J., Li, Y., Nan, Y., Yang, Y., Zhang, Q.C., Ding, Q., 2020. Identification of functional cis-acting RNA elements in the hepatitis E virus genome required for viral replication. *PLOS Pathogens* 16, e1008488. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008488>
- Kadaré, G., Haenni, A.L., 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* 71, 2583–2590. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2583-2590.1997>
- Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., Izopet, J., 2014. Hepatitis E Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 27, 116–138. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
- Kamar, N., Garrouste, C., Haagsma, E.B., Garrigue, V., Pischke, S., Chauvet, C., Dumortier, J., Cannesson, A., Cassuto-Viguier, E., Thervet, E., Conti, F., Lebray, P., Dalton, H.R., Santella, R., Kanaan, N., Essig, M., Mousson, C., Radenne, S., Roque-Afonso, A.M.,

- Izopet, J., Rostaing, L., 2011. Factors Associated With Chronic Hepatitis in Patients With Hepatitis E Virus Infection Who Have Received Solid Organ Transplants. *Gastroenterology* 140, 1481–1489. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.050>
- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., Dalton, H.R., 2017. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 3, 1–16. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86>
- Kamar, N., Rostaing, L., Abravanel, F., Garrouste, C., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I., Mansuy, J.M., Selves, J., Peron, J.M., Otal, P., Muscari, F., Izopet, J., 2010. Pegylated Interferon- $\alpha$  for Treating Chronic Hepatitis E Virus Infection after Liver Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 50, e30–e33. <https://doi.org/10.1086/650488>
- Kamar, N., Rostaing, L., Izopet, J., 2013. Hepatitis E Virus Infection in Immunosuppressed Patients: Natural History and Therapy. *Semin Liver Dis* 33, 62–70. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338115>
- Kamihira, T., Yano, K., Tamada, Y., Matsumoto, T., Miyazato, M., Nagaoka, S., Ohata, K., Abiru, S., Komori, A., Daikoku, M., Yatsunami, H., Ishibashi, H., 2008. [Case of domestically infected hepatitis E with marked thrombocytopenia]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 105, 841–846.
- 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, e01853-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01853-17>
- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., Zhang, Y.-J., 2009. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *Journal of virology* 83, 6375–6382.
- Kapadia, S.B., Chisari, F.V., 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 2561–2566.
- Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H., Panda, S.K., 2011. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Viral Hepatitis* 19, 436–448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01559.x>
- Karpe, Y.A., Lole, K.S., 2010a. NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *Journal of virology* 84, 3595–3602.
- Karpe, Y.A., Lole, K.S., 2010b. RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *Journal of virology* 84, 9637–9641.
- Karras, Georg Kustatscher, Heeran R Buhecha, Mark D Allen, Céline Pugieux, Fiona Sait, Mark Bycroft, Andreas G Ladurner, Karras, Georg Kustatscher, Heeran R Buhecha, Mark D Allen, Céline Pugieux, Fiona Sait, Mark Bycroft, Andreas G Ladurner, 2005. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *The EMBO Journal* 24, 1911–1920. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600664>
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Ke, P.-Y., Chen, S.S.-L., 2011. Autophagy: a novel guardian of HCV against innate immune response. *Autophagy* 7, 533–535.
- Kenney, S.P., Meng, X.-J., 2018. Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis. *Annual Review of Animal Biosciences* 7, 427–448. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115117>

- Kenney, S.P., Meng, X.-J., 2015a. Identification and fine mapping of nuclear and nucleolar localization signals within the human ribosomal protein S17. *PLoS One* 10, e0124396.
- Kenney, S.P., Meng, X.-J., 2015b. 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. *Journal of Virology* 89, 3793–3803. <https://doi.org/10.1128/JVI.03582-14>
- Kenney, S.P., Wentworth, J.L., Heffron, C.L., Meng, X.-J., 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, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.012>
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., Smith, D.R., 2009. A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *Journal of General Virology* 90, 1093–1103.
- Khan, I., Katikaneni, D.S., Han, Q., Sanchez-Felipe, L., Hanada, K., Ambrose, R.L., Mackenzie, J.M., Konan, K.V., 2014. Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *Journal of virology* 88, 12276–12295.
- Khuroo, Mohammad S., Khuroo, Mehnaaz S., Khuroo, N.S., 2016. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses* 8, 253.
- Khuroo, M.S., 2011. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus research* 161, 3–14.
- Kim, D., Kim, S.-H., Li, G.C., 1999. Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochemical and biophysical research communications* 254, 264–268.
- Klumperman, J., Raposo, G., 2014. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a016857.
- Kmush, B.L., Labrique, A., Li, W., Klein, S.L., Schulze, K., Shaikh, S., Ali, H., Engle, R.E., Wu, L., Purcell, R.H., Mehra, S., Christian, P., West, K., Nelson, K., 2016. The Association of Cytokines and Micronutrients with Hepatitis E Virus Infection during Pregnancy and the Postpartum Period in Rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 94, 203–211. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0238>
- Knoops, Montserrat Bárcena, Ronald W. A. L. Limpensa, Abraham J. Kostera, A. Mieke Mommaasa, and Eric J. Snijder, 2012. Ultrastructural Characterization of Arterivirus Replication Structures: Reshaping the Endoplasmic Reticulum To Accommodate Viral RNA Synthesis [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JVI.06677-11> (accessed 9.1.21).
- Knoops, Marjolein Kikkert, Sjoerd H. E. van den Worm, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Yvonne van der Meer, Abraham J Koster, A. Mieke Mommaas, Eric J Snijder, 2008. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum [WWW Document]. URL <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0060226> (accessed 9.1.21).
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 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. *PNAS* 89, 8259–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8259>
- Kopek, Erik W. Settles, Paul D. Friesen, and Paul Ahlquist, 2007a. Nodavirus-Induced Membrane Rearrangement in Replication Complex Assembly Requires Replicase Protein

- A, RNA Templates, and Polymerase Activity | Journal of Virology [WWW Document]. URL (accessed 9.1.21).
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., Echard, A., 2006. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Current biology* 16, 1719–1725.
- Krawczynski, K., Bradley, D.W., 1989. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis: Identification of Virus-Associated Antigen in Experimentally Infected Cynomolgus Macaques. *The Journal of Infectious Diseases* 159, 1042–1049. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.6.1042>
- Krawczynski, K., Meng, X.-J., Rybczynska, J., 2011. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Research, Hepatitis E Viruses* 161, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.007>
- Kumar, A., Devi, S.G., Kar, P., Agarwal, S., Husain, S.A., Gupta, R.K., Sharma, S., 2014. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine* 65, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.09.022>
- Kumar, H., Kamar, N., Kumar, D., 2019. Hepatitis E: Current Status in India and Other Asian Countries. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 13, 141–159. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.1.15>
- Kumar, M., Hooda, P., Khanna, M., Patel, U., Sehgal, D., 2020. Development of BacMam Induced Hepatitis E Virus Replication Model in Hepatoma Cells to Study the Polyprotein Processing. *Frontiers in Microbiology* 11, 1347. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01347>
- Kupke, P., Werner, J.M., 2021. Hepatitis E Virus Infection—Immune Responses to an Underestimated Global Threat. *Cells* 10, 2281. <https://doi.org/10.3390/cells10092281>
- La Bella, G., Basanisi, M.G., Nobili, G., Terio, V., Suffredini, E., La Salandra, G., 2021. First Report of Hepatitis E Virus in Shellfish in Southeast Italy. *Applied Sciences* 11, 43.
- La Rosa, G., Proroga, Y.T.R., De Medici, D., Capuano, F., Iaconelli, M., Della Libera, S., Suffredini, E., 2018. First detection of hepatitis E virus in shellfish and in seawater from production areas in Southern Italy. *Food and environmental virology* 10, 127–131.
- Lan, X., Yang, B., Li, B.Y., Yin, X.P., Li, X.R., Liu, J.X., 2009. Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis E Virus. *J Clin Microbiol* 47, 2304–2306. <https://doi.org/10.1128/JCM.00498-09>
- Lapa, D., Brega, C., Mammone, A., Zaccarelli, M., Capobianchi, M.R., Garbuglia, A.R., 2016. Diagnostic performance of hepatitis E virus antigen assay in hepatitis E virus acute infection 5.
- Lecaille, F., Kaleta, J., Brömme, D., 2002. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem. Rev.* 102, 4459–4488. <https://doi.org/10.1021/cr0101656>
- LeDesma, R., Nimgaonkar, I., Ploss, A., 2019. Hepatitis E Virus Replication. *Viruses* 11, 719. <https://doi.org/10.3390/v11080719>
- Lee, J.-Y., Cortese, M., Haselmann, U., Tabata, K., Romero-Brey, I., Funaya, C., Schieber, N.L., Qiang, Y., Bartenschlager, M., Kallis, S., Ritter, C., Rohr, K., Schwab, Y., Ruggieri, A., Bartenschlager, R., 2019. Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet- Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Reports* 27, 3602–3617.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.063>
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., Schekman, R., 2004. Bi-directional protein

- transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 87–123.
- Lee, Y.-R., Kuo, S.-H., Lin, C.-Y., Fu, P.-J., Lin, Y.-S., Yeh, T.-M., Liu, H.-S., 2018. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo. *Sci Rep* 8, 489. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18909-3>
- Legrand-Abravanel, F., Thevenet, I., Mansuy, J.-M., Saune, K., Vischi, F., Peron, J.-M., Kamar, N., Rostaing, L., Izopet, J., 2009. Good Performance of Immunoglobulin M Assays in Diagnosing Genotype 3 Hepatitis E Virus Infections. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 772–774. <https://doi.org/10.1128/CVI.00438-08>
- Lei, Q., Li, L., Cai, J., Huang, W., Qin, B., Zhang, S., 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- $\kappa$ B Pathway. *Viral Immunology* 29, 105–111. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0107>
- Lei, Q., Li, L., Zhang, S., Li, T., Zhang, X., Ding, X., Qin, B., 2018. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. *Sci Rep* 8, 8585. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26975-4>
- Lenggenhager, D., Gouttenoire, J., Malehmir, M., Bawohl, M., Honcharova-Biletska, H., Kreutzer, S., Semela, D., Neuweiler, J., Hürlimann, S., Aepli, P., Fraga, M., Sahli, R., Terracciano, L., Rubbia-Brandt, L., Müllhaupt, B., Sempoux, C., Moradpour, D., Weber, A., 2017. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *Journal of Hepatology* 67, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002>
- Lhomme, S., Abravanel, F., Dubois, M., Sandres-Saune, K., Mansuy, J.-M., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J., 2014. Characterization of the Polyproline Region of the Hepatitis E Virus in Immunocompromised Patients. *Journal of Virology* 88, 12017–12025. <https://doi.org/10.1128/JVI.01625-14>
- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Kamar, N., Izopet, J., 2016. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* 8, 212. <https://doi.org/10.3390/v8080212>
- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J., Kamar, N., 2020. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *Journal of Clinical Medicine* 9, 331. <https://doi.org/10.3390/jcm9020331>
- Li, J., Fuchs, S., Zhang, J., Wellford, S., Schuldiner, M., Wang, X., 2016. An unrecognized function for COPII components in recruiting the viral replication protein BMV 1a to the perinuclear ER. *Journal of Cell Science* 129, 3597–3608. <https://doi.org/10.1242/jcs.190082>
- Li, Jiaye Liu, Yang Li, Junhong Su, Zhongren Ma, Wichor M. Bramer, Wanlu Cao, Robert A. de Man, Maikel P. Peppelenbosch, and Qiuwei Pan, 2021. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis - Li - 2020 - Liver International - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/liv.14468> (accessed 8.29.21).
- Li, S., Tang, X., Seetharaman, J., Yang, C., Gu, Y., Zhang, J., Du, H., Shih, J.W.K., Hew, C.-L., Sivaraman, J., Xia, N., 2009. Dimerization of Hepatitis E Virus Capsid Protein E2s Domain Is Essential for Virus–Host Interaction. *PLOS Pathogens* 5, e1000537. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000537>
- Li, T.-C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat. *Emerg Infect Dis* 11, 1958–1960. <https://doi.org/10.3201/eid1112.051041>

- Li, T.-C., Wakita, T., 2019. Small animal models of hepatitis E virus infection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9, a032581.
- Li, T.C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., Takeda, N., Miyamura, T., 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *Journal of Virology* 71, 7207–7213. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7207-7213.1997>
- Li, T.-C., Yang, T., Yoshizaki, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Ishii, K., Kishida, N., Shirakura, M., Asanuma, H., Takeda, N., 2016. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. *Veterinary microbiology* 183, 30–36.
- Li, Y., Huang, X., Zhang, Z., Li, S., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q., 2020. Prophylactic Hepatitis E Vaccines: Antigenic Analysis and Serological Evaluation. *Viruses* 12, 109. <https://doi.org/10.3390/v12010109>
- LI, Yuriko SUZAKI, Yasushi AMI, Hiroshi TSUNEMITSU, Tatsuo MIYAMURA, Naokazu TAKEDA, 2008. Mice are Not Susceptible to Hepatitis E Virus Infection [WWW Document]. URL h (accessed 8.31.21).
- Lin, S., Yang, Y., Nan, Y., Ma, Z., Yang, L., Zhang, Y.-J., 2019. The Capsid Protein of Hepatitis E Virus Inhibits Interferon Induction via Its N-Terminal Arginine-Rich Motif. *Viruses* 11, 1050. <https://doi.org/10.3390/v11111050>
- Lin, S., Zhang, Y.-J., 2021. Advances in Hepatitis E Virus Biology and Pathogenesis. *Viruses* 13, 267. <https://doi.org/10.3390/v13020267>
- Liu, D., Tedbury, P.R., Lan, S., Huber, A.D., Puray-Chavez, M.N., Ji, J., Michailidis, E., Saeed, M., Ndongwe, T.P., Bassit, L.C., 2019. Visualization of positive and negative sense viral RNA for probing the mechanism of direct-acting antivirals against hepatitis C virus. *Viruses* 11, 1039.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S.R., 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *The EMBO journal* 12, 677–682.
- Luke, G.A., Escuin, H., Felipe, P.D., Ryan, M.D., 2009. 2A to the fore—research, technology and applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 26, 223–260.
- Magden, J., Takeda, N., Li, T., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits, A., Kääriäinen, L., 2001. Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *Journal of Virology* 75, 6249–6255. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6249-6255.2001>
- Magliano, D., Marshall, J.A., Bowden, D.S., Vardaxis, N., Meanger, J., Lee, J.-Y., 1998. Rubella Virus Replication Complexes Are Virus-Modified Lysosomes. *Virology* 240, 57–63. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8906>
- Mahilkar, S., Paingankar, M.S., Lole, K.S., 2016. Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase: RNA template specificities, recruitment and synthesis. *Journal of General Virology* 97, 2231–2242. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000528>
- Maila, H.T., Bowyer, S.M., Swanepoel, R., Maila, H., 2003. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995.
- Makharia, G.K., Garg, P.K., Tandon, R.K., 2003. Acute pancreatitis associated with acute hepatitis E infection. *Trop Gastroenterol* 24, 200–201.
- Manns, M.P., Buti, M., Gane, E.D., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., Younossi, Z., 2017. Hepatitis C virus infection. *Nature reviews Disease primers* 3, 1–19.
- Mansuy, J.-M., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Sauné, K., Miédouge, M., Ellis, V., Rech, H., Destruel, F., Kamar, N., Dalton, H.R., 2011. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerging infectious diseases* 17, 2309.

- Mansuy, J.M., Gallian, P., Dimeglio, C., Saune, K., Arnaud, C., Pelletier, B., Morel, P., Legrand, D., Tiberghien, P., Izopet, J., 2016. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* 63, 1145–1154.
- Mao, J., Lin, E., He, L., Yu, J., Tan, P., Zhou, Y., 2019. Autophagy and viral infection. *Autophagy Regulation of Innate Immunity* 55–78.
- Marion, O., Lhomme, S., Bello, A.D., Abravanel, F., Esposito, L., Hébral, A.L., Lavayssière, L., Cointault, O., Ribes, D., Izopet, J., Kamar, N., 2019. Monitoring hepatitis E virus fecal shedding to optimize ribavirin treatment duration in chronically infected transplant patients. *Journal of Hepatology* 70, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.011>
- Martínez, J.L., Arias, C.F., 2020. Role of the guanine nucleotide exchange factor GBF1 in the replication of RNA viruses. *Viruses* 12, 682.
- Mateo, R., Nagamine, C.M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Yuan, J., Kirkegaard, K., 2013. Inhibition of Cellular Autophagy Deranges Dengue Virion Maturation. *J Virol* 87, 1312–1321. <https://doi.org/10.1128/JVI.02177-12>
- Matsushita, M., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F., 2006. Expression, purification and crystallization of the Atg5–Atg16 complex essential for autophagy. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 62, 1021–1023.
- Maxfield, F.R., McGraw, T.E., 2004. Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 121–132.
- Mazalovska, M., Varadinov, N., Koynarski, T., Minkov, I., Teoharov, P., Lomonossoff, G.P., Zahmanova, G., 2017. Detection of Serum Antibodies to Hepatitis E Virus Based on HEV Genotype 3 ORF2 Capsid Protein Expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Ann Lab Med* 37, 313–319. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.4.313>
- McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A., Mullen, R.T., 2005. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *The Plant Cell* 17, 3513–3531.
- Mclean, B.N., Gulliver, J., Dalton, H.R., 2017. Hepatitis E virus and neurological disorders. *Practical Neurology* 17, 282–288. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2016-001588>
- McMahon, H.T., Gallop, J.L., 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Meeusen, E.N.T., Bischof, R.J., Lee, C.-S., 2001. Comparative T-Cell Responses During Pregnancy in Large Animals and Humans. *American Journal of Reproductive Immunology* 46, 169–179. <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2001.460208.x>
- Meng, X.-J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9860–9865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9860>
- Mengardi, C., Ohlmann, T., 2015. [miR-122 continues to surprise us]. *Med Sci (Paris)* 31, 612–615. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153106013>
- Mercogliano, C.P., DeRosier, D.J., 2007. Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 160, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.010>
- Mhaindarkar, V., Sharma, K., Lole, K.S., 2014. Mutagenesis of hepatitis E virus helicase motifs: Effects on enzyme activity. *Virus Research* 179, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.022>
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2006. Endoplasmic reticulum and Golgi complex:

- contributions to, and turnover by, autophagy. *Traffic* 7, 1590–1595.
- Miller, D.J., Ahlquist, P., 2002. Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion. *Journal of virology* 76, 9856–9867.
- Mishra, A., Saigal, S., Gupta, R., Sarin, S.K., 1999. Acute pancreatitis associated with viral hepatitis: a report of six cases with review of literature. *The American Journal of Gastroenterology* 94, 2292–2295. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00374-3)
- Mishra, N., Arankalle, V.A., 2011. Association of polymorphisms in the promoter regions of TNF- $\alpha$  (-308) with susceptibility to hepatitis E virus and TNF- $\alpha$  (-1031) and IFN- $\gamma$  (+874) genes with clinical outcome of hepatitis E infection in India. *Journal of Hepatology* 55, 1227–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.03.023>
- Mishra, N., 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, 47–53. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0833-7>
- Moal, V., Legris, T., Burtey, S., Morange, S., Purgus, R., Dussol, B., Garcia, S., Motte, A., Gérolami, R., Berland, Y., Colson, P., 2013. Infection with hepatitis E virus in kidney transplant recipients in southeastern France. *Journal of Medical Virology* 85, 462–471. <https://doi.org/10.1002/jmv.23469>
- Montpellier, C., Wychowski, C., Sayed, I.M., Meunier, J.-C., Saliou, M., Ankavay, M., Bull, A., Pillez, A., Legrand-Abravanel, F., Helle, F., Brochet, E., Drobecq, H., Farhat, R., Aliouat-Denis, C.-M., Haddad, J.G., Izopet, J., Meuleman, P., Goffard, A., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2018. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* 154, 211–223.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>
- Nagashima, S., Suljid, J., Takahashi, M., Kobayashi, T., Tanggis, Nishizawa, T., Kouki, T., Yashiro, T., Okamoto, H., 2014. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *The Journal of general virology* 95. <https://doi.org/10.1099/vir.0.066910-0>
- Nagashima, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nishizawa, T., Nishiyama, T., Primadharsini, P.P., Okamoto, H., 2017. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol* 91, e00822-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-17>
- Nagashima, S., Takahashi, M., Suljid, J., Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2010. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *The Journal of general virology* 92, 269–78. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025791-0>
- Naik, A., Goel, A., Agrawal, V., Sarangi, A.N., Chhavi, N., Singh, V., Jameel, S., Aggarwal, R., 2015. Changes in gene expression in liver tissue from patients with fulminant hepatitis E. *World J Gastroenterol* 21, 8032–8042. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i26.8032>
- Naik, S., Aggarwal, R., Naik, S.R., Dwivedi, S., Talwar, S., Tyagi, S.K., Duhan, S.D., Coursaget, P., 2002. Evidence for activation of cellular immune responses in patients with acute hepatitis E. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology* 21, 149–152.
- Nair, V.P., Anang, S., Subramani, C., Madhvi, A., Bakshi, K., Srivastava, A., Shalimar, Nayak, B., Ct, R.K., Surjit, M., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLOS Pathogens* 12, e1005521. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005521>

- Nan, Y., Yu, Y., Ma, Z., Khattar, S.K., Fredericksen, B., Zhang, Y.-J., 2014. Hepatitis E Virus Inhibits Type I Interferon Induction by ORF1 Products. *Journal of Virology* 88, 11924–11932. <https://doi.org/10.1128/JVI.01935-14>
- Naqvi, A.A.T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I.K., Singh, A., Atif, S.M., Hariprasad, G., Hasan, G.M., Hassan, Md.I., 2020. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Nasheri, N., Joyce, M., Rouleau, Y., Yang, P., Yao, S., Tyrrell, D.L., Pezacki, J.P., 2013. Modulation of fatty acid synthase enzyme activity and expression during hepatitis C virus replication. *Chemistry & biology* 20, 570–582.
- Navaneethan, U., Mohajer, M.A., Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver International* 28, 1190–1199. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x>
- Nayak, S., Sharma, M., Kataria, A., Tiwari, S.C., Rastogi, A., Mukund, A., 2018. Cholemic Nephrosis from Acute Hepatitis E Virus Infection: A Forgotten Entity? *Indian J Nephrol* 28, 250–251. [https://doi.org/10.4103/ijn.IJN\\_168\\_17](https://doi.org/10.4103/ijn.IJN_168_17)
- Netherton, C.L., Wileman, T., 2011. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Current opinion in virology* 1, 381–387.
- Netzler, N.E., Enosi Tuipulotu, D., Vasudevan, S.G., Mackenzie, J.M., White, P.A., 2019. Antiviral Candidates for Treating Hepatitis E Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00003-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00003-19>
- Neumann, S., van Meer, G., 2008. Sphingolipid management by an orchestra of lipid transfer proteins.
- Neuvonen, M., Ahola, T., 2009. Differential Activities of Cellular and Viral Macro Domain Proteins in Binding of ADP-Ribose Metabolites. *Journal of Molecular Biology* 385, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.045>
- Nguyen, H.T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R.E., Thompson, E., Bonkovsky, H.L., Emerson, S.U., 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. *J Gen Virol* 93, 526–530. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037259-0>
- Niesters, H.G., Strauss, J.H., 1990. Defined mutations in the 5' nontranslated sequence of Sindbis virus RNA. *Journal of Virology* 64, 4162–4168. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4162-4168.1990>
- Nikolic, J., Blondel, D., 2017. Le virus de la rage induit la formation de granules de stress en contact étroit avec les usines virales. *Med Sci (Paris)* 33, 921–923. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173311002>
- Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R.E., Ploss, A., 2018. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 96–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150>
- Nishiyama, T., Kobayashi, T., Jirintai, S., Nagashima, S., Primadharsini, P.P., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2019. Antiviral candidates against the hepatitis E virus (HEV) and their combinations inhibit HEV growth in in vitro. *Antiviral Research* 170, 104570. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104570>
- Offerdahl, D.K., Dorward, D.W., Hansen, B.T., Bloom, M.E., 2017. Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology* 501, 54–62.

- Ogando, N.S., Dalebout, T.J., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Limpens, R.W.A.L., van der Meer, Y., Caly, L., Druce, J., de Vries, J.J.C., Kikkert, M., Bárcena, M., Sidorov, I., Snijder, E.J., 2020. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol* 101, 925–940. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001453>
- Okamoto, H., 2011. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Research, Hepatitis E Viruses* 161, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.015>
- Ollier, L., Tieulie, N., Sanderson, F., Heudier, P., Giordanengo, V., Fuzibet, J.-G., Nicand, E., 2009. Chronic Hepatitis After Hepatitis E Virus Infection in a Patient With Non-Hodgkin Lymphoma Taking Rituximab. *Ann Intern Med* 150, 430–431. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-6-200903170-00026>
- Osterman, A., Stellberger, T., Gebhardt, A., Kurz, M., Friedel, C.C., Uetz, P., Nitschko, H., Baiker, A., Vizoso-Pinto, M.G., 2015. The Hepatitis E virus intraviral interactome. *Sci Rep* 5, 13872. <https://doi.org/10.1038/srep13872>
- Osterman, Maria Guadalupe Vizoso Pinto, Rudolf Haase, Hans Nitschko, Simone Jäger, Michaela Sander, Manfred Motz, Ulrich Mohn & Armin Baiker, 2012. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes | *Virology Journal* | Full Text [WWW Document]. URL <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-28> (accessed 9.1.21).
- Oudshoorn, D., Rijs, K., Limpens, R.W., Groen, K., Koster, A.J., Snijder, E.J., Kikkert, M., Bárcena, M., 2017. Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *MBio* 8, e01658-17.
- Paliwal, D., Panda, S.K., Kapur, N., Varma, S.P.K., Durgapal, H., 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, 1689–1700.
- Palmieri, D., Bouadis, A., Ronchetti, R., Merino, M.J., Steeg, P.S., 2006. Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells. *Breast cancer research and treatment* 100, 127–137.
- Panda, S., Thakral, D., Rehman, S., 2007. Hepatitis E Virus. *Reviews in medical virology* 17, 151–80. <https://doi.org/10.1002/rmv.522>
- Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N., Smith, D.R., 2009. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *Journal of General Virology* 90, 448–456.
- Parvez, M.K., 2017. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “Y-domain”: Effects on RNA replication and virion infectivity. *World J Gastroenterol* 23, 590–602. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i4.590>
- Parvez, M.K., 2015. The hepatitis E virus ORF1 ‘X-domain’ residues form a putative macrodomain protein/“Appr-1”-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication. *Gene* 566, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.026>
- Parvez, M.K., 2013. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. *Virus Research* 178, 553–556. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.020>
- Parvez, M.K., Kazim, S.N., 2021. The Extrahepatic Manifestations of Hepatitis E Virus: A Peek behind the Liver. *jghr* 10, 3407–3410. <https://doi.org/10.6051/>
- Parvez, M.K., Khan, A.A., 2014. Molecular modeling and analysis of hepatitis E virus (HEV) papain-like cysteine protease. *Virus Research* 179, 220–224.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.016>

- Paul, D., Bartenschlager, R., 2015. Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. *Annual Review of Virology* 2, 289–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055007>
- Paul, D., Bartenschlager, R., 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2, 32–48. <https://doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.32>
- Paul, D., Madan, V., Ramirez, O., Bencun, M., Stoeck, I.K., Jirasko, V., Bartenschlager, R., 2018. Glycine zipper motifs in hepatitis C virus nonstructural protein 4B are required for the establishment of viral replication organelles. *Journal of virology* 92, e01890-17.
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., Bartenschlager, R., 2011. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *Journal of virology* 85, 6963–6976.
- Pellerin, M., Hirchaud, E., Blanchard, Y., Pavio, N., Doceul, V., 2021. Characterization of a Cell Culture System of Persistent Hepatitis E Virus Infection in the Human HepaRG Hepatic Cell Line. *Viruses* 13, 406.
- Pérez-Gracia, M.T., Suay-García, B., Mateos-Lindemann, M.L., 2017. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Reviews in Medical Virology* 27, e1929. <https://doi.org/10.1002/rmv.1929>
- Péron, J.M., Dalton, H., Izopet, J., Kamar, N., 2011. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: A role for ribavirin? *Journal of Hepatology* 54, 1323–1324. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.009>
- Perttilä, J., Spuul, P., Ahola, T. 2013, 2013. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *Journal of General Virology* 94, 807–816. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049577-0>
- Pillot, J., Sharma, M.D., Lazizi, Y., Budkowska, A., Dauguet, C., Galimand, M., Sarthou, J.L., 1987. Caractérisation immunologique d'un agent viral implique dans les hépatites non-A, non-B épidémiques et sporadiques. *Annales de l'Institut Pasteur. Virology* 138, 145–158. [https://doi.org/10.1016/S0769-2617\(87\)80087-4](https://doi.org/10.1016/S0769-2617(87)80087-4)
- Pingale, K.D., Kanade, G.D., Karpe, Y.A.Y., 2019. Hepatitis E virus polymerase binds to IFIT1 to protect the viral RNA from IFIT1-mediated translation inhibition. *Journal of General Virology* 100, 471–483. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001229>
- Pischke, S., Hardtke, S., Bode, U., Birkner, S., Chatzikyrkou, C., Kauffmann, W., Bara, C.L., Gottlieb, J., Wenzel, J., Manns, M.P., Wedemeyer, H., 2013. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. *Liver International* 33, 722–726. <https://doi.org/10.1111/liv.12114>
- Pischke, S., Hartl, J., Pas, S.D., Lohse, A.W., Jacobs, B.C., Eijk, A.A.V. der, 2017. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *Journal of Hepatology* 66, 1082–1095. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.016>
- Pischke, S., Wedemeyer, H., 2013. Hepatitis E virus infection: Multiple faces of an underestimated problem. *Journal of Hepatology* 58, 1045–1046. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.013>
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386. <https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Ploss, A., Dubuisson, J., 2012. New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* 61, i25–i35. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302048>

- Pourbaix, A., Ouali, N., Soussan, P., Afonso, A.M.R., Péraldi, M.-N., Rondeau, E., Peltier, J., 2017. Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transplant Infectious Disease* 19, e12624. <https://doi.org/10.1111/tid.12624>
- Prabhu, S.B., Gupta, P., Durgapal, H., Rath, S., Gupta, S.D., Acharya, S.K., Panda, S.K., 2011. Study of cellular immune response against Hepatitis E Virus (HEV). *Journal of Viral Hepatitis* 18, 587–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01338.x>
- Premkumar, M., Rangegowda, D., Vashishtha, C., Bhatia, V., Khumuckham, J.S., Kumar, B., 2015. Acute Viral Hepatitis E Is Associated with the Development of Myocarditis. *Case Reports in Hepatology* 2015, e458056. <https://doi.org/10.1155/2015/458056>
- Prentice, E., Jerome, W.G., Yoshimori, T., Mizushima, N., Denison, M.R., 2004. Coronavirus Replication Complex Formation Utilizes Components of Cellular Autophagy\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 10136–10141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306124200>
- Proudfoot, A., Hyrina, A., Holdorf, M., Frank, A.O., Bussiere, D., 2019. First Crystal Structure of a Nonstructural Hepatitis E Viral Protein Identifies a Putative Novel Zinc-Binding Protein. *Journal of Virology*, k 93, e00170-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00170-19>
- Pudupakam, R.S., Huang, Y.W., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Pierson, F.W., Meng, X.J., 2009. Deletions of the Hypervariable Region (HVR) in Open Reading Frame 1 of Hepatitis E Virus Do Not Abolish Virus Infectivity: Evidence for Attenuation of HVR Deletion Mutants In Vivo. *J Virol* 83, 384–395. <https://doi.org/10.1128/JVI.01854-08>
- Pujhari, S., Kumar, S., Ratho, R., Chawla, Y., Chakraborti, A., 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, 1483–6. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0726-9>
- Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2001. Animal Models of Hepatitis A and E. *ILAR Journal* 42, 161–177. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.161>
- Purcell, R.H., Engle, R.E., Rood, M.P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H.T., Govindarajan, S., St. Claire, M., Emerson, S.U., 2011. Hepatitis E Virus in Rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 2216–2222. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110482>
- Purdy, M.A., Lara, J., Khudyakov, Y.E., 2012. The Hepatitis E Virus Polyproline Region Is Involved in Viral Adaptation. *PLoS ONE* 7, e35974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035974>
- Purdy, M.A., McCaustland, K.A., Krawczynski, K., Tam, A., Beach, M.J., Tassopoulos, N.C., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 1992. Expression of a hepatitis E virus (HEV)-trpE fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Archives of Virology* 123, 335–349. <https://doi.org/10.1007/BF01317268>
- Qi, Y., Zhang, F., Zhang, L., Harrison, T.J., Huang, W., Zhao, C., Kong, W., Jiang, C., Wang, Y., 2015. Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLOS ONE* 10, e0132503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132503>
- Raj, V.S., Smits, S.L., Pas, S.D., Provacia, L.B.V., Moorman-Roest, H., Osterhaus, A.D.M.E., Haagmans, B.L., 2012. Novel Hepatitis E Virus in Ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18, 1369–1370. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111659>
- Ratho, R.K., Thakur, V., Majumdar, M., Singh, M.P., Das, A., Duseja, A., Khurana, J., 2019. Role of formalin fixed paraffin embedded liver tissues in the diagnosis of viral hepatitis E in patients with undiagnosed acute liver failure. *VirusDis.* 30, 302–306. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0503-z>
- Rawla, P., Raj, J.P., Kannemkuzhiyil, A.J., Aluru, J.S., Thandra, K.C., Gajendran, M., 2020. A

- Systematic Review of the Extra-Hepatic Manifestations of Hepatitis E Virus Infection. *Medical Sciences* 8, 9. <https://doi.org/10.3390/medsci8010009>
- Redpath, G.M., Ecker, M., Kapoor-Kaushik, N., Vartoukian, H., Carnell, M., Kempe, D., Biro, M., Ariotti, N., Rossy, J., 2019. Flotillins promote T cell receptor sorting through a fast Rab5–Rab11 endocytic recycling axis. *Nature communications* 10, 1–14.
- Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H., Panda, S.K., 2008. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370, 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.036>
- Reid, C.R., Airo, A.M., Hobman, T.C., 2015. The Virus-Host Interplay: Biogenesis of +RNA Replication Complexes. *Viruses* 7, 4385–4413. <https://doi.org/10.3390/v7082825>
- Rein, D.B., Stevens, G.A., Theaker, J., Wittenborn, J.S., Wiersma, S.T., 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* 55, 988–997. <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
- Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., Rebhan, I., Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2013. The Lipid Kinase Phosphatidylinositol-4 Kinase III Alpha Regulates the Phosphorylation Status of Hepatitis C Virus NS5A. *PLOS Pathogens* 9, e1003359. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003359>
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., Longerich, T., Diehl, S., Ramirez, F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Bühler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2011. Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. *Cell Host & Microbe* 9, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.002>
- Renou, C., Afonso, A.-M.R., Pavio, N., 2014. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerging infectious diseases* 20, 1945.
- ResearchGate Link, n.d.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., Bradley, D.W., 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247, 1335–1339. <https://doi.org/10.1126/science.2107574>
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326–330. <https://doi.org/10.1038/nbt936>
- Ripellino, P., Pasi, E., Melli, G., Staedler, C., Fraga, M., Moradpour, D., Sahli, R., Aubert, V., Martinetti, G., Bihl, F., Bernasconi, E., Beretta-Piccoli, B.T., Cerny, A., Dalton, H.R., Zehnder, C., Mathis, B., Zecca, C., Disanto, G., Kaelin-Lang, A., Gobbi, C., 2020. Neurologic complications of acute hepatitis E virus infection. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 7. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000643>
- Risco, C., Sanmartín-Conesa, E., Tzeng, W.-P., Frey, T.K., Seybold, V., de Groot, R.J., 2012. Specific, Sensitive, High-Resolution Detection of Protein Molecules in Eukaryotic Cells Using Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy. *Structure* 20, 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.001>
- Riveiro-Barciela, M., Mínguez, B., Gironés, R., Rodríguez-Frías, F., Quer, J., Buti, M., 2015. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *Journal of clinical gastroenterology* 49, 165–168.
- Rivero-Juarez, A., Rivalde, M.A., Frias, M., García-Bocanegra, I., Lopez-Lopez, P., Cano-Terriza, D., Camacho, A., Jimenez-Ruiz, S., Gomez-Villamandos, J.C., Rivero, A., 2018. Prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: a possible

- seasonal pattern? *BMC Vet Res* 14, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1377-4>
- Roe, B., Kensicki, E., Mohney, R., Hall, W.W., 2011. Metabolomic Profile of Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes. *PLOS ONE* 6, e23641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023641>
- Rogée, S., Talbot, N., Caperna, T., Bouquet, J., Barnaud, E., Pavio, N., 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *Journal of General Virology* 94, 549–558. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049858-0>
- Romero-Brey, I., Bartenschlager, R., 2014. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* 6, 2826–2857. <https://doi.org/10.3390/v6072826>
- Romero-Brey, I., Berger, C., Kallis, S., Kolovou, A., Paul, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2015. NS5A domain 1 and polyprotein cleavage kinetics are critical for induction of double-membrane vesicles associated with hepatitis C virus replication. *MBio* 6, e00759-15.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2012. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLOS Pathogens* 8, e1003056. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>
- Ronzier, E., Parks, X.X., Qudsi, H., Lopes, C.M., 2019. Statin-specific inhibition of Rab-GTPase regulates cPKC-mediated IKs internalization. *Sci Rep* 9, 17747. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53700-6>
- Ropp, S.L., Tam, A.W., Beames, B., Purdy, M., Frey, T.K., 2000. Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch. Virol.* 145, 1321–1337. <https://doi.org/10.1007/s007050070093>
- Rozanov, M.N., Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the ‘Sindbis-like’ supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73, 2129–2134.
- Sachse, M., de Castro, I.F., Fournier, G., Naffakh, N., Risco, C., 2018. Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy and Immunogold Labeling on Tokuyasu Cryosections to Image Influenza A Virus Ribonucleoprotein Transport and Packaging, in: *Influenza Virus*. Springer, pp. 281–301.
- Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., 2005. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature chemical biology* 1, 333–337.
- Salines, M., Andraud, M., Rose, N., 2017. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary research* 48, 1–15.
- Sanford, B.J., Dryman, B.A., Huang, Y.-W., Feagins, A.R., LeRoith, T., Meng, X.-J., 2011. Prior infection of pigs with a genotype 3 swine hepatitis E virus (HEV) protects against subsequent challenges with homologous and heterologous genotypes 3 and 4 human HEV. *Virus Research* 159, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.010>
- Saraswat, S., Chaudhary, M., Sehgal, D., 2020. Hepatitis E Virus Cysteine Protease Has Papain Like Properties Validated by in silico Modeling and Cell-Free Inhibition Assays. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 478. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00478>
- Sayed, I.M., Foquet, L., Verhoye, L., Abravanel, F., Farhoudi, A., Leroux-Roels, G., Izopet, J., Meuleman, P., 2017a. Transmission of hepatitis E virus infection to human-liver chimeric FRG mice using patient plasma. *Antiviral research* 141, 150–154.

- Sayed, I.M., Verhoye, L., Cocquerel, L., Abravanel, F., Foquet, L., Montpellier, C., Debing, Y., Farhoudi, A., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2017b. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* 66, 920–929.
- Schemmerer, M., Johne, R., Erl, M., Jilg, W., Wenzel, J.J., 2019. Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System. *Viruses* 11, 483. <https://doi.org/10.3390/v11060483>
- Schlegel, A., Giddings, T.H., Ladinsky, M.S., Kirkegaard, K., 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 70, 6576–6588.
- Schofield, D.J., Glamann, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2000. Identification by Phage Display and Characterization of Two Neutralizing Chimpanzee Monoclonal Antibodies to the Hepatitis E Virus Capsid Protein. *Journal of Virology* 74, 5548–5555. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.12.5548-5555.2000>
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J., Ahlquist, P., 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular cell* 9, 505–514.
- Sehgal, D., Thomas, S., Chakraborty, M., Jameel, S., 2006. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virology Journal* 3, 38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-38>
- Shata, M.T., Barrett, A., Shire, N.J., Abdelwahab, S.F., Sobhy, M., Daef, E., El-Kamary, S.S., Hashem, M., Engle, R.E., Purcell, R.H., Emerson, S.U., Strickland, G.T., Sherman, K.E., 2007. Characterization of hepatitis E-specific cell-mediated immune response using IFN- $\gamma$  ELISPOT assay. *Journal of Immunological Methods* 328, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.08.014>
- Shrestha, M.P., Scott, R.M., Joshi, D.M., Mammen, M.P., Thapa, G.B., Thapa, N., Myint, K.S.A., Fourneau, M., Kuschner, R.A., Shrestha, S.K., David, M.P., Seriwatana, J., Vaughn, D.W., Safary, A., Endy, T.P., Innis, B.L., 2007. Safety and Efficacy of a Recombinant Hepatitis E Vaccine. *New England Journal of Medicine* 356, 895–903. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061847>
- Shukla, P., Nguyen, H.T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R.E., Emerson, S.U., 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. *Journal of Virology* 86, 5697–5707. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-12>
- Sinclair, S.M., Jones, J.K., Miller, R.K., Greene, M.F., Kwo, P.Y., Maddrey, W.C., 2017. The Ribavirin Pregnancy Registry: An Interim Analysis of Potential Teratogenicity at the Mid-Point of Enrollment. *Drug Saf* 40, 1205–1218. <https://doi.org/10.1007/s40264-017-0566-6>
- Singh, Manasi Majumdar, Bimal Budhathoki, Kapil Goyal, Yogesh Chawla, Radha K. Ratho, 2013. Assessment of dried blood samples as an alternative less invasive method for detection of Hepatitis E virus marker in an outbreak setting - Singh - 2014 - *Journal of Medical Virology* - Wiley Online Library [WWW Document]. URL [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.23874?casa\\_token=E8-GN-j1Qi8AAA%3A49eQPNeGp2DenuOD6X9AGE1PhomPiDOtY0I11OxD1NaQVS3j7BwpWBZpBFSfq30RUR6RDXLVfBQplRiDMg](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.23874?casa_token=E8-GN-j1Qi8AAA%3A49eQPNeGp2DenuOD6X9AGE1PhomPiDOtY0I11OxD1NaQVS3j7BwpWBZpBFSfq30RUR6RDXLVfBQplRiDMg) (accessed 8.28.21).
- Smith, D.B., Simmonds, P., 2015. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis—a virus or host-specific pathology? *Liver International* 35, 1334–1340. <https://doi.org/10.1111/liv.12629>
- Smith, D.B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.-J., Okamoto, H.,

- Van der Poel, W.H.M., Purdy, M.A., 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 95, 2223–2232. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>
- Soon, C.F., Zhang, S., Suneetha, P.V., Antunes, D.A., Manns, M.P., Raha, S., Schultze-Florey, C., Prinz, I., Wedemeyer, H., Sällberg Chen, M., 2019. Hepatitis E virus (HEV)-specific T cell receptor cross-recognition: implications for immunotherapy. *Frontiers in immunology* 10, 2076.
- Sooryanarain, H., Heffron, C.L., Meng, X.-J., 2020. The U-rich untranslated region of the hepatitis E virus induces differential type I and type III interferon responses in a host cell-dependent manner. *Mbio* 11, e03103-19.
- Springer Full Text PDF, n.d.
- Stevens Olivier, Kristl G. Claeys, MD, Koen Poesen, 2017. Diagnostic Challenges and Clinical Characteristics of Hepatitis E Virus–Associated Guillain-Barré Syndrome | Infectious Diseases | JAMA Neurology | JAMA Network [WWW Document]. URL <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/article-abstract/2575851> (accessed 8.31.21).
- Sugawara, N., Yawata, A., Takahashi, K., Abe, N., & Arai, M., 2009. The third case of fulminant hepatitis associated with ‘Kitami/Abashiri strain’ of hepatitis E virus genotype 4.
- Suhy, D.A., Giddings Jr, T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *Journal of virology* 74, 8953–8965.
- Suneetha, P.V., Pischke, S., Schlaphoff, V., Grabowski, J., Fytli, P., Gronert, A., Bremer, B., Markova, A., Jaroszewicz, J., Bara, C., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H., 2012. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 55, 695–708. <https://doi.org/10.1002/hep.24738>
- Suppiah, S., Zhou, Y., Frey, T.K., 2011. Lack of Processing of the Expressed ORF1 Gene Product of Hepatitis E Virus. *Virology Journal* 8, 245. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-245>
- 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, 3339–3345.
- Surjit, M., Jameel, S., Lal, S.K., 2004. The ORF2 Protein of Hepatitis E Virus Binds the 5' Region of Viral RNA. *J Virol* 78, 320–328. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.1.320-328.2004>
- Surjit, M., Varshney, B., Lal, S.K., 2012. The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF- $\kappa$ B activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in human hepatoma cells. *BMC Biochemistry* 13, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-13-7>
- Syedbasha, M., Egli, A., 2017. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* 8, 119. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00119>
- Szkolnicka, D., Pollán, A., Da Silva, N., Oechslin, N., Gouttenoire, J., Moradpour, D., 2019. Recombinant hepatitis E viruses harboring tags in the ORF1 protein. *Journal of virology* 93, e00459-19.
- Tabatabai, J., Wenzel, J.J., Soboletzki, M., Flux, C., Navid, M.H., Schnitzler, P., 2014. First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *Journal of Clinical Virology* 61, 170–172.
- Taherkhani, R., Makvandi, M., Farshadpour, F., 2014. Development of Enzyme-Linked

- Immunosorbent Assays Using 2 Truncated ORF2 Proteins for Detection of IgG Antibodies Against Hepatitis E Virus. *Ann Lab Med* 34, 118–126. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.2.118>
- Tai, A.W., Salloum, S., 2011. The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement. *PLoS One* 6, e26300.
- Takahashi, K., Okamoto, H., Abe, N., Kawakami, M., Matsuda, H., Mochida, S., Sakugawa, H., Sugino, Y., Watanabe, S., Yamamoto, K., Miyakawa, Y., Mishiro, S., 2009. Virulent Strain of Hepatitis E Virus Genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis* 15, 704–709. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081100>
- Takahashi, M., Tanaka, T., Takahashi, H., Hoshino, Y., Nagashima, S., Jirintai, Mizuo, H., Yazaki, Y., Takagi, T., Azuma, M., Kusano, E., Isoda, N., Sugano, K., Okamoto, H., 2010. Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J Clin Microbiol* 48, 1112–1125. <https://doi.org/10.1128/JCM.02002-09>
- Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y., Nakayama, K., 2012. Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *Journal of cell science* 125, 4049–4057.
- Tang, Z.-M., Tang, M., Zhao, M., Wen, G.-P., Yang, F., Cai, W., Wang, S.-L., Zheng, Z.-Z., Xia, N.-S., 2015. A novel linear neutralizing epitope of hepatitis E virus. *Vaccine* 33, 3504–3511. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.065>
- Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., Hanada, K., 2009. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 5, 937–945.
- Teshale, E.H., Grytdal, S.P., Howard, C., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hill, V.R., Okware, S., Hu, D.J., Holmberg, S.D., 2010. Evidence of Person-to-Person Transmission of Hepatitis E Virus during a Large Outbreak in Northern Uganda. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1006–1010. <https://doi.org/10.1086/651077>
- Tian, Y., Huang, W., Yang, J., Wen, Z., Geng, Y., Zhao, C., Zhang, H., Wang, Y., 2017. Systematic identification of hepatitis E virus ORF2 interactome reveals that TMEM134 engages in ORF2-mediated NF- $\kappa$ B pathway. *Virus Research* 228, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.027>
- Tibble, J.A., Ireland, A., Duncan, J.R., 1997. Acute auto immune haemolytic anaemia secondary to hepatitis A infection. *Clinical & Laboratory Haematology* 19, 73–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.1997.00206.x>
- Todt, D., Gisa, A., Radonic, A., Nitsche, A., Behrendt, P., Suneetha, P.V., Pischke, S., Bremer, B., Brown, R.J.P., Manns, M.P., Cornberg, M., Bock, C.T., Steinmann, E., Wedemeyer, H., 2016. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut* 65, 1733–1743. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311000>
- Todt, D., Meister, T.L., Steinmann, E., 2018a. Hepatitis E virus treatment and ribavirin therapy: viral mechanisms of nonresponse. *Current opinion in virology* 32, 80–87.
- Todt, D., Moeller, N., Praditya, D., Kinast, V., Friesland, M., Engelmann, M., Verhoye, L., Sayed, I.M., Behrendt, P., Dao Thi, V.L., Meuleman, P., Steinmann, E., 2018b. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 157, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.010>
- Tokuyasu, K.T., 1973. A TECHNIQUE FOR ULTRACRYOTOMY OF CELL SUSPENSIONS AND TISSUES. *Journal of Cell Biology* 57, 551–565.

<https://doi.org/10.1083/jcb.57.2.551>

- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Yarbough, P.O., Legters, L.J., Moskal, T., Purcell, R.H., 1994. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *Journal of Medical Virology* 43, 135–142. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890430207>
- Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S., Lal, S.K., 2002. The Phosphorylated Form of the ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Interacts with Its Non-glycosylated Form of the Major Capsid Protein, ORF2 \*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22759–22767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200185200>
- van de Garde, M.D.B., Pas, S.D., van der Net, G., de Man, R.A., Osterhaus, A.D.M.E., Haagmans, B.L., Boonstra, A., Vanwolleghem, T., 2016. Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. *J Virol* 90, 4394–4401. <https://doi.org/10.1128/JVI.00114-16>
- Van der Poel, W.H., 2014. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current opinion in virology* 4, 91–96.
- van der Valk M, Zaaijer HL, Kater AP, Schinkel J., 2017. Sofosbuvir shows antiviral activity in a patient with chronic hepatitis E virus infectio.
- van Rijnsoever, C., Oorschot, V., Klumperman, J., 2008. Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat Methods* 5, 973–980. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1263>
- Varma, S.P.K., Kumar, A., Kapur, N., Durgapal, H., Acharya, S.K., Panda, S.K., 2011. Hepatitis E virus replication involves alternating negative-and positive-sense RNA synthesis. *Journal of general virology* 92, 572–581.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* 1, 945–951. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y., 2012. RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics* 14, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R., Tai, A.W., 2014. Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 146, 1373–1385.
- Wang, J., Du, J., Jin, Q., 2014a. Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PloS one* 9, e99768.
- Wang, L., Ou, J.-H.J., 2018. Regulation of autophagy by hepatitis C virus for its replication. *DNA and cell biology* 37, 287–290.
- Wang, Y., Wang, S., Wu, J., Jiang, Y., Zhang, H., Li, S., Liu, H., Yang, C., Tang, H., Guo, N., Peppelenbosch, M.P., Wei, L., Pan, Q., Zhao, J., 2018a. Hepatitis E virus infection in acute non-traumatic neuropathy: A large prospective case-control study in China. *EBioMedicine* 36, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.053>
- Wang, Y., Zhou, X., Debing, Y., Chen, K., Van Der Laan, L.J.W., Neyts, J., Janssen, H.L.A., Metselaar, H.J., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2014a. Calcineurin Inhibitors Stimulate and Mycophenolic Acid Inhibits Replication of Hepatitis E Virus. *Gastroenterology* 146, 1775–1783. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.036>

- Wang, Yuebang Yin, Lei Xu, Junhong Su, F. Huang, Yijin Wang, P. Boor, Kan Chen, Wenhui Wang, W. Cao, Xinying Zhou, Pengyu Liu, L. V. D. van der Laan, J. Kwekkeboom, M. Peppelenbosch, Q. Pan, 2017. Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections | Science Signaling [WWW Document]. URL <https://stke.sciencemag.org/content/10/476/eaah4248.short> (accessed 8.29.21).
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2009. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe* 5, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Wenzel, J.J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., Jilg, W., 2013. Test Performance Characteristics of Anti-HEV IgG Assays Strongly Influence Hepatitis E Seroprevalence Estimates. *The Journal of Infectious Diseases* 207, 497–500. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis688>
- Williams, T.P.E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001. Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *J Clin Microbiol* 39, 3040–3046. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3040-3046.2001>
- Wolff, G., Melia, C.E., Snijder, E.J., Bárcena, M., 2020. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends in microbiology* 28, 1022–1033.
- Wong, H.H., Sanyal, S., 2020. Manipulation of autophagy by (+) RNA viruses. *Semin Cell Dev Biol* 101, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.013>
- Woolson, A. Forbes, L. Vine, L. Beynon, L. McElhinney, V. Panayi, J. G. Hunter, R. G. Madden, T. Glasgow, A. Kotecha, H. C. Dalton, L. Mihailescu, U. Warshow, H. S. Hussaini, J. Palmer, B. N. Mclean, B. Haywood, R. P. Bendall, H. R. Dalton, 2014. Extra-hepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection - Woolson - 2014 - *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apt.12986> (accessed 8.31.21).
- Wu, C.-H., Ho, C.-M., Tsai, J.-H., Sun, H.-Y., Hu, R.-H., Lee, C.-M., 2015. First Case Genotype 4 Hepatitis E Infection After a Liver Transplant. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 15. <https://doi.org/10.6002/ect.2015.0031>
- Wu, N., Zhang, P., Liu, W., Wang, X., 2018. Sogatella furcifera hepe-like virus: First member of a novel Hepeviridae clade identified in an insect. *Virus Research* 250, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.018>
- Wu, Q., An, J., She, R., Shi, R., Hao, W., Soomro, M., Yuan, X., Yang, J., Wang, J., 2017. Detection of Genotype 4 Swine Hepatitis E Virus in Systemic Tissues in Cross-Species Infected Rabbits. *PLOS ONE* 12, e0171277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171277>
- Wu, X., Chen, P., Lin, H., Hao, X., Liang, Z., 2016. Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12, 2603–2610. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1184806>
- Xu, L., Wang, W., Li, Y., Zhou, X., Yin, Y., Wang, Y., Man, R.A. de, Laan, L.J.W. van der, Huang, F., Kamar, N., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2017. RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology* 65, 1823–1839. <https://doi.org/10.1002/hep.29105>
- Xu, L., Zhou, X., Wang, W., Wang, Y., Yin, Y., Laan, L.J.W. van der, Sprengers, D., Metselaar,

- H.J., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2016. IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *The FASEB Journal* 30, 3352–3367. <https://doi.org/10.1096/fj.201600356R>
- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *PNAS* 106, 12986–12991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903699106>
- Yang, Y., Lin, S., Nan, Y., Ma, Z., Yang, L., Zhang, Y., 2016. A Linear Surface Epitope in a Proline-Rich Region of ORF3 Product of Genotype 1 Hepatitis E Virus. *Viruses* 8, 227. <https://doi.org/10.3390/v8080227>
- Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z., n.d. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *Journal of Virology* 90, 4232–4242. <https://doi.org/10.1128/JVI.02804-15>
- Yin, X., Feng, Z., 2019. Hepatitis E Virus Entry. *Viruses* 11, 883. <https://doi.org/10.3390/v11100883>
- Yin, X., Li, X., Ambardekar, C., Hu, Z., Lhomme, S., Feng, Z., 2017. Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLOS Pathogens* 13, e1006417. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006417>
- Yin, X., Ying, D., Lhomme, S., Tang, Z., Walker, C.M., Xia, N., Zheng, Z., Feng, Z., 2018. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *PNAS* 115, 4773–4778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115>
- Yu, X., Chen, Z., Wang, S., Pan, H., Wang, Z., Zhang, Q., Shen, L., Zheng, X., Yan, C., Lu, M., Chen, B., Zheng, Y., Zhang, J., Lv, H., Huang, S., 2019. Safety and immunogenicity of hepatitis E vaccine in elderly people older than 65 years. *Vaccine* 37, 4581–4586. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.006>
- Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K., Jameel, S., 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of Virology* 71, 9045–9053. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9045-9053.1997>
- Zhang, J., Lan, Y., Li, M.Y., Lamers, M.M., Fusade-Boyer, M., Klemm, E., Thiele, C., Ashour, J., Sanyal, S., 2018. Flaviviruses exploit the lipid droplet protein AUP1 to trigger lipophagy and drive virus production. *Cell host & microbe* 23, 819–831.
- Zhang, J., Su, G., Wu, Q., Liu, J., Tian, Y., Liu, X., Zhou, J., Gao, J., Chen, W., Chen, D., Zhang, Z., 2021. Rab11-mediated recycling endosome role in nervous system development and neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience* 131, 1012–1018. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1761354>
- Zhang, M., Emerson, S.U., Nguyen, H., Engle, R.E., Govindarajan, S., Gerin, J.L., Purcell, R.H., 2001. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine* 20, 853–857. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00399-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00399-1)
- Zhang, Shao-Wei Li, Ting Wu, Qinjian Zhao, Mun-Hon Ng, Ning-Shao Xia, 2012. Hepatitis E virus: neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity -Reviews in Medical Virology -
- Zhang, Z., He, G., Filipowicz, N.A., Randall, G., Belov, G.A., Kopek, B.G., Wang, X., 2019. Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00286>
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T.J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A., 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China.

- Journal of medical virology 81, 1371–1379.
- Zhao, Xiao-Jing Li, Zi-Min Tang, Ke Zhang, Ning-Shao Xia, Zi-Zheng Zheng, 2015. A Comprehensive Study of Neutralizing Antigenic Sites on the Hepatitis E Virus (HEV) Capsid by Constructing, Clustering, and Characterizing a Tool Box\* - Journal of Biological Chemistry [WWW Document]. URL [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)42245-8/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)42245-8/fulltext) (accessed 9.1.21).
- Zhou, X., Wang, Y., Metselaar, H.J., Janssen, H.L.A., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2014. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: Revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *Journal of Hepatology* 61, 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.026>
- Zhou, X., Xu, L., Wang, W., Watashi, K., Wang, Y., Sprengers, D., Ruiters, P.E. de, Laan, L.J.W. van der, Metselaar, H.J., Kamar, N., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2016. Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 23, 294–304. <https://doi.org/10.1111/jvh.12491>
- Zhu, F.-C., Huang, S.-J., Wu, T., Zhang, X.-F., Wang, Z.-Z., Ai, X., Yan, Q., Yang, C.-L., Cai, J.-P., Jiang, H.-M., Wang, Y.-J., Ng, M.-H., Zhang, J., Xia, N.-S., 2014. Epidemiology of Zoonotic Hepatitis E: A Community-Based Surveillance Study in a Rural Population in China. *PLOS ONE* 9, e87154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087154>

## **Résumé :**

Le virus de l'hépatite E (HEV) représente la première cause d'hépatite aiguë dans le monde. Certains aspects fondamentaux de son cycle infectieux ont été dévoilés ces dernières années grâce au développement d'outils d'étude. Notamment, au laboratoire, nous avons mis en place un système efficace de culture cellulaire du HEV. La première partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser les usines virales du HEV en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid du HEV, générés par notre laboratoire. Nous avons visualisé pour la première fois des structures induites spécifiquement par le HEV. Une étude approfondie de la nature de ces structures a été réalisée par des approches de microscopie confocale et électronique. Afin de mieux comprendre l'implication d'une protéine cellulaire au cours de cycle viral du HEV, nous avons également réalisé des études fonctionnelles en utilisant l'interférence par l'ARN. Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons caractérisé la réplicase ORF1 du HEV par différentes approches, et cherché à définir si celle-ci subit une maturation dans la cellule hôte. Pour cela, trois systèmes d'expression différents ont été utilisés : le système infectieux, le système réplicon (unité autonome de réplication) et le système hétérologue. De même, la localisation subcellulaire de l'ORF1 a été caractérisée en détails en utilisant différentes approches expérimentales. Au cours de ce projet, une nouvelle technologie appelée RNAscope permettant d'étudier la distribution des ARN génomiques et sous-génomiques du HEV a été mise en place. En utilisant des approches de microscopie électronique, nous avons également cherché à définir si, comme d'autres virus à ARN, le HEV induit des remaniements membranaires dans la cellule infectée. En conclusion, mes travaux de thèse ont apporté de nombreuses nouvelles connaissances sur la réplicase virale et les interactions du HEV avec la cellule hôte.

**Mots clés :** virus de l'hépatite E, protéines ORF1 et ORF2, usines virales, compartiment endosomal de recyclage

## **Abstract :**

Hepatitis E virus (HEV) is the leading cause of acute hepatitis in the world. Some fundamental aspects of its lifecycle have been revealed in recent years thanks to the development of study tools. In particular, in the laboratory, we have set up an efficient cell culture system for HEV. The first part of my thesis work consisted in characterizing the HEV viral factories using monoclonal antibodies directed against the HEV capsid protein, generated by our laboratory. We visualized for the first time some structures specifically induced by HEV. An in-depth study of the nature of these structures was performed by confocal and electron microscopy approaches. In order to better understand the involvement of a cellular protein during the HEV lifecycle, we also performed functional studies using RNA interference. In the second part of my thesis, we characterized the HEV ORF1 replicase by different approaches, and tried to define if it undergoes maturation in the host cell. For this purpose, three different expression systems were used: the infectious system, the replicon system (autonomous replication unit) and the heterologous system. Also, the subcellular localization of ORF1 was characterized in detail using different experimental approaches. During this project, a new technology called RNAscope to study the distribution of HEV genomic and subgenomic RNAs has been developed. Using electron microscopy approaches, we also sought to define whether, like other RNA viruses, HEV induces membrane remodeling in the infected cell. In conclusion, my thesis work has brought many new insights into viral replicase and HEV interactions with the host cell.

**Key words :** Hepatitis E virus, ORF1 and ORF2 proteins, viral factories, endosomal recycling compartment