

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

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

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

Sous la supervision de
Dr Laurence COCQUEREL (HDR)

Rédigée et soutenue publiquement par

Maliki Ankavay

Le 10 juillet 2019

Devant le jury composé de :

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

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Dédicace

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

Remerciements

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite E (HEV) est un problème majeur de santé publique qui touche plus de 20 millions de personnes et tue environ 70 000 chaque année à travers le monde. Le HEV est la cause majeure d'hépatite virale aiguë dans le monde. En France, la séroprévalence du HEV est de 22,4% dans la population générale. Ce virus se transmet par voie féco-orale ou par consommation de viande contaminée mal cuite. Très récemment, nous avons décrit un système de culture cellulaire permettant d'amplifier efficacement le HEV. Ce système représente un outil unique pour caractériser les différentes étapes du cycle infectieux du HEV qui sont très mal connues à ce jour. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à la protéine de capsid ORF2 qui est l'unité structurale des particules virales et est donc un acteur central du cycle infectieux du HEV. La protéine ORF2 est une protéine de 660 acides aminés (aa) qui possède un peptide signal (PS) et trois sites potentiels de N-glycosylation (N1, N2 et N3). J'ai donc étudié le rôle de la N-glycosylation de cette protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV. Pour atteindre cet objectif, la souche infectieuse HEV-p6 génotype 3 a été utilisée pour infecter les cellules de la lignée hépatocytaire PLC3, sous clone de la lignée PLC/PRF/5. Les résultats obtenus ont montré que la protéine ORF2 est N-glycosylée uniquement au niveau des sites N1 et N3 ; le site N2 est défavorable à la N-glycosylation. Nos résultats ont montré que la N-glycosylation de la protéine ORF2 n'est pas importante pour sa stabilité, son oligomérisation, sa reconnaissance par des anticorps, l'assemblage et l'infectiosité des particules virales. Nous avons aussi montré que la protéine ORF2 est importée dans le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV de manière indépendante de la N-glycosylation. Nous avons identifié pour la première fois un signal de localisation nucléaire (NLS) fonctionnel en position N-terminale de la protéine ORF2 lui permettant d'interagir probablement avec l'importine alpha1. De manière surprenante, ce NLS régule non seulement l'import nucléaire de cette protéine virale, mais aussi sa translocation réticulaire. Nous avons également démontré que la protéine ORF2 est exportée du noyau des cellules hôtes en interagissant avec l'exportine1 et possède 3 signaux d'export nucléaire (NES) en position C-terminale. Ces résultats améliorent la connaissance du trafic intracellulaire de la protéine ORF2 et pourraient orienter les stratégies antivirales dirigées contre le HEV.

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

Abstract

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

Liste des abréviations

A

ADNc: Acide Désoxyribonucléique
complémentaire

ADP: Adénosine Triphosphate

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messagers

C

CMR1: Chromosomal Maintenance Region 1

CMV: Cytomégalovirus

D

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's
medium

Dol-PP: Dolichol-Pyro-phosphate

E

EBV: Epstein-Barr Virus

eEF1 α 1: Eukaryotic Elongation Factor 1
Isoform-1

eHEV: Virus de l'hépatite E quasi-enveloppé

ERAD: Endoplasmic Reticulum-Associated
protein Degradation

ESCRT: Endosomal Sorting Complexes
Required for Transport

Expo1: Exportine1

F

FDA: Food and Drug Administration

G

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

Gt: Génotype,

GTP: Guanosine Triphosphate

H

HA: Hémagglutinine

HAV: Virus de l'hépatite A

HBc: Protéine de capsid du HBV

HCV: Virus de l'Hépatite C

Hel: Hélicase

HEV: Virus de l'Hépatite E

HNANB: Hépatites non A non B

HVR: Hypervariable

HVR1: Région Hypervariable 1

I

IFN: Interféron

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

IRF3: Interferon Regulatory Factor 3

ISGF3: Interferon-Stimulated Gene Factor 3

ISGs: IFN-Stimulated Genes

ISRE: IFN-Stimulated Response Element

J

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

L

LMB: Leptomycine B

M

M: Middle

MDA5: Melanoma Differentiation
Associated gene 5

Met: Methyl-Transférerase

MV: Measles Virus

M199: Medium 199

N

NA: Neuraminidase

NCR: Région Non Traduite

NES: Signal d'export nucléaire

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NLS: Signal de localisation nucléaire

NP: Nucléoporine

NPC: Nuclear Pore Complex

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame

OST: Oligosaccharyl transférase

P

P: Protruding

PCP: Papaïne Cystéine Protéase

PRR: Pattern-Recognition Receptor

PS: Peptide Signal

R

RdRp: ARN polymérase ARN dépendante

RE: Réticulum Endoplasmique

RT-qPCR: Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction

RIG-I: Retinoic Acid-Inducible Gene-I

RLR: RIG-I-Like Receptors

RNPv: ARN ribonucléoprotéine viral

RV: Rabies Virus

ra: Rabbit

S

S: Shell

SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome

SGB: Syndrome de Guillain-Barré

SINE: Selective Inhibitors of Nuclear Export,

SIRP- α : Signal Regulator Protein alpha

SPP: Signal Peptide Peptidase

SPPL: SPP-like

SeqR: Séquence répétée d'arginines

T

TBK-I: TANK-Binding Kinase-I

TLR: Toll-like receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

tsg101: Tumor Susceptibility Gene 101

V

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

W

WNV: West Nile Virus

Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV humain.	19
Figure 2: Transmission des différents génotypes de HEV et leurs hôtes naturels.....	22
Figure 3: Arbre phylogénétique des différentes espèces et génotypes du HEV.....	35
Figure 4: Structure du génome et des protéines de HEV	36
Figure 5: Les différents domaines de la protéine ORF1	37
Figure 6: Structure schématique de la protéine ORF2	39
Figure 7: Structure cristallographique de la protéine ORF2.....	40
Figure 8: Particules virales du HEV.....	42
Figure 9: Cycle infectieux du HEV.....	45
Figure 10: La voie interféron au cours d'une infection par le HEV.	53
Figure 11: Réponse humorale au cours d'une hépatite E aiguë.....	55
Figure 12: Différents types de N-glycanes	57
Figure 13: Mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes	59
Figure 14: Transport nucléo-cytoplasmique des protéines.....	65
Figure 15: Cycle cellulaire du virus de l'hépatite B (HBV).....	67
Figure 16: Séquence de la protéine ORF2 et présentation des mutants réalisés.....	94
Figure 17: Localisation subcellulaire de la protéine ORF2.....	99
Figure 18: Distribution subcellulaire des protéines ORF2 wt et mutées.....	101
Figure 19: Caractérisation des mutants par Western Blot et titres infectieux.	103
Figure 20: Colocalisation de la protéine ORF2 avec l'importine $\alpha 1$	105
Figure 21: Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.	106
Figure 22: Inhibition de l'export nucléaire exportine1 dépendant.....	107
Figure 23: Colocalisation des protéines ORF2 et Expo1.	108
Figure 24: Signaux potentiels d'export nucléaire de la protéine ORF2.....	109
Figure 25: Identification des signaux d'export nucléaire (NES) sur la protéine ORF2.....	110
Figure 26: Intensité de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 sauvage et des mutants NES9, NES10 et NES12.....	111
Figure 27: Différentes voies de production de la protéine ORF2.....	119
Figure 28: Voies non productive et productive de la protéine ORF2 et la voie nucléaire	122
Figure 29: Double topologie de la protéine ORF2.....	125
Figure 30: Modèle du cycle cellulaire de la protéine ORF2 du HEV.....	130

Liste des annexes: Articles scientifiques

Annexe 1: The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself.....	131
Annexe 2: Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein.....	140
Annexe 3: Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication.....	163

Table des matières

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

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

III. RESULTATS	76
A) Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du virus de l'hépatite E (HEV)	76
B) Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV	92
1. Rationnel:	92
2. Matériel et méthodes	95
2.1. Culture cellulaire	95
2.2. Plasmide, mutagénèse et transfection	95
2.3. Anticorps	96
2.4. Immunofluorescence.....	96
2.5. Quantification de l'intensité de la fluorescence nucléaire de la protéine ORF2.....	96
2.6. Extractions cytoplasmiques et nucléaires.....	97
2.7. Western blot (WB).....	97
2.8. Titres infectieux.....	97
2.9. Traitement Leptomycine B (LMB)	98
2.10. Analyses statistiques	98
3. Résultats obtenus.....	98
3.1 La protéine ORF2 est importée du cytoplasme vers le noyau des cellules hôtes au cours du cycle infectieux du HEV.....	98
3.1.1 La protéine ORF2 est transloquée dans le noyau des cellules infectées par le HEV	98
3.1.2. La protéine de capsid ORF2 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) potentiel.....	99
3.1.3. Caractérisation de la fonctionnalité de la séquence riche en arginines (SeqR), NLS potentiel de la protéine ORF2	99
3.1.4. La protéine ORF2 colocalise avec l'Importine α1	104
3.1.5. Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.....	105
3.2. La protéine ORF2 est exportée du noyau vers le cytoplasme des cellules hôtes.....	106
3.2.1. L'export nucléaire de la protéine ORF2 est dépendante de l'Exportine1	106
3.2.2. La protéine ORF2 colocalise partiellement ou transitoirement avec l'Exportine1	107
3.2.3. La protéine ORF2 possède 3 signaux d'export nucléaire (NES) fonctionnels	108
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	114
A : Etude du rôle de la N-glycosylation de la protéine de capsid ORF2 dans le cycle infectieux du HEV.....	114
B : Etude des mécanismes d'adressage et de transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 du HEV	123

ANNEXES	131
BIBLIOGRAPHIE.....	178

I.INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

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

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

1. HISTORIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE E

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

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

2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

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

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

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

2.1. Répartition géographique des différents génotypes du HEV

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

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

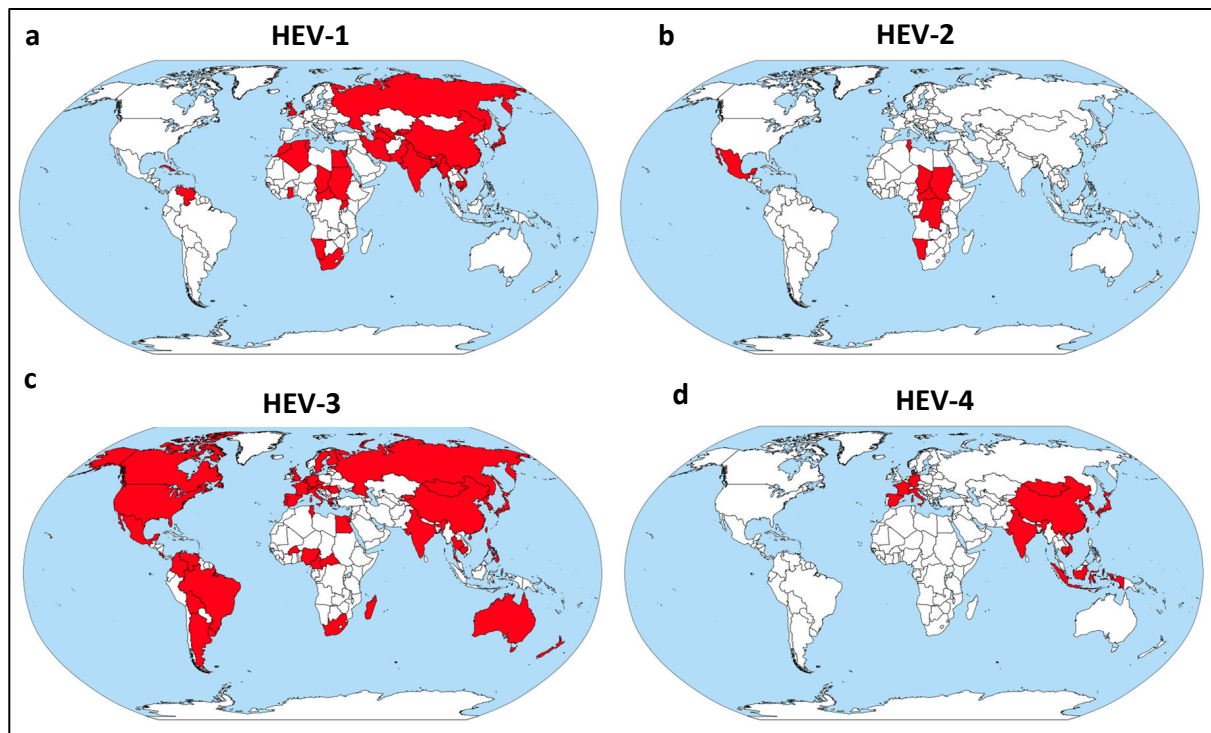


Figure 1: Répartition géographique des principaux génotypes du HEV humain.

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

2.1.2. Génotypes animaux du HEV transmis à l'humain

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

2.2. Modes de transmission du HEV

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

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

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

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

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

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

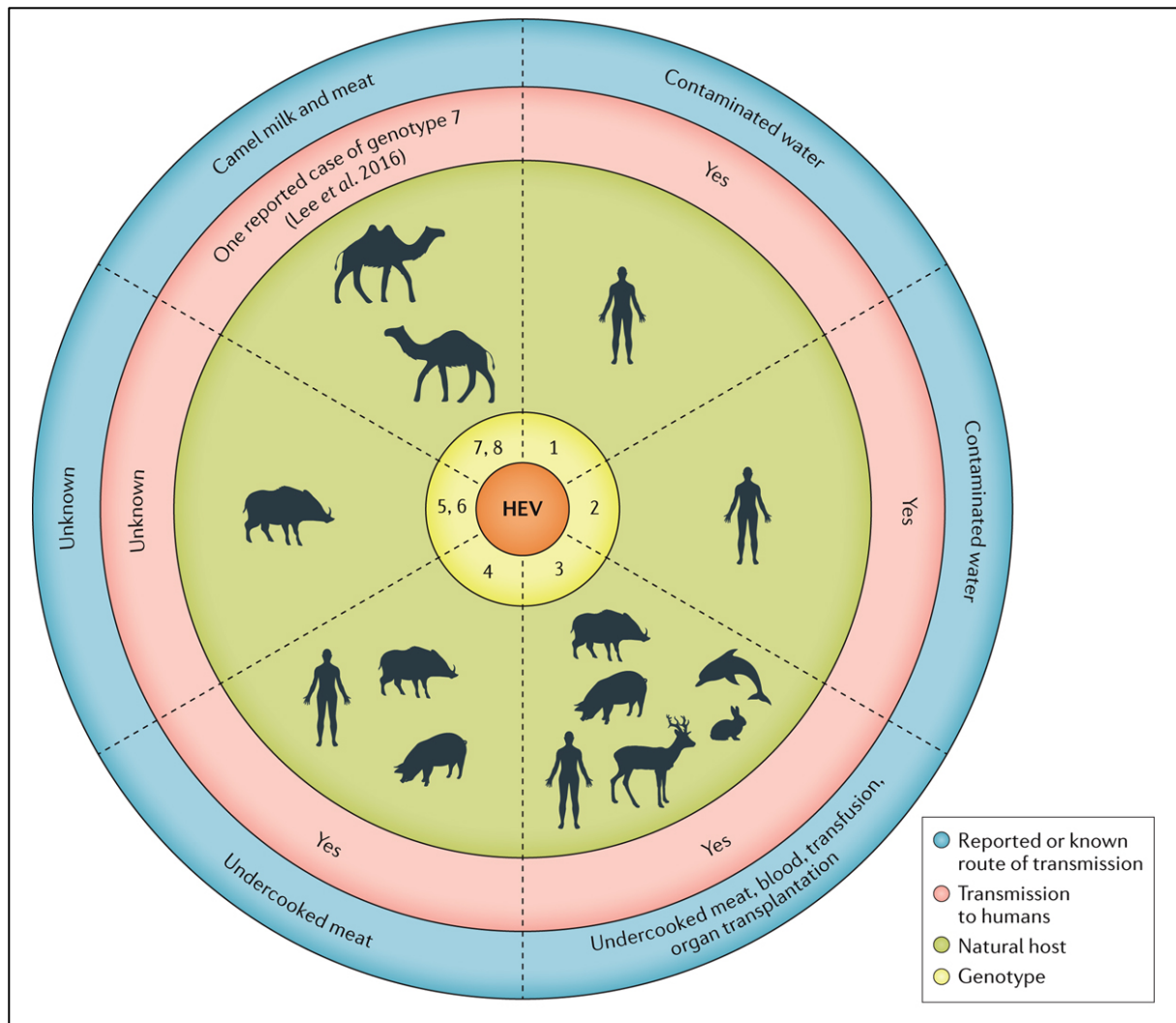


Figure 2: Transmission des différents génotypes du HEV et leurs hôtes naturels

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

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

3. SIGNES CLINIQUES ET PATHOGENESE

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

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

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

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

3.1. Hépatite aiguë

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

3.2. Hépatite fulminante

3.2.1. Dans la population générale

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

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

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

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

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

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

3.2.2. Chez les femmes enceintes

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

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

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

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

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

3.3. Hépatite Chronique

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

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

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

3.4. Manifestations extra-hépatiques

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

3.4.1. Manifestations neurologiques

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

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

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

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

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

3.4.2. Manifestations rénales et pancréatiques

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

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

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

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

4. DIAGNOSTIC D'UNE HEPATITE E

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

4.1. Diagnostic indirect

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

4.2. Diagnostic direct

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

Des tests directs permettant d'identifier la protéine ORF2 (protéine antigénique majeure du HEV) sont commercialisés. Le plus utilisé en clinique est le test ELISA-Wantaï (Wantaï HEV-antigen ELISA^{Plus}). Ce kit a été décrit comme ayant une spécificité de 100% (Lapa et al. 2016)

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

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

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

5. TRAITEMENTS CONTRE LE VIRUS DE L'HEPATITE E

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

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

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

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

6. PREVENTION

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

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

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

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

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

7. CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES

7.1. Classification du HEV

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

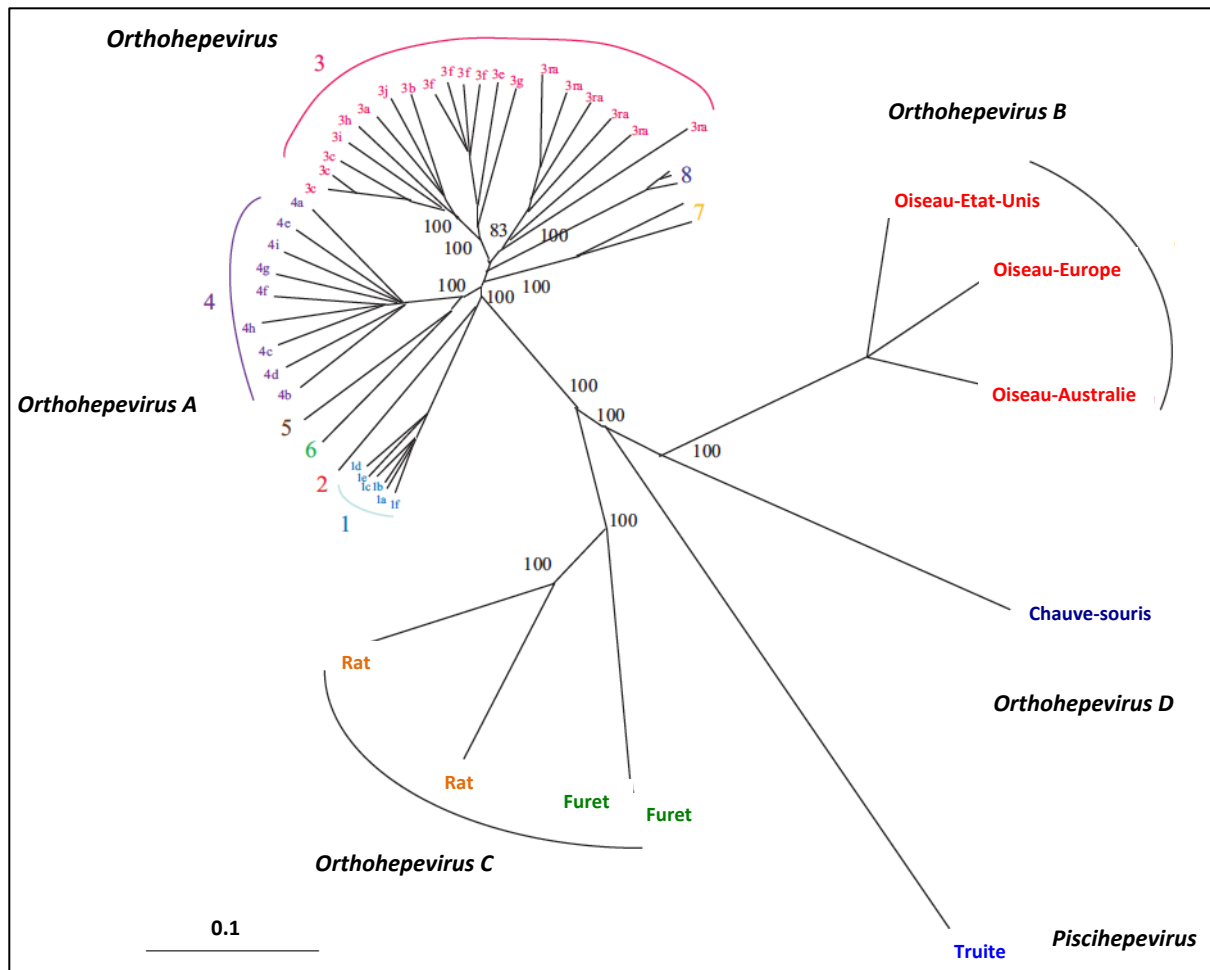


Figure 3: Arbre phylogénétique des différentes espèces et génotypes du HEV.

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

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

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

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

7.2. Le génome du HEV

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

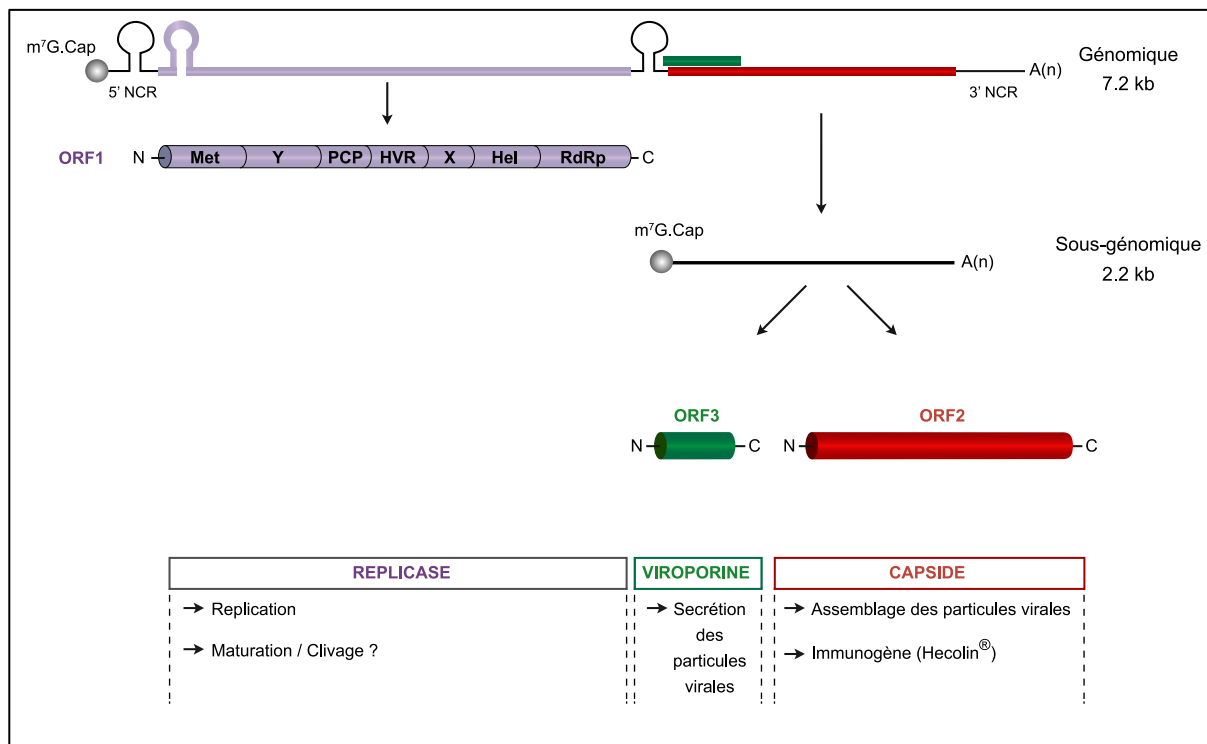


Figure 4: Structure du génome et des protéines de HEV

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

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

7.3. Les protéines virales

7.3.1. La protéine ORF1

7.3.1.1. Organisation des différents domaines de la protéine ORF1

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

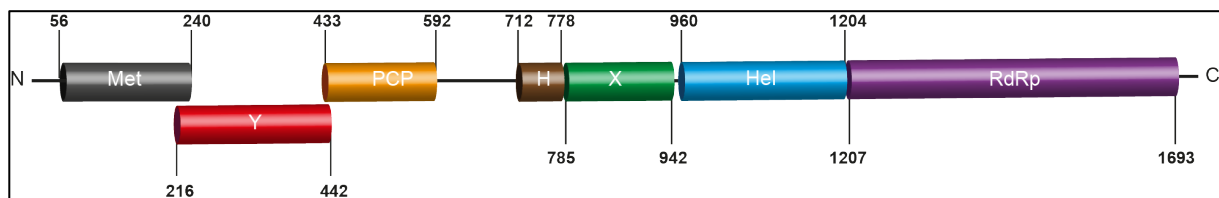


Figure 5: Les différents domaines de la protéine ORF1

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

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

7.3.1.2. Fonctions des différents domaines de la protéine ORF1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A ce jour, il n'est pas connu si la polyprotéine ORF1 en système infectieux est maturée en plusieurs polypeptides. Une activité enzymatique chymotrypsine a été montrée pour le domaine

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

7.3.2. La protéine ORF2

7.3.2.1. Organisation générale de la protéine ORF2

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



Figure 6: Structure schématique de la protéine ORF2

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

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

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

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

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

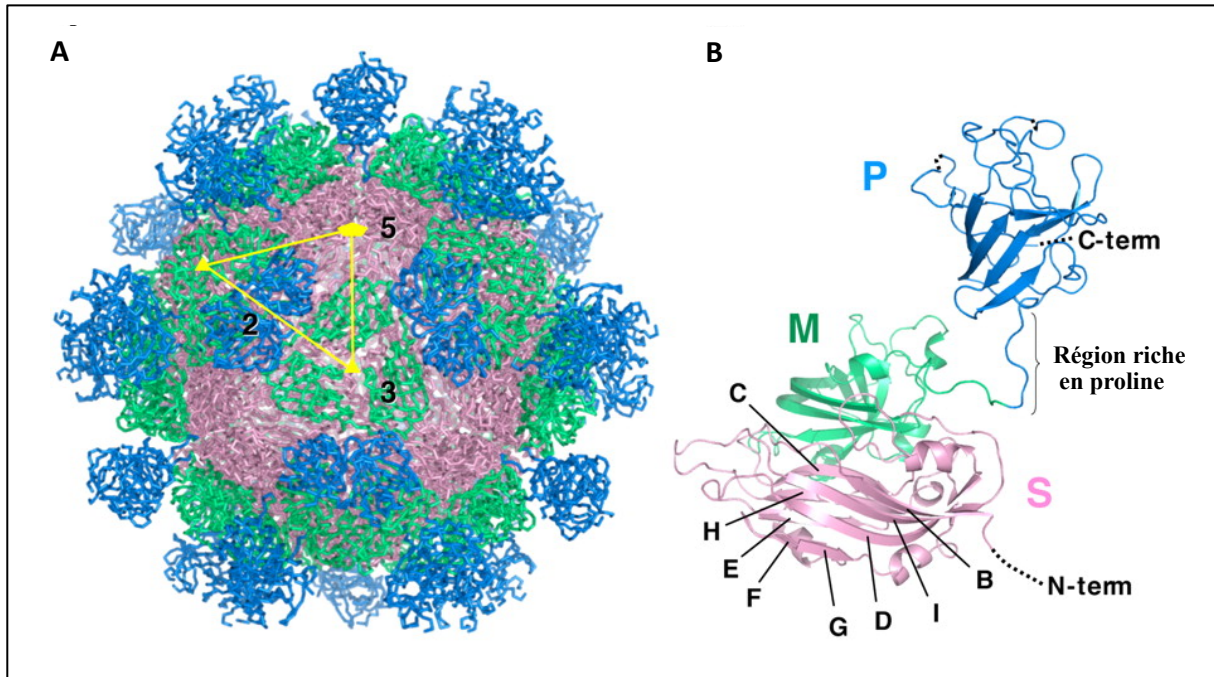


Figure 7: Structure cristallographique de la protéine ORF2

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

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

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

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

7.3.2.2. La protéine ORF2 associée au génome viral

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

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

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

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

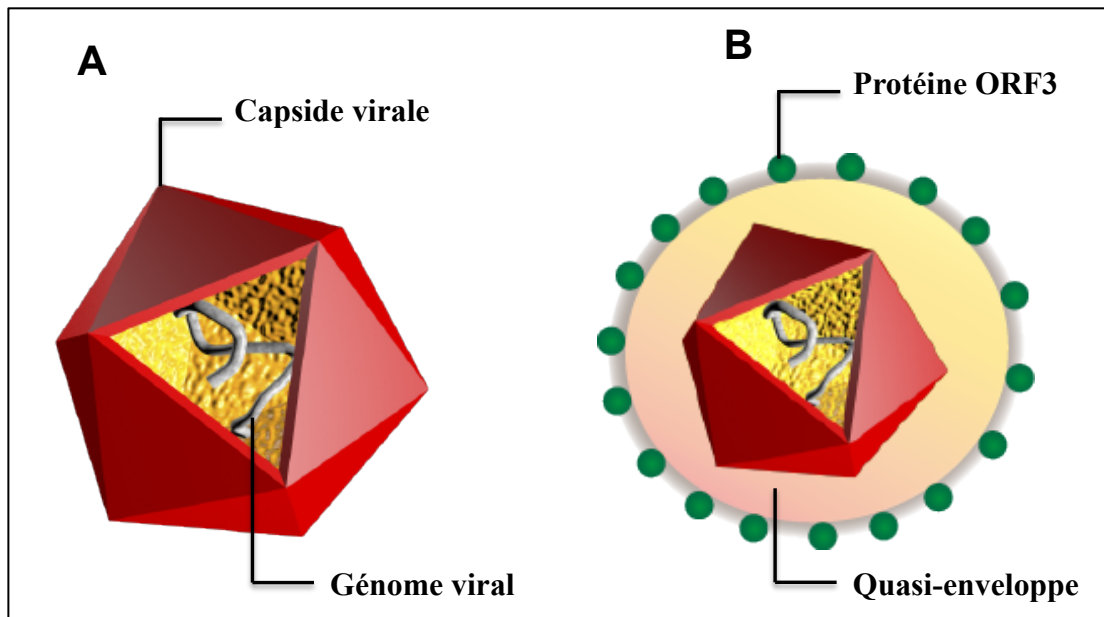


Figure 8: Particules virales du HEV

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

7.3.3. La protéine ORF3

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

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

7.3.4. La protéine ORF4

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

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

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

7.4. Cycle de réplication du HEV

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

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

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

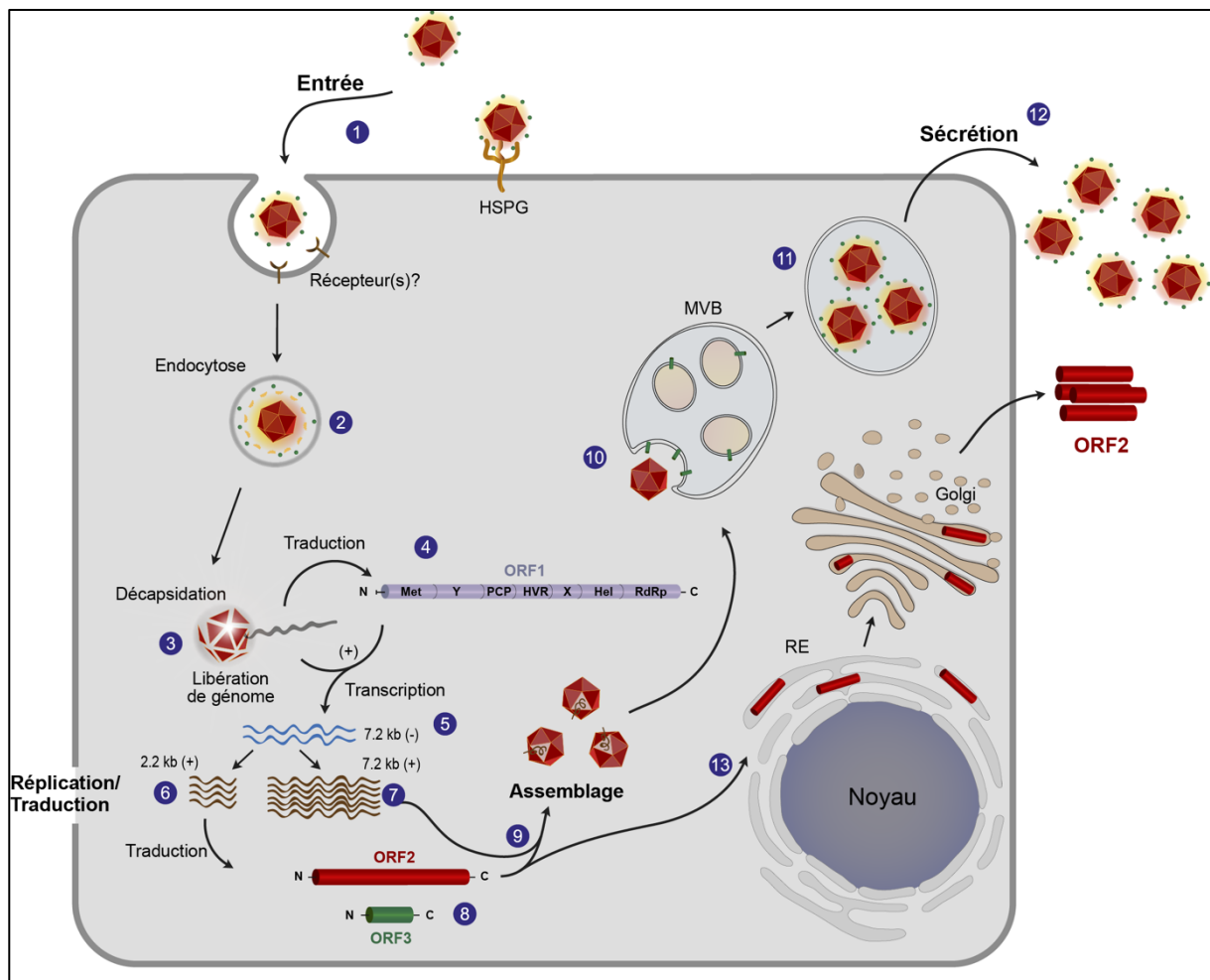


Figure 9: Cycle infectieux du HEV.

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

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

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

8. MODELES D'ETUDE DU HEV

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

8.1. Culture cellulaire

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

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

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

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

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

Il a été montré que la protéine S17 possède un signal de localisation nucléaire et nucléolaire permettant à la protéine ORF1 d'être importée dans le noyau des cellules hôtes (Kenney &

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

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

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

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

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

En plus de ces systèmes de culture, d'autres études ont montré que le HEV de lapin pouvait se répliquer dans les cellules humaines (A549 et PLC/PRF/5) (Jirintai et al. 2012), et le HEV de furet s'adapte bien sur les cellules PLC/PRF/5 (Li, T. C. et al. 2015; Yoshizaki, et al. 2016). Le HEV d'oiseau a été également cultivé sur des cellules LMH (cellules de foie de coq doré) (

Huang, F. F. et al. 2005). Enfin, le HEV des chameaux a aussi été cultivé sur des cellules PLC/PRF/5 (Li, T. C., Zhou, et al. 2016).

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

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

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

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

8.3. Modèles animaux

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

Ces modèles animaux sont également utilisés pour des études vaccinales contre le HEV en utilisant des formes tronquées de la protéine ORF2 (Tsarev et al. 1994; Zhang, M. et al.

2002). Malheureusement, les modèles d'étude utilisant les primates non-humains ne sont pas représentatifs de ce qui se passe chez la femme enceinte. En effet chez ces primates, les risques dus au HEV sont faibles au cours de la grossesse. En plus, la transmission verticale du HEV n'a pas lieu comme chez la femme (Arankalle et al. 1993; Tsarev et al. 1995).

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

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

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

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

Le rat a été identifié comme réservoir naturel du HEV appartenant au genre *Orthohepevirus*, espèce *Orthohepevirus C* et peut être utilisé comme modèle d'étude du HEV, notamment pour le screening de molécules antivirales. Néanmoins, ce modèle reste limité car il n'est pas permissif aux génotypes humains (Debing, Y., Mishra et al. 2016). Les furets et les oiseaux

peuvent aussi constituer des modèles animaux d'étude du HEV (pour revue voir (Meister et al. 2019)).

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

9. REPONSE IMMUNITAIRE ET ECHAPPEMENT PAR LE HEV

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

9.1. Immunité innée

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

Concernant les TLR, il existe 13 membres et seulement 3 sont impliqués dans la reconnaissance des ARNs viraux. Ce sont les TLR3, 7 et 8 (Kawai & Akira 2011). La reconnaissance des ARNs viraux par les RLR et les TLR induit l'activation des voies de signalisation médiées par l'IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), l'IRF7 et le facteur nucléaire NF- κ B, (**Figure 10**).

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

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

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

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

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

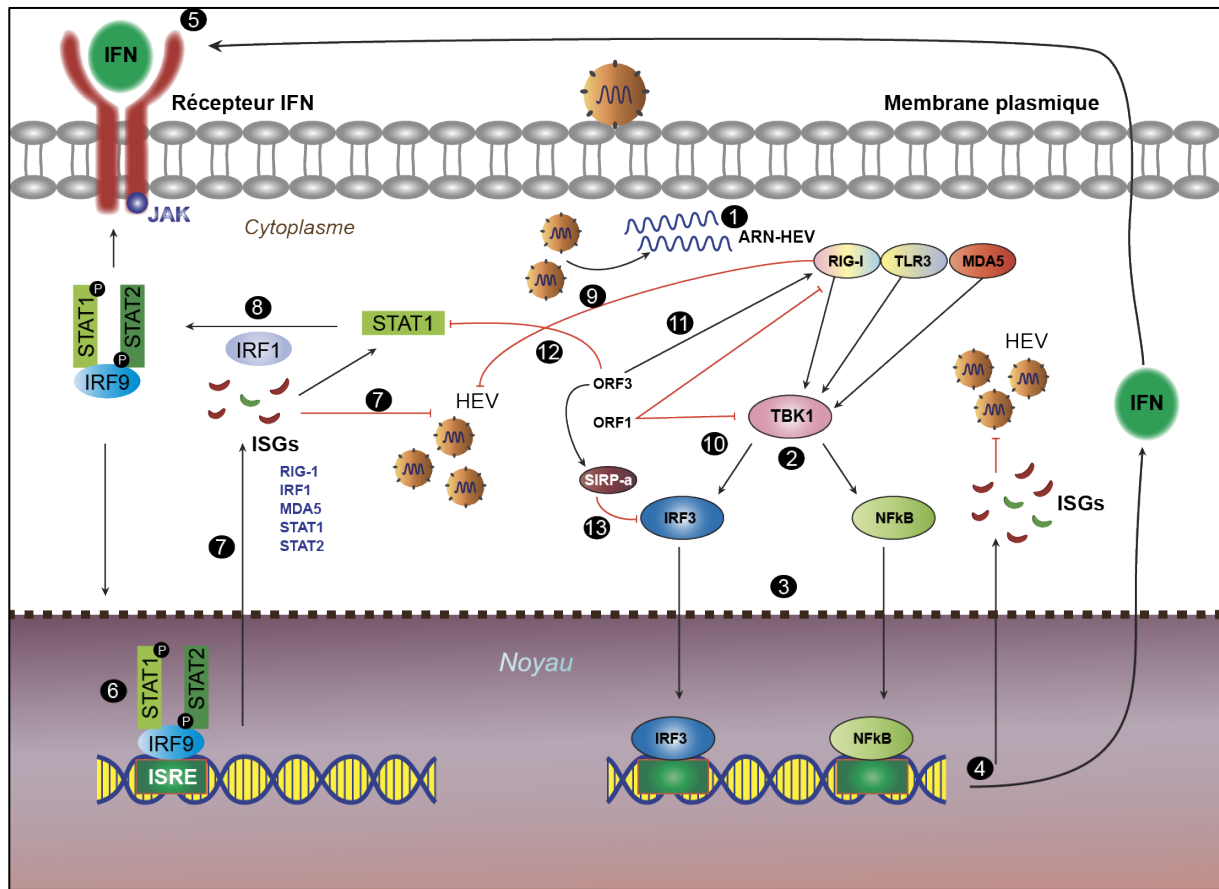


Figure 10: La voie interféron au cours d'une infection par le HEV.

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

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

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

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

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

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

9.2. Immunité spécifique

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

9.2.1. Immunité humorale

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

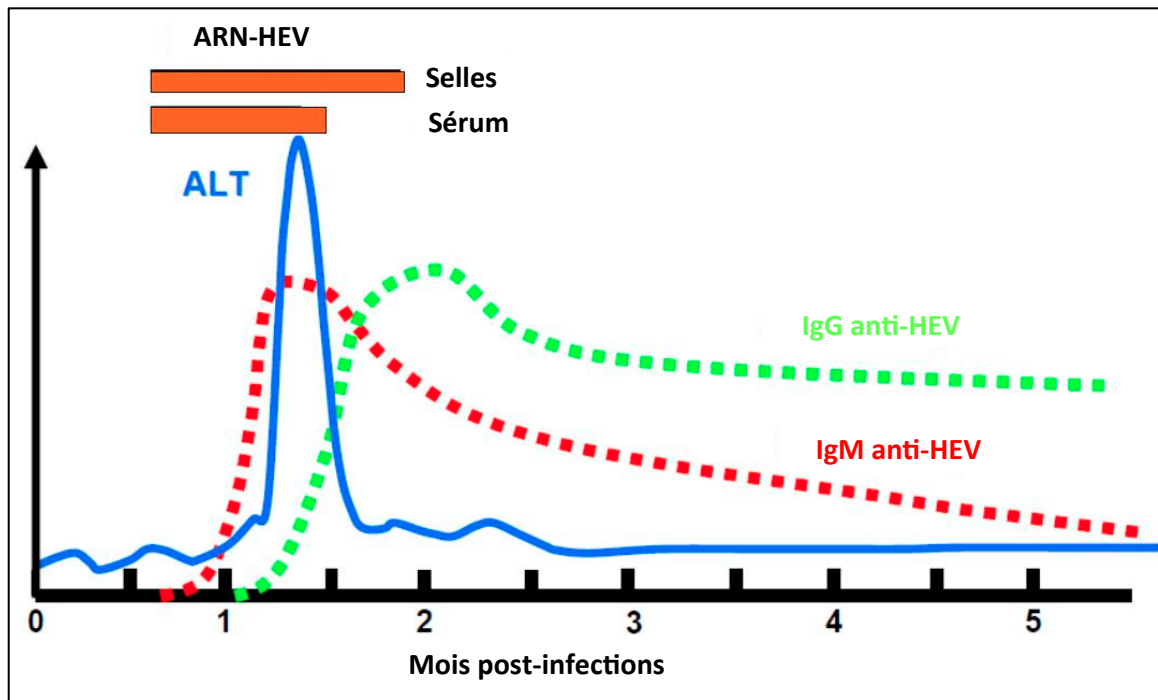


Figure 11: Réponse humorale au cours d'une hépatite E aiguë

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

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

9.2.2. Immunité cellulaire

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

Plusieurs études ont montré l'infiltration des lymphocytes dans les biopsies de foie des patients infectés par le HEV montrant une activité effectrice de ces cellules immunitaires au

niveau du site d'infection. L'activité cytotoxique des CD8+ exacerbée (perforine et granzyme) de ces lymphocytes pourrait être à l'origine des défaillances hépatiques au cours des formes sévères d'hépatite E (Prabhu et al. 2011; Naik et al. 2015).

B) LA N-GLYCOSYLATION

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

1. Les différents types de N-glycane

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

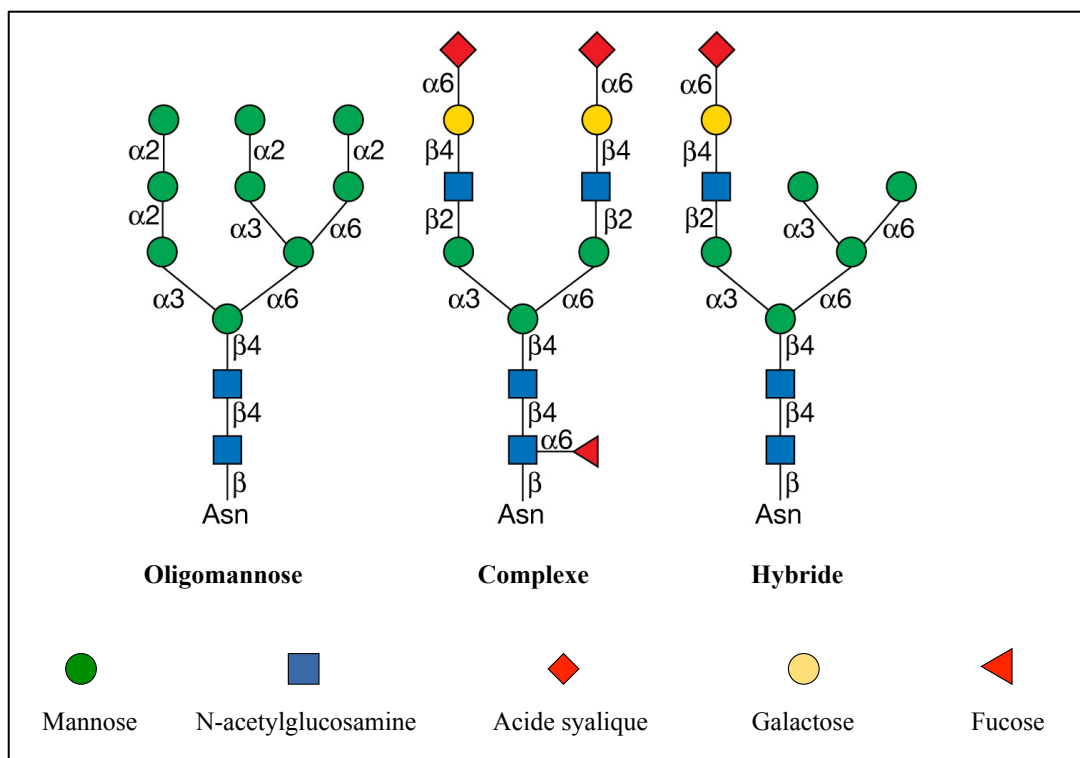


Figure 12: Différents types de N-glycane

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

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

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

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

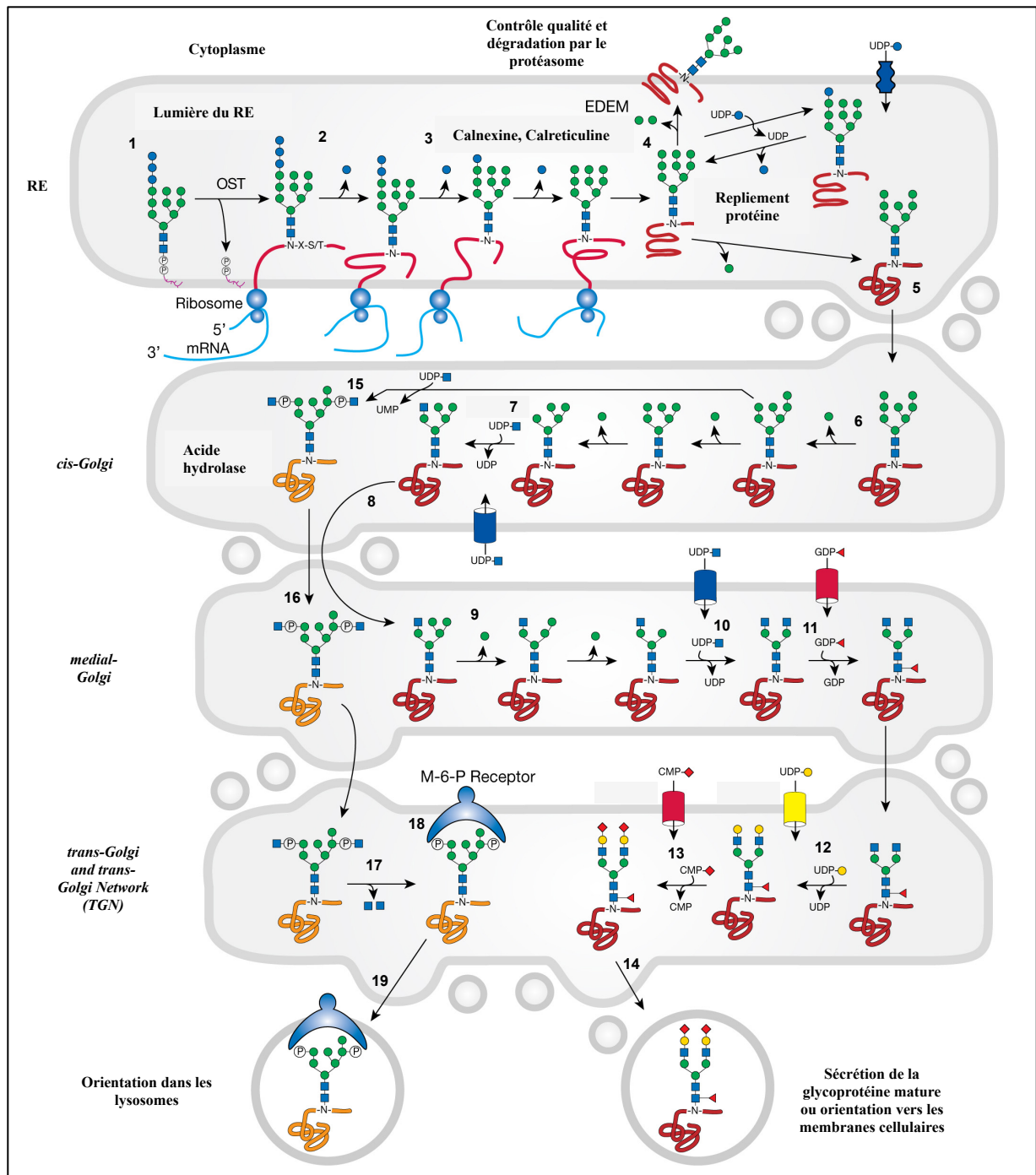


Figure 13: Mécanismes de la N-glycosylation chez les cellules eucaryotes

(1) Le glycane (Glc₃Man₉GlcNAc₂) associé au Dolichol-Pyro-Phosphate est transféré en bloc sur l'asparagine de la protéine possédant le séquen N-X-S/T au cours de sa translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par l'action de l'oligosaccharyltransférase (OST). (2) Dans la lumière du RE, trois molécules de glucoses (Glc) sont clivées par l'action des glycosidases et deux molécules de mannose (Man) par l'action des mannosidases et un ajout d'une molécule de mannose. (3) Cette étape est associée au repliement de la glycoprotéine par l'action des chaperones cellulaires telles que la Calnexine et la Calréticuline. Les mannosidases du RE clivent également une molécule de mannose. (4) Les protéines mal repliées sont orientées par rétro-translocation vers le cytoplasme grâce à l'action de l'EDEM (*ER degradation-enhancing α -mannosidase I-like protein*) où elles sont ensuite dégradées par le protéasome (5) tandis que celles bien repliées vont passer dans le Golgi. La glycoprotéine qui passe dans le cis-golgi possède un N-glycane de type Man₈GlcNAc₂. Pour la majorité des glycoprotéines, 3 molécules de mannose sont clivées dans le cis-golgi par l'action des mannosidases pour donner un N-glycane de type Man₅GlcNAc₂. (6) Trois molécules de mannose sont clivées et (7) une molécule de GlcNAc est ajoutée. (8) La glycoprotéine passe ensuite dans le medial-Golgi où elle subit l'action de l' α -mannosidase II qui clive deux molécules de mannose sur le N-glycane (9). Il s'ensuit l'ajout d'un GlcNAc (10), d'un fucose (triangle rouge) (11). (12) La glycoprotéine passe ensuite dans le trans-Golgi où elle subit l'action de l' α -mannosidase III qui clive une molécule de mannose sur le N-glycane (13). (14) La glycoprotéine passe ensuite dans le trans-Golgi Network (TGN) où elle subit l'action de l' α -mannosidase VI qui clive une molécule de mannose sur le N-glycane (15). (16) La glycoprotéine est soit orientée vers les lysosomes (17) soit vers les membranes cellulaires (18) par l'action de l'M-6-P Receptor (19).

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

3. Les différents rôles de la N-glycosylation

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

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

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

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

4. La N-glycosylation et les virus

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

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

La présence d'un N-glycane proche du site de liaison avec les récepteurs d'acides sialiques est cruciale pour l'affinité et la spécificité de ces récepteurs (Wagner, R. et al. 2000). De plus,

la présence de N-glycanes sur la protéine HA du virus *Influenza* masque les sites antigéniques permettant à ce virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Abe et al. 2004).

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

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

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

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

Concernant le HEV, sa protéine de capsid ORF2 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation. Une étude a montré que les 3 sites étaient occupés par des N-glycanes, le site 2 étant le site principal de N-glycosylation (Zafrullah et al. 1999) malgré une proline en position +1 du séquen. Cette étude a été réalisée en analysant la forme intracellulaire de la protéine ORF2. Néanmoins, nous avons montré tout récemment que la protéine de capsid intracellulaire (ORF2_{intra}) n'est pas N-glycosylée. Nous avons également montré que le HEV sécrète une quantité importante de formes glycosylées de sa protéine de capsid (appelées ORF2g et ORF2c) dans le surnageant des cellules productrices et dans les sérums des patients infectés par ce virus.

Ces formes glycosylées ne sont pas associées au génome viral. Par contre, la protéine ORF2 associée au génome viral (ORF2_i) n'est pas glycosylée (Montpellier et al. 2018) (**Annexe 2**). Aucune étude sur l'importance de la N-glycosylation de la protéine ORF2 prenant en compte ces nouveaux éléments n'a été réalisée jusqu'à ce jour.

5. Les inhibiteurs de N-glycosylation comme antiviraux

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

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

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

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

C) TRANSPORT NUCLEO-CYTOPLASMIQUE

1. Chez les cellules eucaryotes

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

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

Concernant l'export nucléaire, les protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES) sont reconnues par les exportines qui les transportent du noyau vers le cytoplasme (**Figure**

14B). L'exportine1 (Expo1) ou CMR1 (*Chromosomal maintenance region 1*) est l'exportine qui reconnaît les protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES). (pour revue voir (Wente & Rout 2010)). Les NES sont des séquences riches en résidus hydrophobes (leucine, phénylalanine, méthionine, isoleucine) (pour revue voir (Fung et al. 2015)). L'export des macromolécules du noyau vers le cytoplasme concerne très souvent les ARNs. C'est ainsi que l'exportine-t et l'exportine5 assurent l'export des ARNs vers le cytoplasme, l'exportine5 exporte aussi les micro ARN (pour revue voir (Sorokin et al. 2007)). Concernant les ARNm, ils sont transportés par les protéines de la famille des TAP/NXF (pour revue voir (Lei, E. P. & Silver 2002; Juillard et al. 2009)).

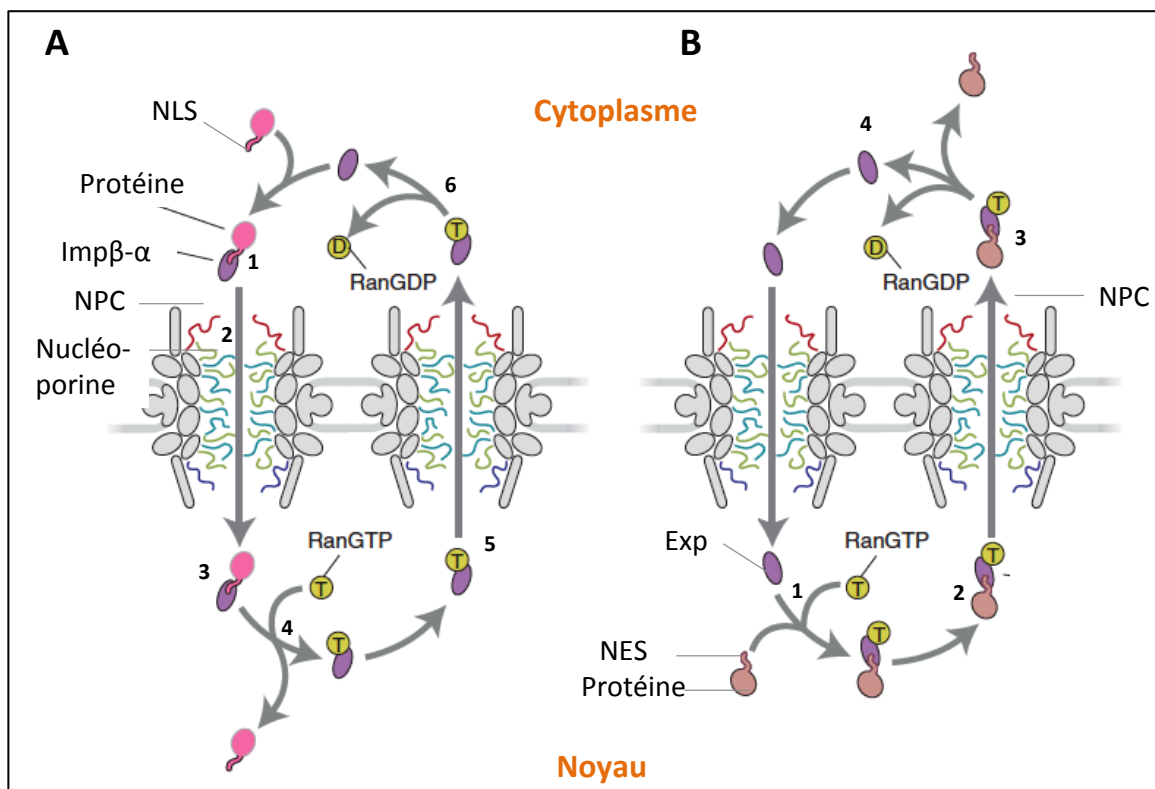


Figure 14: Transport nucléocytoplasmique des protéines

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

Le transport nucléocytoplasmique des protéines et des ARNs cellulaires est très important dans la régulation des facteurs de transcription et l'expression des gènes. Cependant, plusieurs virus détournent ce mécanisme pour améliorer plusieurs étapes de leur cycle infectieux (pour

revue voir (Yarborough et al. 2013)). C'est le cas par exemple du virus de l'hépatite B (HBV) qui réplique son génome dans le noyau des cellules hôtes (Karayiannis 2017) et du virus de la rage qui inhibe la réponse immunitaire STAT dépendante des cellules hôtes via le trafic nucléo-cytoplasmique de sa phosphoprotéine (protéine P) (Rowe et al. 2016).

2. Importances du transport nucléo-cytoplasmique pour les virus

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

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

Les ARNpg sont exportés du noyau vers le cytoplasme soit en interagissant directement avec l'exportine (TAP/NXF1), soit en interagissant avec la protéine HBc qui se fixe d'une part à l'ARNpg, *via* son domaine riche en arginines, et d'autre part à l'exportine TAP/NXF1, *via* ses

deux NES (**étape 5**). Les ARNm viraux sont ensuite traduits par la machinerie cellulaire et les protéines virales (HBc et la polymérase) sont synthétisées (**étape 6**).

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

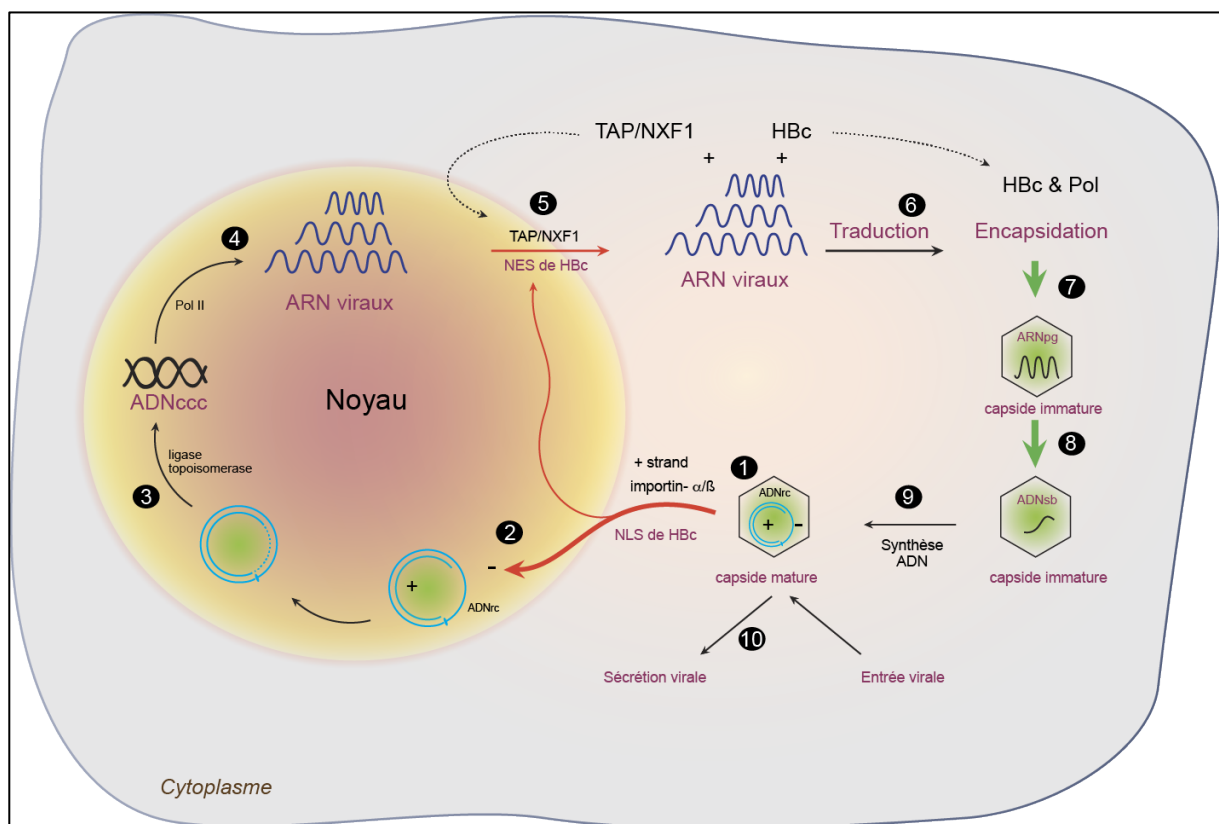


Figure 15: Cycle cellulaire du virus de l'hépatite B (HBV).

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

Contrairement aux virus à ADN, la majorité des virus à ARN non segmentés, simple brin se répliquent dans le cytoplasme des cellules infectées. Cependant, plusieurs protéines structurales (comme les protéines de capsid) de ces virus ont, en plus de leur rôle dans l'assemblage des particules virales, une localisation nucléaire afin d'améliorer la réplication du génome viral

dans la cellule hôte ou inhiber la réponse immunitaire. C'est le cas par exemple des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* et *Coronaviridae* (pour revue voir (Wulan et al. 2015)).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1. Les inhibiteurs d'import nucléaire

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

3.2. Les inhibiteurs d'export nucléaire

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

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

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

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

II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

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

III.RESULTATS

III. RESULTATS

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

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

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


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

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle

Maliki Ankavay¹, Claire Montpellier¹, Ibrahim M. Sayed^{2,3,5}, Jean-Michel Saliou¹, Czeslaw Wychowski¹, Laure Saas¹, Sandrine Duvet⁴, Cécile-Marie Aliouat-Denis¹, Rayan Farhat¹, Valentin de Masson d'Autume¹, Philip Meuleman², Jean Dubuisson¹ & Laurence Cocquerel¹ 

Hepatitis E Virus (HEV) genome encodes three proteins including the ORF2 capsid protein. Recently, we demonstrated that HEV produces three different forms of ORF2: (i) the ORF2i form (infectious ORF2) which is the component of infectious particles, (ii) the secreted ORF2g (glycosylated ORF2) and ORF2c (cleaved ORF2) forms that are not associated with infectious particles, but are the major antigens in HEV-infected patient sera. The ORF2 protein sequence contains three highly conserved potential N-glycosylation sites (N1, N2 and N3). The status and biological relevance of ORF2 N-glycosylation in HEV lifecycle remain to be elucidated. Here, we generated and extensively characterized a series of ORF2 mutants in which the three N-glycosylation sites were mutated individually or in combination. We demonstrated that the ORF2g/c protein is N-glycosylated on N1 and N3 sites but not on the N2 site. We showed that N-glycosylation of ORF2 protein does not play any role in replication and assembly of infectious HEV particles. We found that glycosylated ORF2g/c forms are very stable proteins which are targeted by patient antibodies. We also demonstrated that the ORF2i protein is translocated into the nucleus of infected cells. Hence, our study led to new insights into the molecular mechanisms of ORF2 expression.

Hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of acute viral hepatitis worldwide and is an emerging problem in industrialized countries. This virus infects approximately 20 million people every year and is responsible for an estimated 3.4 million symptomatic cases and 70,000 deaths, mainly in developing countries¹. Although HEV infection is usually asymptomatic and self-resolving, severe forms in pregnant women² and chronic infections in immunocompromised patients³ have been described. In addition, HEV infection has been associated with extra-hepatic manifestations³. HEV strains infecting humans have been classified into 4 main distinct genotypes (gt) belonging to a single serotype⁴. Gt1 and gt2 exclusively infect humans and are spread mainly through contaminated drinking water and represent main causes of waterborne outbreaks of hepatitis in developing countries. In industrialized countries, gt3 and gt4 are zoonotic and mainly infect mammals, where pigs and game are the main reservoirs⁵. The major transmission routes of gt3 and gt4 are direct contact with infected animals, consumption of contaminated food and transfusion of blood products⁶.

HEV is a quasi-enveloped virus^{7–9} containing a linear, single-stranded, positive-sense RNA genome with three open reading frames (ORFs), namely, ORF1, ORF2 and ORF3¹⁰. ORF1 encodes the ORF1 non-structural polyprotein that is essential for viral replication¹¹. ORF2 encodes the ORF2 viral capsid protein and ORF3 encodes a small phosphoprotein that is involved in virion morphogenesis and egress¹².

The ORF2 protein sequence contains 660 amino acids (aa) and displays a signal peptide at its N-terminus and three highly conserved potential N-glycosylation sites represented by the sequon Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T)^{13–15}.

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000, Lille, France. ²Laboratory of Liver Infectious Diseases, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Ghent University, Ghent, Belgium. ³Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Assiut University, Assiut, Egypt. ⁴Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000, Lille, France. ⁵Present address: Department of Pathology, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA. Claire Montpellier and Ibrahim M. Sayed contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.C. (email: laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr)

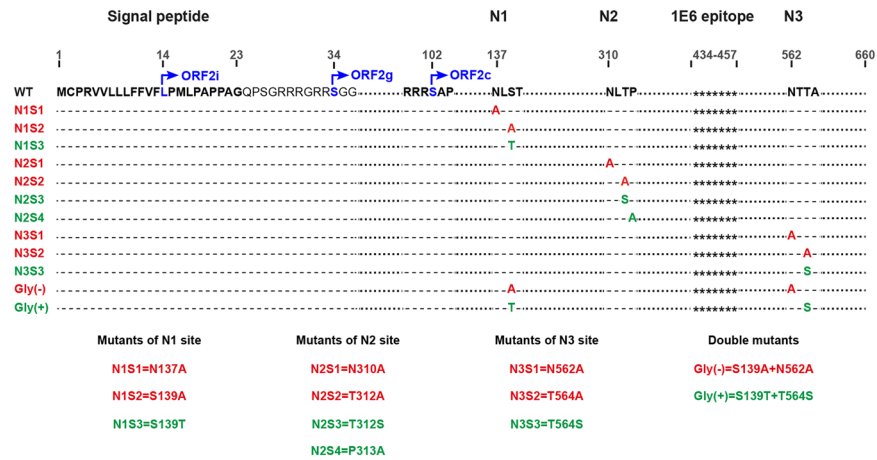


Figure 1. Schematic representation of wild type and mutant ORF2 protein sequences. HEV ORF2 protein is a 660 amino acid protein. The first 23 amino acids (aa) corresponding to the signal peptide are in bold. Positions of the first aa of ORF2i, ORF2g and ORF2c proteins are indicated. The three potential N-glycosylation sites are in bold (N1, N2 and N3). For each mutant, the introduced mutation(s) is/are shown. Mutations that inhibit N-glycosylation are in red whereas mutations that do not inhibit N-glycosylation are in green. The stars (*****) represent the epitope of the 1E6 anti-ORF2 antibody.

The ORF2 protein has been largely studied and is the most characterized HEV viral protein¹². However, the status and biological relevance of ORF2 N-glycosylation is still unclear. Previous attempts to characterize ORF2 N-glycosylation sites were either based on over-expression of recombinant ORF2 protein^{15–18} or by using a gt1 strain which does not robustly replicate in cell culture¹⁴. By combining the highly replicative and cell culture-selected gt3 p6 strain¹⁹ and a highly transfectable subclone of PLC/PRF/5 cells (PLC3 cells), we recently developed an efficient HEV cell culture system and demonstrated for the first time that HEV infection leads to the secretion of at least 3 forms of the ORF2 capsid protein: infectious ORF2 (ORF2i), glycosylated ORF2 (ORF2g), and cleaved ORF2 (ORF2c)²⁰. We identified the precise sequence of the ORF2i and ORF2g proteins. The ORF2i protein is the structural component of infectious particles. It is not glycosylated and is likely derived from the assembly of the intracellular ORF2 (ORF2intra) form present in the cytosolic compartment. In contrast, ORF2g and ORF2c proteins are secreted in large amounts in culture supernatant and infected patient sera, sialylated, N- and O-glycosylated but are not associated with infectious virions²⁰. The identification of these ORF2 forms and post-translational modifications suggest the existence of different pathways for the production of HEV capsid protein, either by differential addressing of ORF2 protein into the secretory pathway²⁰ or by a differential translation process, as recently suggested²¹. Importantly, ORF2g and ORF2c proteins are the most abundant antigens detected in patient sera²⁰. In addition, it has been very recently shown that these proteins might inhibit antibody-mediated neutralization²¹. Whether ORF2g and ORF2c proteins play a specific role in the HEV lifecycle therefore needs to be elucidated.

In the present study, we took advantage of our HEV cell culture system, in which ORF2 proteins are robustly expressed, to analyze the significance of N-glycosylation of the ORF2 protein in the HEV lifecycle. Using site-directed mutagenesis of the full-length infectious p6 clone, we constructed a series of ORF2 mutants in which the three potential N-glycosylation sites (¹³⁷NLS, N1; ³¹⁰NLT, N2; ⁵⁶²NTT, N3) were mutated individually or in combination. We performed an extensive characterization of these mutants by analyzing their subcellular localization, expression, oligomerization, stability and recognition by antibodies. We also studied the impact of mutations on assembly, density and infectivity of HEV particles. In addition to analyzing the status and biological relevance of ORF2 N-glycosylation in the HEV lifecycle, we obtained new insights into the molecular mechanisms of ORF2 biology.

Results

The ORF2 protein sequence displays a signal peptide sequence at its N-terminus and three potential N-glycosylation sites, ¹³⁷NLS (N1), ³¹⁰NLT (N2), and ⁵⁶²NTT (N3) (Fig. 1). Previously, we demonstrated that the first aa of infectious particle-associated ORF2i and ORF2g proteins are L¹⁴ and S³⁴, respectively²⁰. Here, by using the same mass spectrometry approach, we found that the first aa of ORF2c protein corresponds to S¹⁰² (Figs 1 and S1), indicating that ORF2c protein is likely a cleavage product of the ORF2g protein. The precise sequence of the ORF2intra protein needs to be identified.

Generation of HEV p6 genomes expressing mutations of ORF2 N-glycosylation sites. Using site-directed mutagenesis of the full-length infectious p6 clone, we constructed a series of ORF2 mutants in which N1, N2 and N3 sites were mutated individually (N1, N2 and N3 mutants) or in combination (Gly(-) and Gly(+) mutants) (Fig. 1). For each single mutant, three substitutions of the N-X-S/T sequon were generated: N-to-A (S1), S/T-to-A (S2) and S-to-T/T-to-S (S3). S1 and S2 substitutions were made to prevent N-glycan addition (Fig. 1, highlighted in red), whereas S3 substitution does not affect N-glycan addition (Fig. 1, highlighted in green). A fourth substitution (S4) was done for the N2 site in which a Proline (P) residue downstream of the sequon was replaced

by an Alanine (P313A). In Gly(−) and Gly(+) mutants, two combinations of mutations affecting (N1S2/N3S1) or not (N1S3/N3S3) the N-glycan addition on N1 and N3 glycosylation sites were introduced, respectively (Fig. 1). Capped RNAs transcripts were generated and delivered into PLC3 cells by electroporation.

Expression and subcellular localization of mutant ORF2 proteins. We first evaluated the expression and subcellular localization of mutant ORF2 proteins by indirect immunofluorescence. PLC3 cells electroporated with wild type and mutants of HEV RNAs (wt and mt PLC3/HEV cells) were fixed at 3 days post-electroporation (d.p.e.) and processed for ORF2 staining. For all constructs, over 90% of cells were ORF2-positive indicating that robust transfection and expression of viral genome occurred in wt and mt PLC3/HEV cells (data not shown). As shown in Fig. 2a, the wt ORF2 protein displayed mostly a cytoplasmic localization but likely also a nuclear localization, as recently described²². Although mutant ORF2 proteins were globally expressed as the wt ORF2 protein, N1 mutants showed a slightly more perinuclear localization (Fig. 2a), N2 mutants showed a concentrated staining in a spot close to the nucleus (Fig. 2b) whereas N3 mutants showed a subcellular localization similar to that of wt ORF2 proteins (Fig. 2c). Gly(−) and Gly(+) double mutants displayed a subcellular localization similar to that of N1 and N3 mutants, respectively (Fig. 2d). Double labeling with anti-ORF2 and ER-specific anti-calnexin MABs or Golgi-specific anti-GM130 MABs failed to reveal co-localization of ORF2 proteins with these compartment markers (data not shown), as previously observed for the gt1 ORF2 protein¹⁴. Nuclear localization of wt and mt ORF2 proteins was further characterized, as described below.

The ORF2 protein is N-glycosylated on N1 and N3 sites but not on the N2 site. ORF2 protein expressions in supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were characterized by western blotting (WB) by using the 1E6 anti-ORF2 monoclonal antibody that specifically recognizes the different forms of ORF2 protein²⁰ and Fig. S2). A major band corresponding to the ORF2intra protein was detected in all cell lysates (Fig. 3a), as previously described²⁰. Stainings observed in Fig. 2 thus corresponded mainly to the subcellular localization of ORF2intra proteins. We observed no shift of migration between wt and mutant proteins, even for the constructs carrying mutations that inhibit N-glycosylation. These results confirm that the ORF2intra protein is not N-glycosylated. In cell supernatants, two intense bands corresponding to the ORF2g and ORF2c forms were identified (Fig. 3b), as previously described²⁰. A very faint band corresponding to the ORF2i protein was also detected in some samples i.e. right wt and Gly(+) (Fig. 3b, indicated by an arrow). Interestingly, we observed a shift of migration of ORF2g and ORF2c proteins for the mutants that inhibit N-glycosylation on N1 or N3 sites or both (N1S1, N1S2, N3S1, N3S2 and Gly(−)), as compared to wt protein (Fig. 3b,d). In contrast, no shift of migration was observed for proteins carrying mutations that do not affect glycosylation of N1 and N3 sites (N1S3, N3S3 and Gly(+)). These results indicate that both N1 and N3 sites of the ORF2 protein are likely occupied by N-glycans. Analyses of N2S1, N2S2 and N2S3 mutants showed that their ORF2g and ORF2c proteins behaved similarly irrespective of the introduced mutation (affecting or not glycosylation) that prevented us to conclude about the N-glycosylation status of the N2 site. However, since it has been demonstrated that a Proline residue right downstream of the N-X-S/T sequon constitutes an unfavorable context for N-linked glycan modification²³, we generated an additional mutant of the N2 site in which we replaced the Proline³¹³ by an Alanine residue (N2S4) (Fig. 1). Interestingly, N2S4 ORF2g and ORF2c proteins displayed a higher apparent molecular weight than the wt forms (Fig. 3b), indicating that the N2S4 mutation likely led to the addition of a supplementary N-glycan on ORF2 proteins. Together, these results indicated that the N2 site is likely not N-glycosylated in the context of wt ORF2 proteins.

To further characterize the sites of ORF2 protein that are N-glycosylated, representative mutants were selected (N1S1, N2S1, N2S4, N3S1 and Gly(−)) and further characterized. Supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were denatured and digested with Peptide-N-Glycosidase F (PNGaseF), a glycosidase that cleaves between the innermost N-acetyl glucosamine and asparagine residues of N-glycoproteins. As shown in Fig. 3e, wt and mt ORF2intra proteins expressed from cell lysates were resistant to glycosidase digestion, strengthening the fact that ORF2intra protein in cell lysates is not N-glycosylated. In contrast, we observed a shift of migration between untreated (−) and treated (+) condition for the secreted wt and mutants N1S1, N2S1, N2S4 and N3S1 (Fig. 3f). Importantly, no shift was observed for the Gly(−) double mutant that inhibit N-glycosylation on N1 and N3 sites, confirming that the N2 site is not occupied by N-glycans. In addition for the N2S4 mutant, we observed a higher migration shift between PNGaseF untreated (−) and treated (+) ORF2g and ORF2c proteins, as compared to wt (Fig. 3f).

To further confirm which sites of N-glycosylation are occupied by glycans on ORF2 protein, we next performed mass spectrometry analyses. ORF2g/ORF2c proteins immunoprecipitated with an anti-ORF2 antibody (4B2) were treated or left untreated with PNGaseF. Proteins were resolved by SDS-PAGE and Colloidal blue-stained bands corresponding to ORF2g and ORF2c proteins in WB (data not shown) were digested in-gel with trypsin (Tryp) or the endoproteinase AspN and then analyzed by nano scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Detected peptides were compared to the theoretical peptide sequences of non N-glycosylated or PNGaseF-deglycosylated ORF2 protein digested with Tryp or AspN. As shown in Table 1, when ORF2g/c proteins were not treated with PNGaseF, no peptides covering N1 and N3 sites were detected after digestion with Tryp or AspN. In contrast, upon treatment with PNGaseF, peptides covering N1 and N3 sites were detected after digestion with Tryp or AspN, indicating that N1 and N3 sites are most likely occupied by N-glycans. Interestingly, peptides covering the N2 site were detected in both treated and untreated samples digested with Tryp or AspN, indicating that the probability that the site N2 is occupied by N-glycans is very low (Table 1).

Taken together, our results demonstrated that the ORF2 protein is N-glycosylated on N1 (¹³⁷NLS) and N3 (⁵⁶²NTT) sites but not on the N2 (³¹⁰NLT) site.

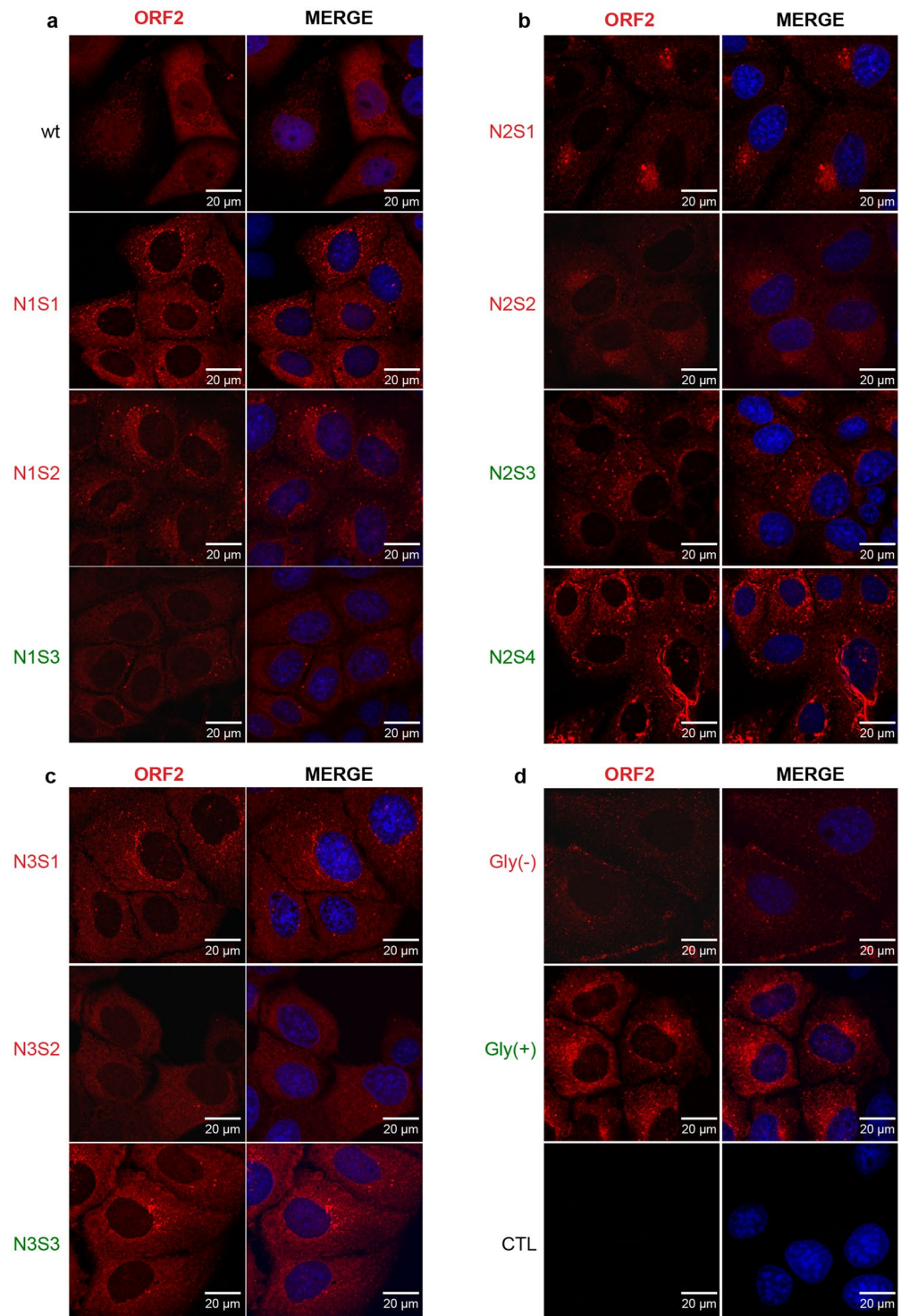


Figure 2. Subcellular distribution of wt and mutant ORF2 proteins. PLC3 cells were electroporated with wt and mt HEV RNAs and grown on coverslips. 3 days post-electroporation, cells were fixed and ORF2 protein was stained using the 1E6 antibody (in red). Nuclei were stained with DAPI (in blue). Cells were analyzed by confocal microscopy (magnification x40). Representative acquisitions of two independent experiments are presented. **(a)** Cells expressing wild type (wt) and N1S1 (N137A); N1S2 (S139A); N1S3 (S139T) mutants. **(b)** Cells expressing N2S1 (N310A); N2S2 (T312A); N2S3 (T312S) and N2S4 (P313A) mutants. **(c)** Cells expressing N3S1 (N562A); N3S2 (T564A); N3S3 (T564S) mutants. **(d)** Cells expressing Gly(-) (N1S2+N3S1) and Gly(+) (N1S3 + N3S3) double mutants and non-transfected PLC3 cells (CTL).

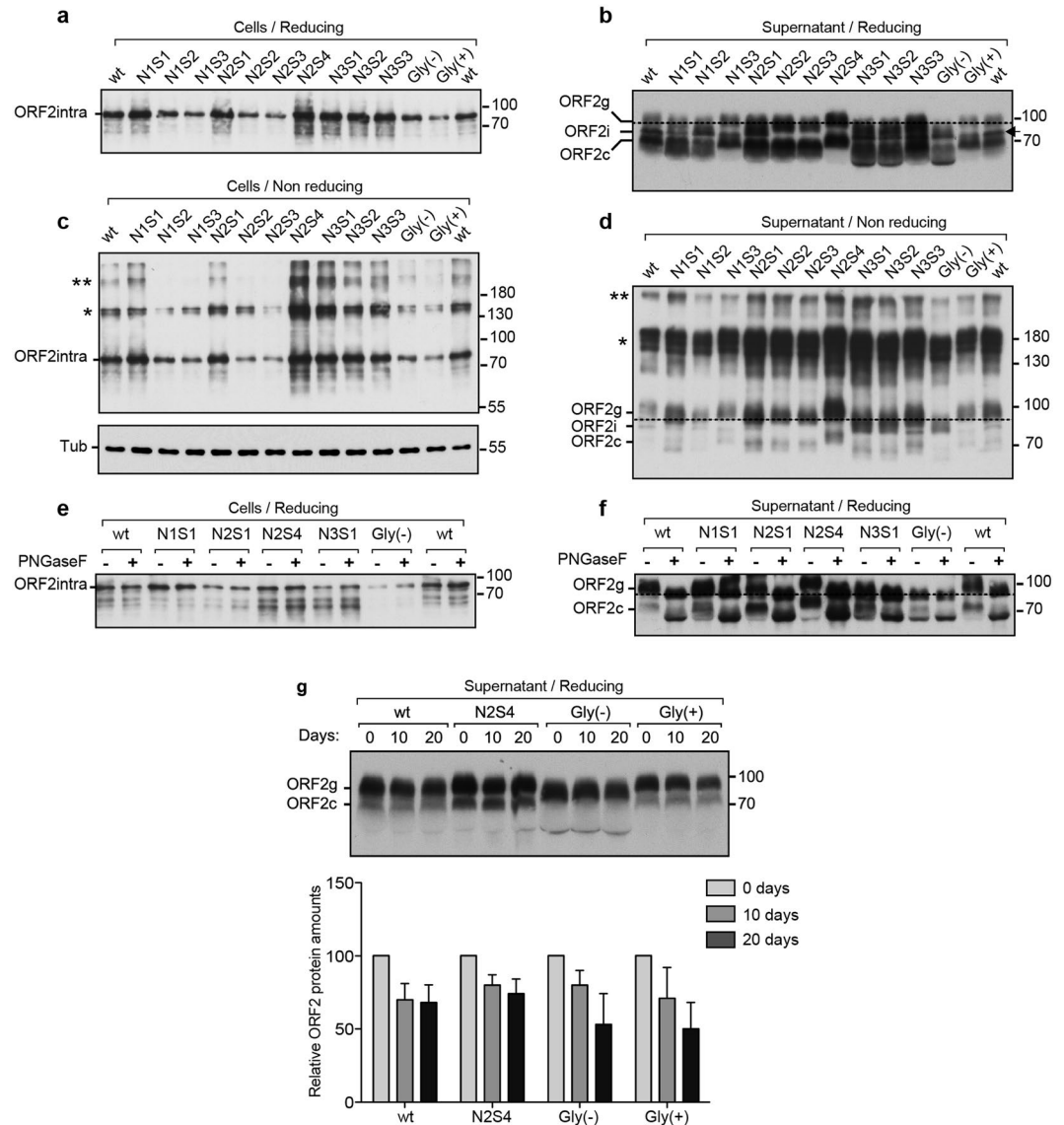


Figure 3. Characterization of wt and mutant ORF2 proteins by western blot (WB). Supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were collected at 10 days post-electroporation, normalized by protein quantification assay, and ORF2 protein was detected by WB using the 1E6 antibody. The representative results of two independent experiments are presented. Detection of ORF2intra protein in cell lysates in reducing conditions (a) and in non-reducing conditions (c). Tubulin (Tub) was also detected to control protein loading. Detection of ORF2 protein in supernatants in reducing conditions (b) and in non-reducing conditions (d). In (b), the arrow indicates the ORF2i protein. Wt and mt PLC3/HEV cell lysates (e) and supernatants (f) were digested (+) or not (-) with Peptide-N-Glycosidase F (PNGaseF). (g) Supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were incubated for indicated times at 37 °C. Relative ORF2 protein amounts were measured by densitometry of shorter exposures. Values were adjusted to 100% for time 0 day. Results are from three independent experiments. In (b), (d) and (f), the dashed line was used to evaluate the shift in migration profile. For clarity and conciseness concerns, blots were cropped. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 3.

Impact of mutations of N-glycosylation sites on the oligomerization and stability of ORF2. We next assessed the impact of mutations of N-glycosylation sites on ORF2 oligomerization by analyzing supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells prepared in non-reducing conditions. Oligomers of ORF2intra and glycosylated ORF2 proteins were clearly detected (Fig. 3c,d, indicated by asterisks). Taking into account the differences in individual protein expression levels (Fig. 3a), no significant difference in the oligomerization levels of ORF2 proteins was observed between wt and mutants.

We next analyzed the significance of ORF2 N-glycosylation for protein stability. For this purpose, supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were kept during 0, 10 and 20 days at 37 °C and analyzed by WB (Fig. 3g). Surprisingly, even after 20 days of incubation, ORF2g and ORF2c proteins were still readily detected, indicating that these proteins are very stable and poorly degraded in culture medium. Quantification by densitometry of

	Theoretical peptide sequences of non N-glycosylated or PNGaseF-deglycosylated ORF2 protein digested with Trypsin (Tryp) or AspN		Number of MSMS spectrum for ORF2g/ORF2c		Normalized total area of peptide peak for ORF2g/ORF2c		N-glycosylation probability	
			Non treated	Treated by PNGaseF	Non treated	Treated by PNGaseF		
Site N1	Tryp	Non N-glycosylated	DVDSRGAIRRQY ^N LSTSP ^L TSSVA SGTNLVLYAAPLN ^P LLPLQDGTN THIMATEASNYAQYR	ND ^a	ND	ND	ND	High
		Deglycosylated by PNGaseF ^b	DVDSRGAIRRQY ^D LSTSP ^L TSSVAS GTNLVLYAAPLN ^P LLPLQDGTNT HIMATEASNYAQYR	ND	ND	ND	ND	
	AspN	Non N-glycosylated	DVDSRGAIRRQY ^N LSTSP ^L TSSVAS GTNLVLYAAPLN ^P LLPLQ	ND	ND	ND	ND	
		Deglycosylated by PNGaseF ^c	DVDSRGAIRRQY	ND	2/2	0.0/0.0%	0.5/1.2%	
Site N2	Tryp	Non N-glycosylated	DFALELEFR ^N LTPGNTNT	9/6	9/8	6.8/4.6%	5.7/4.1%	Low
		Deglycosylated by PNGaseF	DFALELEFR ^D LTPGNTNT	ND	ND	ND	ND	
	AspN	Non N-glycosylated	DFALELEFR ^N LTPGNTNTRVS RYTSTAQHRLRRGA	ND	ND	ND	ND	
		Deglycosylated by PNGaseF	DFALELEFR	2/2	6/6	0.1/0.2%	2.4/2.3%	
Site N3	Tryp	Non N-glycosylated	EAGTTRAGYPYNY ^N TTASDQIL IENAAGHR	ND	ND	ND	ND	High
		Deglycosylated by PNGaseF	EAGTTRAGYPYNY ^D TTASDQIL IENAAGHR	ND	13/8	0.1/0.0%	5.6/7.4%	
	AspN	Non N-glycosylated	EAGTTRAGYPYNY ^N TTAS	ND	ND	ND	ND	
		Deglycosylated by PNGaseF	EAGTTRAGYPYNY	ND	2/2	0.0/0.0%	1.1/0.8%	

Table 1. Mass spectrometry analyses of ORF2 N-glycosylation sites. ^aNot detected. ^bUpon PNGaseF treatment, the asparagine (N) residues from which the glycans have been removed are deaminated to aspartic acid (D) residues. ^cDeamination of glycosylated N residues to D residues by PNGaseF treatment generates cleavage sites for AspN.

ORF2 levels in wt and N2S4 supernatants, showed that only 30–35% of proteins were degraded after 20 days. In contrast, 50% of Gly(–) and Gly(+) proteins were degraded after 20 days, indicating that these mutants are less stable in culture medium but in a glycosylation-independent manner.

Mutations of N-glycosylation sites do not modify ORF2 antibody recognition. To determine the impact of mutations of N-glycosylation sites on the anti-ORF2 antibody recognition, ORF2 proteins in cell lysates and supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were immunoprecipitated with different antibodies and analyzed by WB (Fig. 4). We used the linear 1E6 antibody of which the epitope is located at amino acids 434–457, and two conformational antibodies having neutralizing properties (4B2 and 2E2)²⁴. Although some detection differences were observed for several mutants, likely reflecting differences in individual protein expression levels (Fig. 4a, input), mutant ORF2_{intra} proteins were recognized by the three antibodies (Fig. 4a). It has to be noted that some mutants displayed additional ORF2 products that need to be further characterized. The supernatants were standardized according to the ORF2i expression levels and then immunoprecipitated. ORF2g and ORF2c proteins were equally immunoprecipitated by the three antibodies (Fig. 4b). We also quantified levels of secreted ORF2 proteins with the Wantai HEV-antigen ELISA^{Plus} assay that has been recently marketed for HEV diagnosis and that works with monoclonal and polyclonal antibodies. As shown in Fig. 4c, no significant differences were observed in protein detection between wt and mt ORF2 proteins.

We next sought to determine whether mutations of N-glycosylation sites affect recognition by patient antibodies. For this purpose, we used a serum from a patient who had cleared HEV infection (serum S30) and a serum from a non-infected patient (serum N6). Sera were incubated with protein A-agarose beads and then with ORF2g/ORF2c proteins or PBS (CTL) (Fig. 4d). ORF2g/ORF2c proteins were isolated on iodixanol cushions, as previously described²⁰. ORF2g and ORF2c proteins were specifically immunoprecipitated by immunoglobulins raised in the S30 patient serum whereas no proteins were precipitated by the N6 negative serum. As shown in Fig. 4e, wt and mt ORF2g/ORF2c proteins were all recognized by antibodies from the S30 patient serum.

Taken together, these results demonstrated that mutations of ORF2 N-glycosylation sites do not modify the recognition of ORF2 protein by linear, conformational and patient antibodies. Thus, these mutations induced no major changes in ORF2 protein folding and N-glycosylation of ORF2 protein did not play a major role in antibody recognition. Importantly, our results showed that ORF2g and ORF2c proteins were highly recognized by patient antibodies.

The ORF2 protein translocates into the nucleus of infected cells independently of its N-glycosylation status. Since a recent study²² and our confocal microscopy analyses (Fig. 2) suggested that, in addition to its cytoplasmic localization, the ORF2 protein might also be translocated into the nucleus of infected cells, we next further characterized this process by WB and immunofluorescence. We prepared cytoplasmic and nuclear extracts from wt and mt PLC3/HEV cells. ORF2 proteins were detected by WB. Cytoplasmic-specific anti-tubulin and nuclear envelope-specific anti-Lamin-B1 antibodies were used to control the quality of extractions. As expected, the ORF2_{intra}

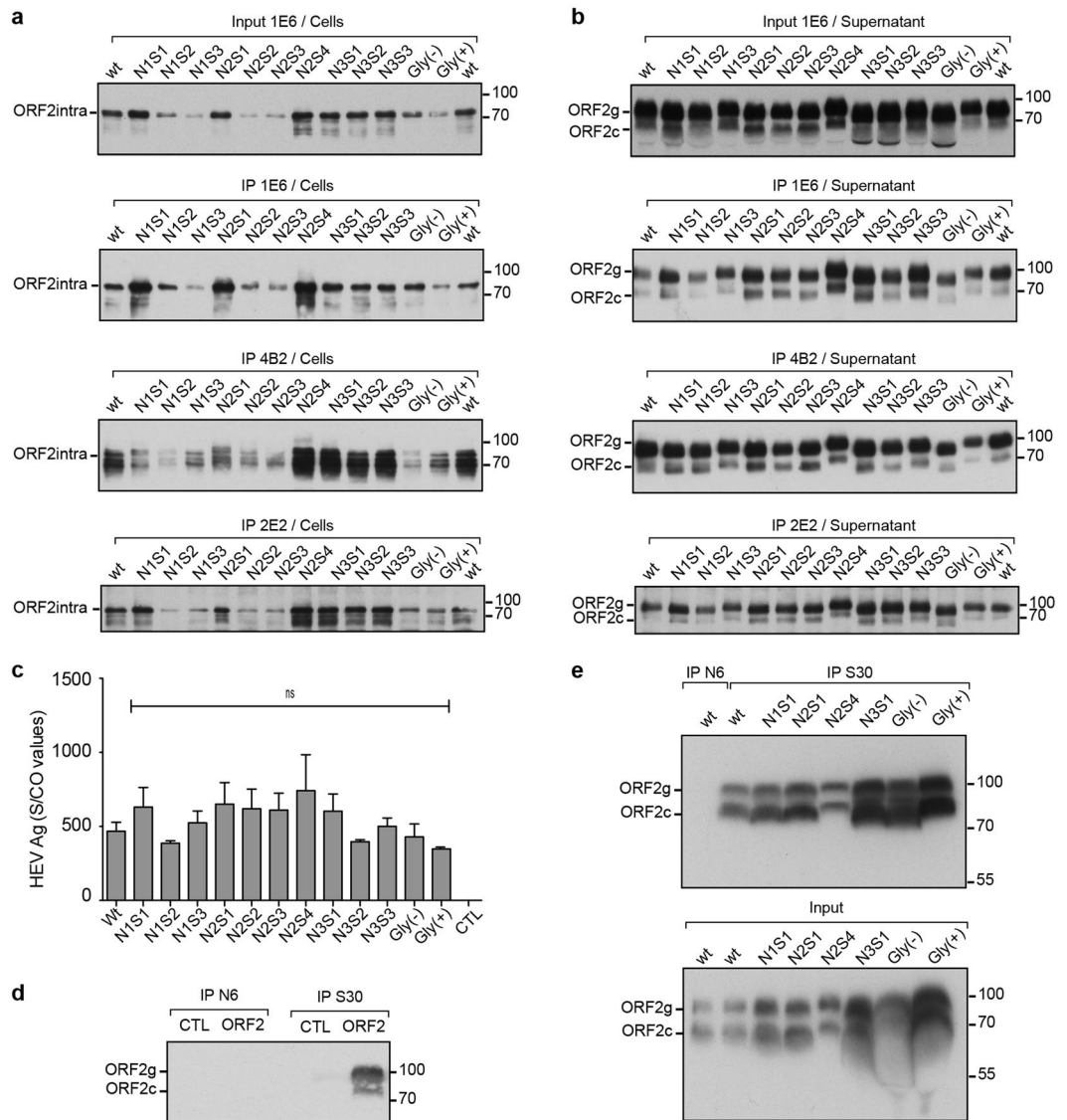


Figure 4. Impact of mutations of ORF2 protein N-glycosylation sites on antibody recognition. **(a,b)** Supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were collected at 10 days post-electroporation. Proteins in cell lysates and supernatants were normalized by protein quantification assay on cell lysates. ORF2 proteins were immunoprecipitated (IP) by using the 1E6 linear anti-ORF2 antibody or the 4B2 and 2E2 conformational anti-ORF2 antibodies, as indicated. Input of ORF2 proteins used for immunoprecipitations are shown. ORF2 proteins were detected by WB using 1E6 antibody. **(c)** Detection of HEV-Ag in supernatants using the Wantai HEV-Ag ELISA^{Plus} kit. Results are presented as signal to cut-off ratios (S/CO). **(d)** A serum from a non-infected patient (N6) and a serum from a patient who has cleared his HEV infection (S30) were both incubated with protein A-agarose beads and then with ORF2g/ORF2c proteins (ORF2) or PBS (CTL). ORF2 proteins were next detected by WB using 1E6 antibody. ORF2g/ORF2c proteins were isolated on iodixanol cushions **(e)** (Top) ORF2g/c proteins isolated on iodixanol cushions from supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were immunoprecipitated with S30-immobilized beads. ORF2g/c proteins from supernatant of wt PLC3/HEV cells immunoprecipitated with N6-immobilized beads were used as a control. (Bottom) Input of ORF2g/ORF2c proteins used for immunoprecipitations are shown. Representative results of two independent experiments are shown. For clarity and conciseness concerns, blots were cropped. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 4.

protein was detected in cytoplasmic extracts of wt and mt PLC3/HEV cells (Fig. 5a). Interestingly, wt and mutant ORF2 proteins were also detected in nuclear extracts (Fig. 5b). We named this protein ORF2ni for nuclear ORF2intra. Among mutants of N-glycosylation, some differences in the ORF2ni detection (Fig. 5b) and on the ORF2ni/ORF2intra ratio (Fig. 5c) were observed. N1S3, N2S2, N2S3, Gly(-) and Gly(+) mutants showed reduced ORF2ni amounts whereas nuclear translocation was likely not affected for the other mutants, as compared to the wt protein. In order to quantify the effect of mutations of N-glycosylation sites on nuclear translocation, nuclear fluorescence intensity of ORF2 protein was measured on 50 cells for each mutant with the ImageJ software. A significant reduction of nuclear translocation was

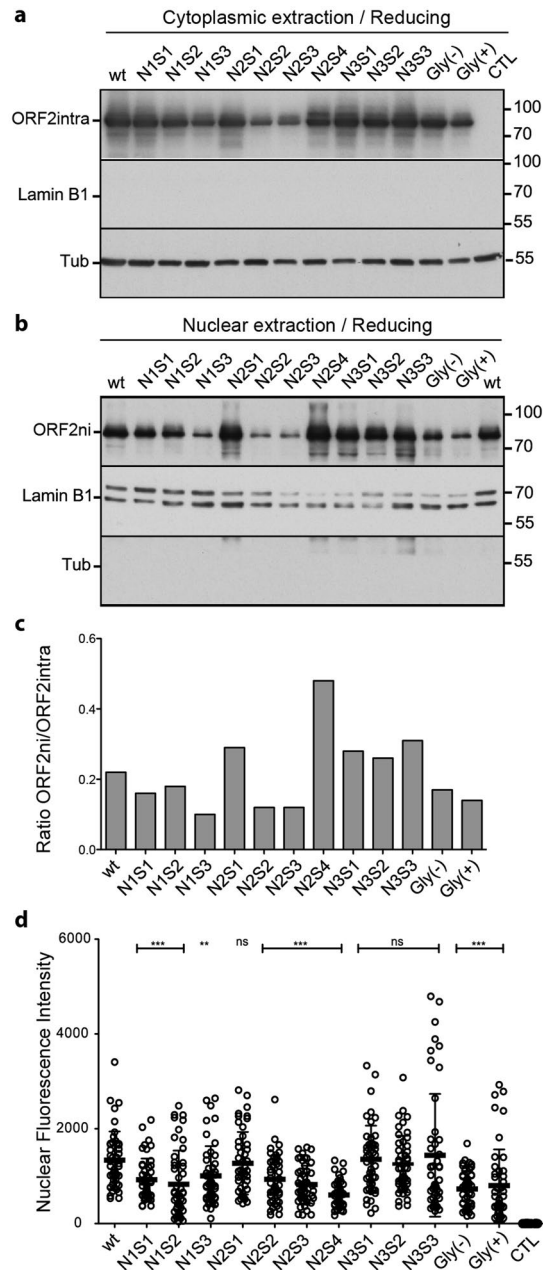


Figure 5. Impact of mutations of N-glycosylation sites on ORF2 protein nuclear localization. Cytoplasmic (a) and nuclear (b) extracts from wt and mt PLC3/HEV cells were prepared with the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction Kit. ORF2intra and ORF2ni (nuclear ORF2intra) proteins were detected by WB. LaminB1 and tubulin (Tub) were also detected to evaluate the quality of extractions. Representative results of two independent experiments are shown. (c) Intensity of ORF2 bands in cytoplasmic and nuclear fractionations were quantified by densitometry from shorter exposures of blots. ORF2ni/ORF2intra ratios were next calculated. It has to be noted that since four times more of nuclear extracts were loaded on gels, as compared to cytosolic extracts, ORF2ni/ORF2intra ratios were divided by four. (d) wt and mt PLC3/HEV cells were fixed at 3 d.p.e., and ORF2 protein was stained by using the 1E6 antibody. Cells (n = 50) were analysed by LSM 800 confocal laser-scanning (Zeiss) using x40 oil immersion lens. The nuclear fluorescence intensity of ORF2 protein was determined using the ImageJ software. For clarity and conciseness concerns, blots were cropped. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 5.

observed for all mutants excepted for the N2S1 mutant and the three mutants of the N3 site (Fig. 5d). However, we did not observe any correlation between the status of N-glycosylation of ORF2 and its nuclear localization.

Altogether, our results demonstrated that, during HEV lifecycle, ORF2 capsid protein was translocated into the nucleus of infected cells. This nuclear localization was not closely related to the ORF2 N-glycosylation.

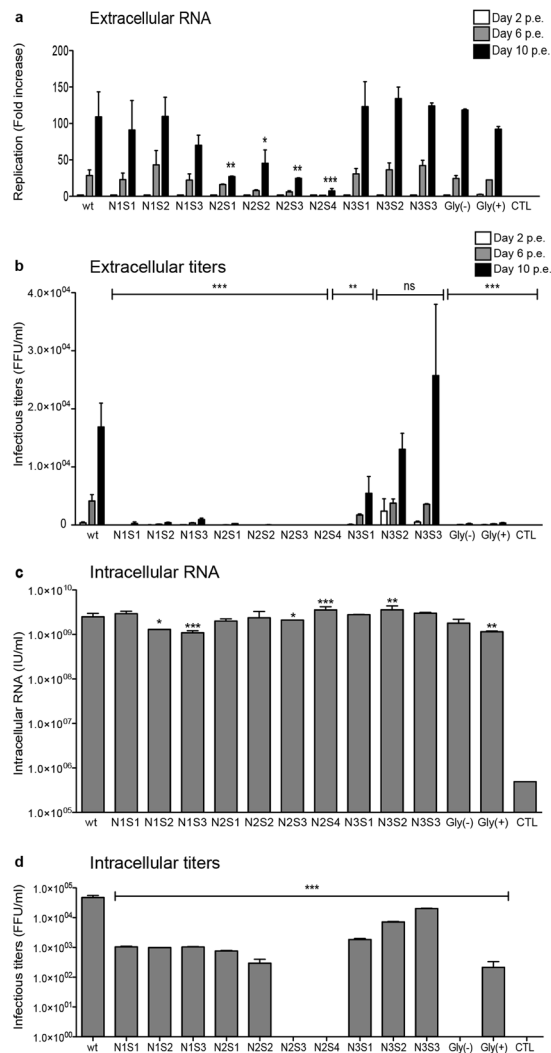


Figure 6. Impact of mutations of ORF2 protein N-glycosylation sites on viral assembly and infectivity. (a) The level of HEV RNAs in the supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells collected at 2, 6 and 10 d.p.e. was measured by RT-qPCR (IU/ml). For each condition, values are presented as fold increase compared to RNA level measured at 2 d.p.e. Presented data are the mean of two independent experiments performed in duplicate. (b) Naïve Huh.7.5 cells were infected with serial dilutions of supernatants collected at 2, 6 and 10 d.p.e. At 3 days post-infection, cells were fixed and ORF2 protein was detected by immunofluorescence. Focus forming Units (FFU) were determined and the results are presented as FFU/mL. Presented data are the mean of two independent experiments performed in triplicate. (c) Intracellular viral particles were extracted at 10 d.p.e. and the level of HEV RNAs was measured by RT-qPCR (IU/ml). Presented data are the mean of two independent experiments performed in duplicate. (d) An aliquot of intracellular viral particles was used to infect naïve Huh. 7.5 cells and the expression of ORF2 protein was analyzed by immunofluorescence. The Focus forming Unit (FFU) was determined and the results are presented as FFU/mL. The shown data are the mean of two independent experiments performed in triplicate.

Impact of mutations of ORF2 N-glycosylation sites on viral assembly and infectivity. Next, we analyzed the impact of mutations of ORF2 N-glycosylation sites on viral RNA production and infectivity. Supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were collected at 2, 6 and 10 d.p.e. and then processed for RNA level quantification by RT-qPCR (Fig. 6a) and determination of extracellular infectious titers (Fig. 6b). To specifically quantify capsid-protected RNA genomes, extractions and quantifications of extracellular RNA were performed after treatment of supernatants with RNase. Quantification of extracellular RNA genomes and calculation of fold increase between 2, 6 and 10 d.p.e., which were in line with HEV RNA replication and secretion of capsid-protected RNA genomes (HEV particles), showed that mutants of the N2 site led to a reduction of RNA replication and/or secretion/assembly of capsid-protected RNA genomes (Fig. 6a). In contrast, extracellular RNA levels of N1, N3 and double mutants were similar to wt, indicating that these mutations did not affect HEV RNA replication and secretion of capsid-protected RNA genomes. To determine viral infectivity, Huh-7.5 cells were infected with serial dilutions of supernatants and processed for ORF2 staining at 3 days post-infection. Viral titers were determined by quantifying focus forming units (FFU/mL) (Fig. 6b). Supernatants of N2 mutants were not

infectious. Supernatants of N1 and double mutants displayed reduced infectivity. Although the N3S1 mutant was slightly less infectious, other mutants of the N3 site displayed infectious titers similar to wt strain. These results indicated that mutations of the N1 site inhibited infectivity of viral particles whereas mutations of the N3 site had no major impact on the biogenesis of infectious HEV particles.

In order to precisely define the impact of mutations on HEV RNA replication, we quantified the levels of intracellular viral RNA genomes. Although small significant differences were observed among mutants, intracellular RNA replication was globally not affected by the mutations of ORF2 N-glycosylation sites (Fig. 6c). Finally, we determined the infectivity of intracellular particles produced in wt and mt PLC3/HEV cells (Fig. 6d). All the N1 and N2 mutants showed a reduced infectivity of intracellular particles, indicating that the N1 and N2 mutations were lethal for viral infectivity. The intracellular titers of the N3 mutants were also reduced, as compared to wt strain.

Taken together, our results showed that (i) mutations of N1 glycosylation site inhibited infectivity of HEV particles, (ii) mutations of N2 glycosylation site inhibited infectivity and assembly/secretion of infectious particles, and (iii) mutations of N3 glycosylation site had little or no effect on infectivity of secreted HEV particles. Importantly, whatever the introduced mutation within the same site (affecting or not N-glycosylation) the same phenotype was observed indicating that N-glycosylation of ORF2 protein did not play any role in the assembly and infectivity of HEV particles.

Impact of mutations of ORF2 protein N-glycosylation sites on particle density. To further characterize our mutants, we produced large amounts of infectious supernatants by culturing wt and mt PLC3/HEV cells during 12 days. Supernatants were pooled, concentrated 100 times, and fractionated on an iodixanol gradient. ORF2 protein expression, density and RNA levels were determined for each fraction (Fig. 7a–g). As previously, only some representative mutants were analyzed (N1S1, N2S1, N2S4, N3S1, Gly(–) and Gly(+)). ORF2g and ORF2c proteins were mainly detected in fractions 3, 4 and 5 whereas the ORF2i protein was mainly observed (Fig. 7, asterisks) in fractions 5 or 6 of wt (Fig. 7a, lane 6) and mutants that assembled particles: N1S1 (Fig. 7b, lane 5), N3S1 (Fig. 7e, lane 6), Gly(–) (Fig. 7f, lane 5) and Gly(+) (Fig. 7g, lane 5). In accordance with our previous results (Fig. 6), N2S1 and N2S4 mutants displayed no ORF2i and no extracellular RNAs confirming that the mutations of N2 glycosylation site inhibited assembly of HEV particles. In wt and N3S1 gradients, only one major peak of RNA was detected in fraction 6 with a density of 1.11 g/mL. In contrast, N1S1, Gly(–) and Gly(+) displayed a RNA peak in fraction 4 or 5 with a density of 1.10 g/mL, indicating that non-infectious mutants might display a slightly lower density, as compared to infectious particles.

Discussion

We recently demonstrated that HEV secretes three different forms of its ORF2 capsid protein during its life-cycle²⁰. The ORF2i form (~80 kDa) is the component of infectious particles that is neither N-glycosylated or nor O-glycosylated. In contrast, the ORF2g (~90 kDa) and ORF2c (~75 kDa) forms are N-glycosylated, O-glycosylated and sialylated. They are massively secreted but are not associated with infectious material. Recently, Yin *et al.* confirmed our observations that ORF2g and ORF2i forms (named “ORF2^g” and “ORF2^c” in their study) are produced during HEV lifecycle and they showed that these proteins might be translated from different start codons²¹. However, they did not identify the ORF2c form, likely due to their lower protein expression level, as compared to our system. In the present study, we identified the precise N-terminal sequence of the ORF2c form (S¹⁰²). It is likely a cleavage product of the ORF2g protein and the presence of RRR residues upstream of the ORF2c N-terminus suggests that a furin-like protease might be involved.

Importantly, ORF2g/c proteins do not form particulate material but they are the major viral antigens present in the serum of HEV-infected patients. HEV may produce ORF2g/c proteins as immunological bait. Indeed, it has been very recently shown that secreted ORF2 might inhibit antibody-mediated neutralization²¹. In addition, since these proteins are likely extremely stable in infected patients²⁵, they might represent markers of the evolution of hepatitis E infection. It is therefore essential to determine the molecular and cellular mechanisms leading to the biogenesis of the different forms of ORF2 protein.

By over-expression of recombinant gt1 ORF2 protein, it has been previously shown that this protein is an 88 kDa glycoprotein which is expressed intracellularly as well as on cell surface and has the potential to form non covalent homodimers¹⁶. It has also been suggested that Asn-310 (N2 site) is the major but not the only site of N-glycan addition¹⁵. The impact of mutations within highly conserved glycosylation sites of the gt1 Sar55 infectious full-length genome has also been studied¹⁴. However, in this study the authors only analyzed intracellular ORF2 proteins, which are non-glycosylated proteins^{20,21}. They demonstrated that mutation of the first two glycosylation sites prevented virion assembly whereas mutation of the third site affected infectivity of particles. Moreover, they showed that mutations of N-glycosylation sites were lethal due to their effect on protein structure rather than the absence of glycosylation¹⁴. More recently, a triple mutant of N-glycosylation sites confirmed the presence of N-glycans on secreted ORF2 protein²¹. In our study, by using site-directed mutagenesis of the three N-glycosylation sites, PNGaseF treatment and mass spectrometry analyses of ORF2 protein expressed from our efficient gt3 p6 full-length strain-based cell culture system, we robustly demonstrated that the ORF2 protein is N-glycosylated on N1 (¹³⁷NLS) and N3 (⁵⁶²NTT) sites but not on the N2 (³¹⁰NLT) site. The absence of N-glycan addition on N2 site is likely due to the presence of a Proline residue immediately downstream of the ³¹⁰NLT sequon, which has a deleterious effect on N-glycosylation²⁶. In accordance with this claim, we showed that the P313A substitution (N2S4 mutant) induced additional ORF2 N-glycosylation. Interestingly, alignment of 293 sequences from gt1 to gt4 HEV strains showed that the P³¹³ is highly conserved²⁷, suggesting that the absence of N-glycans on ORF2 N2 site is likely a conserved feature among HEV genotypes. Hence, our study is the first exhaustive report on ORF2 N-glycosylation in the physiological context of an infectious clone.

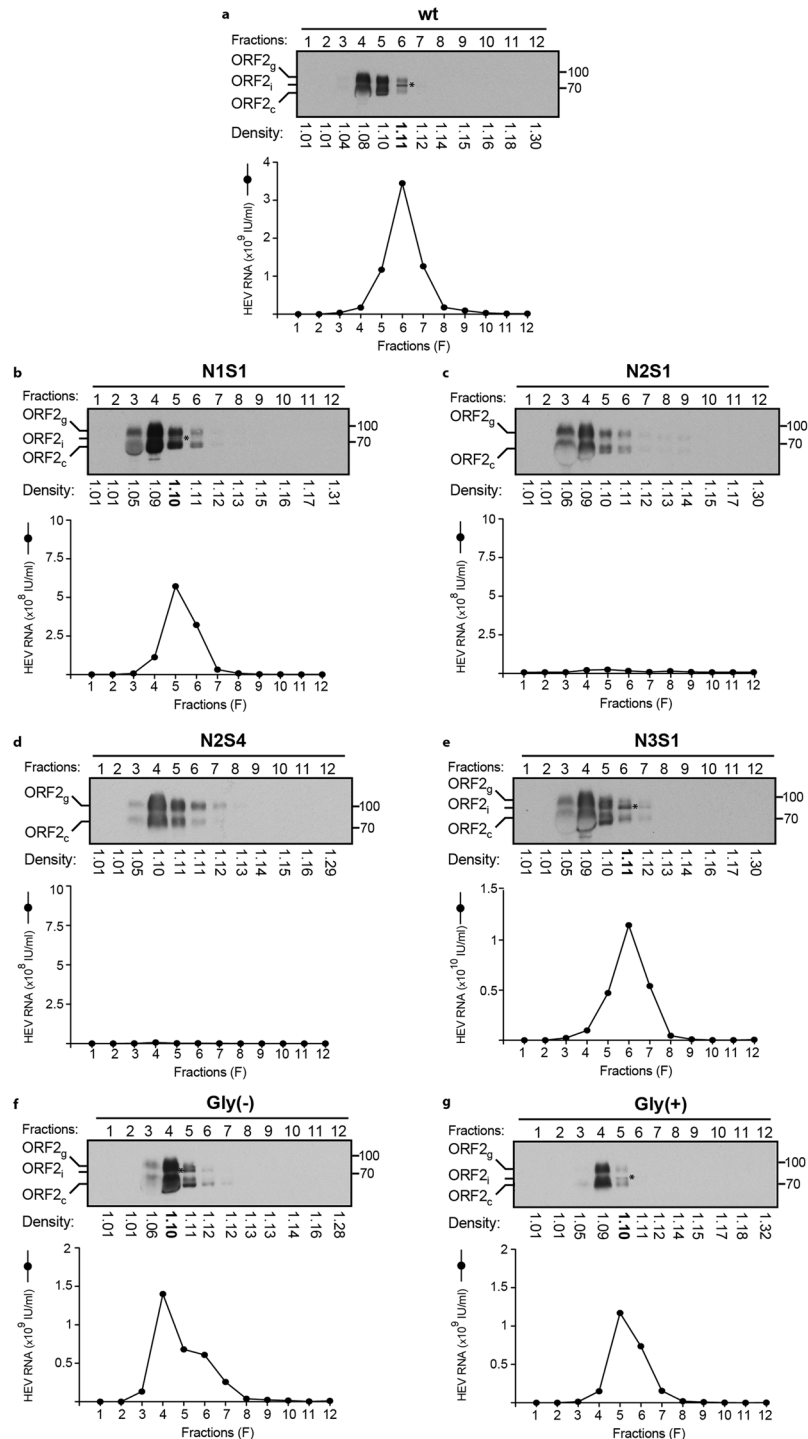


Figure 7. Impact of mutations of ORF2 protein N-glycosylation sites on particle density. Concentrated wt and mt PLC3/HEV cell supernatants were layered on an iodixanol gradient and ultracentrifuged. Twelve fractions were collected and their densities were measured. ORF2 expression was analyzed by WB using 1E6 antibody. Asterisks indicate the ORF2_i protein. HEV RNA levels in each fraction were quantified by RT-qPCR. For clarity and conciseness concerns, blots were cropped. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 6.

We performed an extensive characterization of ORF2 mutants in which the three potential N-glycosylation sites were mutated individually or in combination. Whatever the introduced mutations, we observed no significant differences in expression, secretion, oligomerization, stability and recognition of the secreted ORF2_g and ORF2_c proteins by several antibodies. However, we cannot exclude that mutations affect recognition by some other neutralizing antibodies²¹. We showed that ORF2_g and ORF2_c proteins were very stable and poorly degraded in cell culture, which is consistent with previous *in vivo* observations²⁵. Importantly, we showed that

ORF2g and ORF2c proteins were the main antigens recognized by antibodies from a patient who had cleared his HEV infection, indicating that these secreted forms are the main targets of the humoral response during HEV infection.

The level of ORF2intra protein expression and its recognition by MAbs were not affected by mutations of N-glycosylation sites, which is in line with the fact that this protein is not glycosylated^{20,21}. However, we showed that ORF2intra proteins displayed both cytoplasmic and nuclear localization, as recently observed in patient liver biopsies²². We demonstrated that the ORF2intra protein translocated into the nucleus of HEV producing cells (ORF2ni) independently of its status of N-glycosylation. Altogether, our results demonstrate that, during HEV lifecycle, the ORF2 capsid protein is translocated into the cell nucleus to presumably control certain cellular functions to promote viral replication and/or alter the antiviral response of the infected cell.

We further analyzed the impact of mutations of ORF2 protein N-glycosylation sites on viral RNA production and particle infectivity where none of the mutations had an effect on viral genome replication. In contrast, mutations of N1 glycosylation site inhibited infectivity of particles, mutations of N2 glycosylation site abolished particle assembly and mutations of N3 glycosylation site had little or no effect on assembly of infectious particles. In accordance with Graff *et al.*¹⁴, whatever the introduced mutation, affecting or not N-glycosylation, the same effects were observed, indicating that N-glycosylation of ORF2 protein does not play any role in assembly of infectious HEV particles. Mutations likely induce modifications in ORF2i protein domains involved in particle assembly. Interestingly, we observed that non-infectious particles were characterized by a slightly lower density, as compared to infectious particles, which might reflect subtle differences in ORF2 assembly leading to non-infectious particles.

It has been suggested that cytoplasmic localization of the ORF2 protein would depend on its ability to be retrotranslocated from the ER by a glycosylation-dependent process²⁸. However, the Gly(−) mutant produced ORF2intra protein levels similar to that of the wt ORF2, indicating that ORF2intra proteins are likely not generated from a glycosylation-dependent retrotranslocation process.

Our results demonstrate that ORF2 N-glycosylation is not essential in the HEV lifecycle. However, the ORF2g/c proteins are also modified by O-glycosylation and sialic acids, as recently demonstrated^{20,21}. Further studies are now necessary to identify the significance of these modifications in the functionality of ORF2g/c proteins in HEV infection.

In summary, this is the first report on ORF2 N-glycosylation in the physiological context of a gt3 infectious clone, which is the most prevalent genotype in industrialized countries. Our data offer robust and new important findings on the different forms of the ORF2 capsid protein that are likely produced from different pathways²⁰ (i) a major non-productive pathway in which ORF2 proteins are addressed to the secretion route where they are glycosylated, matured and massively secreted, and (ii) a productive pathway in which cytosolic ORF2 proteins are delivered to the virion assembly sites. Finally, we identified a nuclear form of ORF2intra (ORF2ni) suggesting that, during HEV lifecycle, a fine balance of ORF2 partitioning likely occurs between cytosolic, nuclear and reticular pathways.

Methods

Chemicals and cell cultures. PLC3²⁰ and Huh-7.5²⁹ cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum and 1% of Non-Essential amino acids (Life Technologies) at 37 °C. Transfected PLC3 cells were maintained at 32 °C in a medium containing DMEM/M199 (1 v:1 v), 1 mg/ml of lipid-rich albumin (Albumax ITM), 1% of Non-Essential amino acids and 1% of pyruvate sodium (Life Technologies).

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 as a template¹⁹. The mutants of the ORF2 N-glycosylation sites were generated by site directed mutagenesis. Individual mutations were introduced by sequential PCR steps, as described previously³⁰, using the Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, NEB), then digestions with restriction enzymes and ligation were performed. The double mutants of N-glycosylation sites were generated by exchanging the mutant fragments from single mutants using specific restriction sites. All the mutations were verified by DNA sequencing.

To prepare genomic HEV RNAs (capped RNA), the wild type (wt) and mutant (mt) pBlueScript SK(+) HEV plasmids were linearized at their 3' end with the MluI restriction enzyme (NEB) and transcribed with the mMES-SAGE mMACHINE[®] kit (Ambion). Capped RNAs were next delivered to PLC3 cells by electroporation using a Gene Pulser XcellTM apparatus (Bio-Rad)²⁰.

Patient samples. Patient samples were collected in France between 2014 and 2016. Samples were obtained only *via* standard viral diagnostics following a physician's order (no supplemental or modified sampling). Data were analyzed anonymously. The French Public Health Law (CSP Art L 1121-1.1) does not require written informed consent from patients for such a protocol.

Kinetic experiments and virus production. PLC3 cells were electroporated with wt and mt HEV RNAs (20 µg/3 × 10⁶ cells). For kinetics experiments, supernatants were harvested 2, 6 and 10 days post-electroporation (d.p.e) and then used for viral titers, RNAs quantification and WB analysis. Transfected cells were lysed 10 d.p.e. in buffer containing 10 mM TrisHCl (pH 7), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche). Supernatants and cell lysates were stored at −80 °C until analysis.

Antibodies. Three mouse anti-HEV ORF2 monoclonal antibodies (MAb) were used: (i) the linear 1E6 MAb (antibody registry #AB-827236, Millipore), (ii) the conformational 4B2 MAb (antibody registry #AB-571018, Millipore) and (iii) the conformational 2E2 MAb (antibody registry #AB-571017, Millipore). Mouse anti- β tubulin (antibody registry #AB-609915) was from Sigma and rabbit anti-Lamin B1 (antibody registry #AB-443298) antibody was from Abcam. Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch.

Indirect immunofluorescence. PLC3 cells electroporated with wt and mt HEV RNAs (wt and mt PLC3/HEV cells) were grown on coverslips in 24-well plates and fixed 3 d.p.e. with 3% of Paraformaldehyde (PFA). After 20 minutes (min), cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized for 5 min with cold methanol and then with 0.5% Triton X-100 for 30 min. Cells were incubated in PBS containing 10% goat serum for 30 min at room temperature (RT) and stained with the 1E6 MAb for 30 min at RT followed by a Cy3-conjugated goat anti-mouse antibody for 20 min at RT. The nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). After 2 washes with PBS, coverslips were mounted with Mowiol 4–88 (Calbiochem) on glass slides and analyzed with a LSM 800 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a x40/1.4 numerical aperture oil immersion lens.

Quantification of the ORF2 protein nuclear fluorescence. The method was adapted from McCloy *et al.*³¹. Briefly, the ORF2 protein nuclear fluorescence was determined using ImageJ software (version 1.51, NIH). The regions of interest (ROI) were drawn around the nuclei on the immunofluorescence image from PLC3/HEV wt and mt using imageJ ROI tools. Area, integrated density and mean gray values were measured. Then, corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated by the following formula: CTCF = integrated density – (area of selected electroporated cells \times mean of background fluorescence around the cells). The exact nuclear fluorescence was = CTCF – the mean of the integrated density of non-infected cells.

Western blotting analyses. Western blotting analyses were performed as described previously³². Briefly, supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were heated for 20 min at 80 °C in the presence of Laemmli buffer (reducing or non-reducing). Samples were then separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham). The targeted proteins were detected with specific antibodies and corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies. The detection of proteins was done by chemiluminescence analysis (ECL, Amersham).

PNGase-F treatment. Supernatants and lysates of wt and mt PLC3/HEV cells were denatured for 10 min at 95 °C in glycoprotein denaturing buffer (NEB). Digestions with Peptide-N-Glycosidase F (PNGaseF, NEB) were carried out for 4 h at 37 °C in the presence of 1% NP40 and the buffer provided by the manufacturer (NEB). Samples prepared in the same conditions but without glycosidase were used as controls.

Nuclear and cytoplasmic extractions. Confluent T75 flasks of wt and mt PLC3/HEV cells (6×10^6 cells) were harvested 12 d.p.e. with trypsin-EDTA. Cells were centrifuged at 4000 rpm for 5 min and washed thrice with PBS. Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction Kit (Thermo scientific) following the manufacturer's recommendations.

Immunoprecipitations. Polyclonal rabbit anti-mouse antibody (DAKO) was bound to protein A-agarose beads and incubated overnight with mouse anti-ORF2 MAb (1E6, 4B2 or 2E2). Beads were washed thrice with PBS and then incubated for 2 hours at room temperature with supernatants or lysates of wt and mt PLC3/HEV cells. Beads were washed six times with PBS 0.5% NP40 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.

Quantification of the ORF2 protein levels by ELISA. The supernatant of wt and mt PLC3/HEV cells and non-transfected PLC3 cells (CTL) were diluted in PBS (1:250 and 1:500). HEV ORF2 Ag levels were measured with the Wantai HEV-Ag ELISA^{Plus} kit (Wantai Biological Pharmacy Enterprise), as recommended by the manufacturer.

Intracellular viral particles and RNAs. The procedure was adapted from Emerson *et al.*³³. Briefly, confluent T25 flasks of wt and mt PLC3/HEV cells were trypsinized and cells were centrifuged for 10 min at 1500 rpm. Cells were washed thrice with PBS. Intracellular viral particles were extracted by resuspending cells in 1 ml of sterile MilliQ water at room temperature. Cells were vortexed vigorously for 20 min and then 110 μ l of sterile 10X PBS were added. Samples were clarified by centrifugation 2 min at 14000 rpm. The supernatants containing intracellular particles and RNAs were collected and stored at –80 °C until analysis.

HEV RNAs extraction and quantification. Supernatants collected at 2, 6 and 10 d.p.e and intracellular viral particles produced in wt and mt PLC3/HEV cells were submitted to viral RNAs extraction. HEV RNA levels were quantified by RT-qPCR, as described previously^{34,35}.

Infectious titers. Huh 7.5 cells (3×10^3) seeded in 96-well plates the day before were infected with serial dilutions of supernatants or intracellular viral particles from wt and mt PLC3/HEV cells. Three days post-infection, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence. Cells labeled with anti-ORF2 antibody 1E6 were counted as infected cells. The number of infected cells was determined for each dilution and used to define the infectious titers in focus forming unit (FFU)/ml.

Mass spectrometry. N-terminus identification of the ORF2c protein was performed as in Montpellier *et al.*²⁰. For N-glycans analyses, ORF2g/ORF2c proteins were immunoprecipitated with the 4B2 anti-ORF2 antibody and denatured for 10 min at 95 °C in glycoprotein denaturing buffer (NEB). Proteins were treated or not with

PNGaseF²⁰, as described above, and resolved by 10% SDS-PAGE. Colloidal blue stained bands corresponding to ORF2g and ORF2c proteins in WB were cut into two slices for in-gel digestion with trypsin or AspN. NanoLC-MSMS analyses of the protein digests were performed as described in Montpellier *et al.*²⁰

MS/MS data was interpreted using search engine Mascot (version 2.4.0, Matrix Science) with a tolerance on mass measurement of 10 ppm for precursor and 0.02 Da for fragment ions, against a composite targetdecoy database (40584 total entries) built with the sequences of ORF2 (H9E9C9_HEV) and the PNGaseF-deglycosylated ORF2 protein in which the three N-glycosylated sites were replaced by Asp(D) residues, fused with a Swissprot homo sapiens database (TaxID = 9606, 20 May 2016, 20209 entries) and a list of classical contaminants (119 entries). Carbamidomethylation of cysteine residues, oxidation of methionine residues and protein N-terminal acetylation were searched as variable modifications. Up to three trypsin or Asp-N missed cleavage were allowed. Semi-specific cleavage was also authorized. Spectral counting was performed without MS score filtering. Peptides quantitation of ORF2 and PNGaseF-deglycosylated ORF2 protein was performed on MS1 level using Skyline (ver. 3.7)³⁶. After automated peak picking and retention time alignment of Skyline, a manual correction of wrong peak boundaries was performed and normalized total areas of peptide peaks were exported.

Density gradients. Density gradients on supernatants of wt and mt PLC3/HEV cells were performed as described in Montpellier *et al.*²⁰.

References

1. Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J. & Gouttenoire, J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of Hepatology* **65**, 200–212 (2016).
2. Perez-Gracia, M. T., Garcia, M., Suay, B. & Mateos-Lindemann, M. L. Current Knowledge on Hepatitis E. *JCTH* **3**, 117–126 (2015).
3. Kamar, N. *et al.* Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **3**, 17086 (2017).
4. Wang, S. *et al.* Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. *Virus Res.* **176**, 101–106 (2013).
5. Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A. & Pavio, N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses* **8**, 270 (2016).
6. Krzowska-Firych, J., Lucas, C., Lucas, G. & Tomasiewicz, K. Hepatitis E – A new era in understanding. *Ann Agric Environ Med* **1–5** <https://doi.org/10.26444/aaem/75142> (2017).
7. Takahashi, M. *et al.* 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 (2010).
8. Takahashi, M. *et al.* Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.* **153**, 1703–1713 (2008).
9. Qi, Y. *et al.* Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLoS ONE* **10**, e0132503 (2015).
10. Tam, A. W. *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**, 120–131 (1991).
11. Koonin, E. V. *et al.* Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8259–8263 (1992).
12. Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R. E. & Ploss, A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 96–110 (2018).
13. Xu, M., Behloul, N., Wen, J., Zhang, J. & Meng, J. Role of asparagine at position 562 in dimerization and immunogenicity of the hepatitis E virus capsid protein. *Infect. Genet. Evol.* **37**, 99–107 (2016).
14. Graff, J. *et al.* Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol* **82**, 1185–1194 (2008).
15. Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K. & Jameel, S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* **73**, 4074–4082 (1999).
16. Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M. H. & Panda, S. K. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* **70**, 207–216 (1996).
17. Torresi, J., Li, F., Locarnini, S. A. & Anderson, D. A. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* **80**(Pt 5), 1185–1188 (1999).
18. Jiménez de Oya, N. *et al.* Characterization of hepatitis E virus recombinant ORF2 proteins expressed by vaccinia viruses. *J Virol* **86**, 7880–7886 (2012).
19. Shukla, P. *et al.* Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol* **86**, 5697–5707 (2012).
20. Montpellier, C. *et al.* Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* **154**, 211–223.e8 (2018).
21. Yin, X. *et al.* Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **3**, 201721345–6 (2018).
22. Lenggenhager, D. *et al.* Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *Journal of Hepatology* **67**, 471–479 (2017).
23. Gavel, Y. & Heijne, von, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**, 433–442 (1990).
24. Riddell, M. A., Li, F. & Anderson, D. A. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J Virol* **74**, 8011–8017 (2000).
25. Behrendt, P. *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. *Journal of Infectious Diseases* **214**, 361–368 (2016).
26. Bause, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* **209**, 331–336 (1983).
27. Zhang, S. *et al.* Conservation and variation of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein. *Gene* **675**, 157–164 (2018).
28. Surjit, M., Jameel, S. & Lal, S. K. Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **81**, 3339–3345 (2007).
29. Blight, K. J., Mckeating, J. A. & Rice, C. M. Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **76**, 13001–13014 (2002).
30. Goffard, A. *et al.* Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **79**, 8400–8409 (2005).
31. McCloy, R. A. *et al.* Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **13**, 1400–1412 (2014).
32. Haddad, J. G. *et al.* Identification of Novel Functions for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *J Virol* **91** (2017).

33. Emerson, S. U., Nguyen, H., Torian, U. & Purcell, R. H. ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Is Not Required for Replication, Virion Assembly, or Infection of Hepatoma Cells. *In Vitro. J Virol* **80**, 10457–10464 (2006).
34. Sayed, I. M. *et al.* Antiviral Research. *Antiviral Research* **141**, 150–154 (2017).
35. Sayed, I. M. *et al.* Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* **66**, 920–929 (2017).
36. MacLean, B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968 (2010).

Acknowledgements

This work was supported by the French “Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales” (ANRS). M.A. was supported by a fellowship from the ANRS and the University of Lille/Pharmacy college (A. Goffard). I.M.S. was supported by PhD-grants from Ghent University and the Egyptian Government. P.M. was supported by an ‘Excellence of Science’ grant of the Research Foundation – Flanders (FWO-Vlaanderen) under grants n° EOS-30981113; and FWO project G0D2715N. We thank Charline Camuzet and Sophana Ung for their technical contribution. We thank Suzanne U. Emerson (NIH, USA) for providing us with reagents. We thank the imaging core facility of the BioImaging Center Lille-Nord de France for access to the instruments.

Author Contributions

M.A., C.M., I.M.S., J.M.S., L.S., S.D., V.M.A., L.C. performed research and analyzed data; C.W., C.M.A.D., R.F., P.M., J.D. contributed to reagents or analytic tools; M.A., L.C. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42737-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

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

1. Rationnel:

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

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

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

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

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

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

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

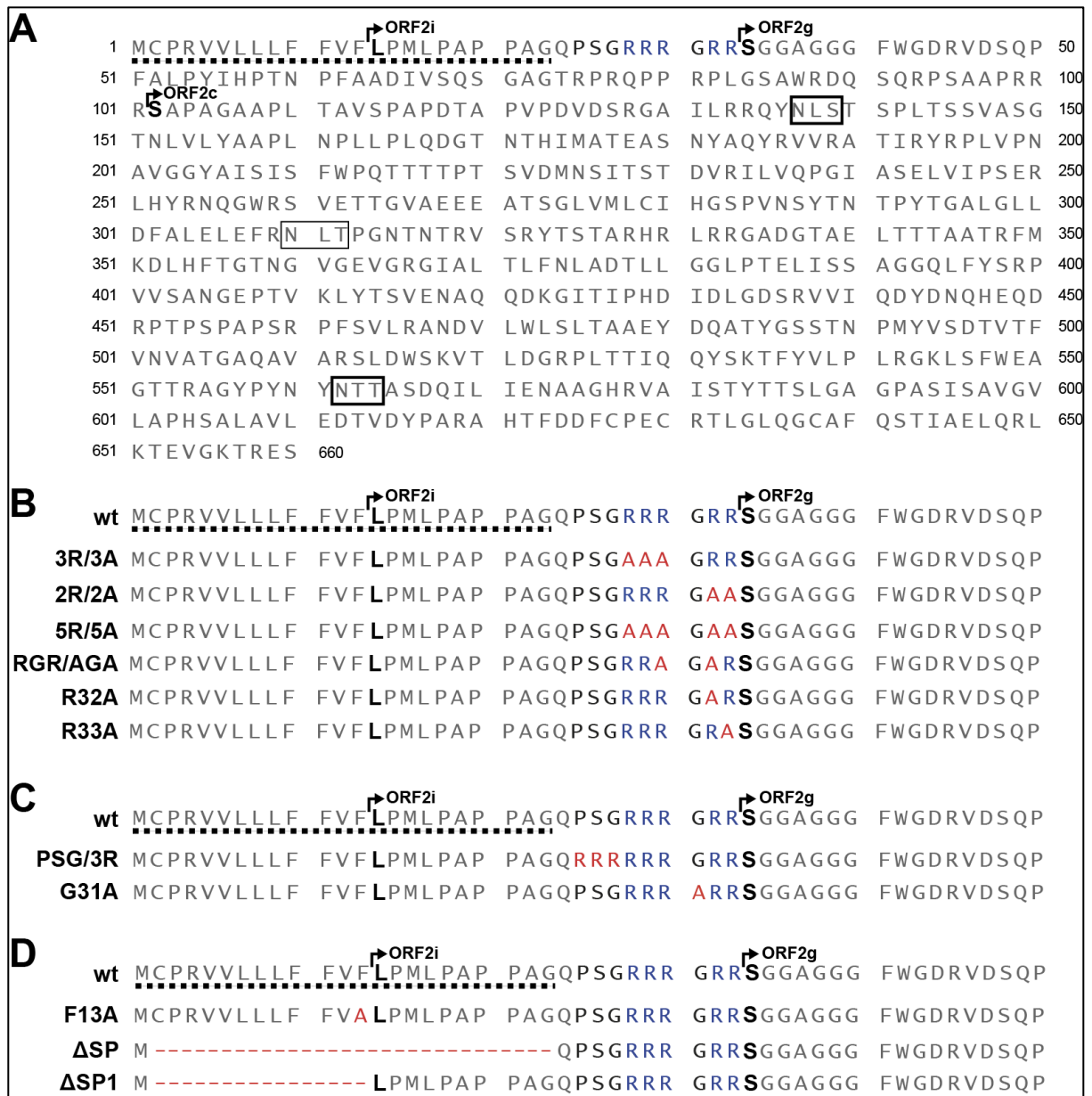


Figure 16: Séquence de la protéine ORF2 et présentation des mutants réalisés

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

2. Matériel et méthodes

2.1. Culture cellulaire

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

2.2. Plasmide, mutagenèse et transfection

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

2.3. Anticorps

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

2.4. Immunofluorescence

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

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

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

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

2.6. Extractions cytoplasmiques et nucléaires

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

2.7. Western blot (WB)

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

2.8. Titres infectieux

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

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

2.9. Traitement Leptomycine B (LMB)

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

2.10. Analyses statistiques

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

3. Résultats obtenus

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

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

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

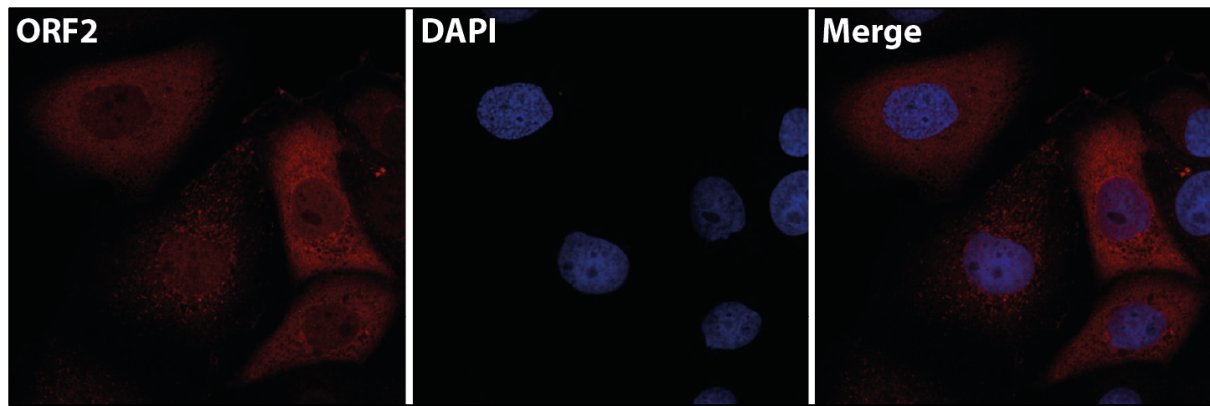


Figure 17: Localisation subcellulaire de la protéine ORF2

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

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

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

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

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

Afin de caractériser la SeqR qui se situe en aval du PS de la protéine ORF2 et en amont du premier aa (S³⁴) de la forme ORF2g, une série de mutants a été générée (**Figure 16**) :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

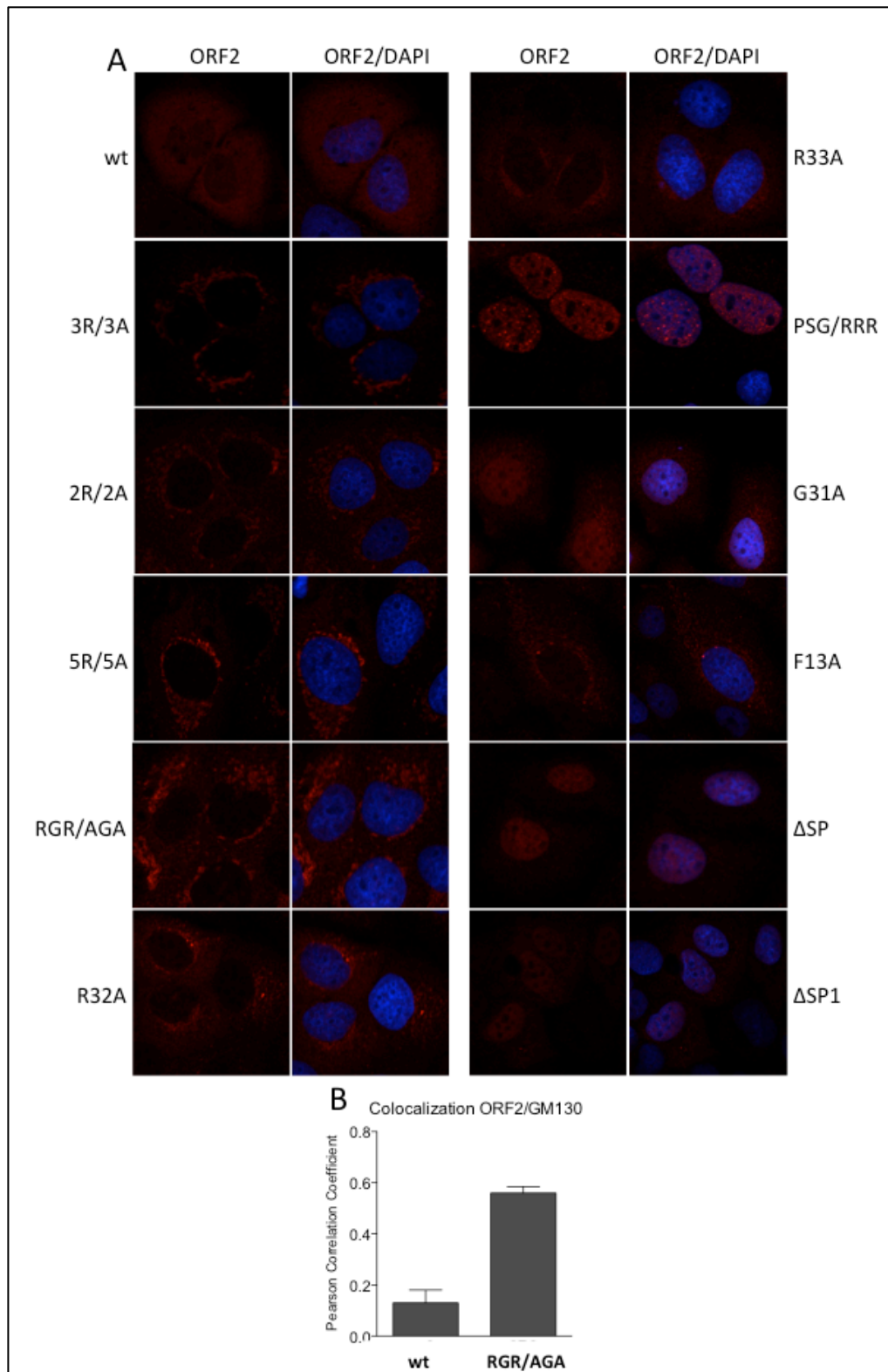


Figure 18: Distribution subcellulaire des protéines ORF2 sauvage et mutées.

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

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

La diminution de localisation nucléaire était accompagnée d'une accumulation de la protéine ORF2 dans un compartiment périnucléaire correspondant à l'appareil de Golgi (**Figure 18A**). En effet, le calcul des coefficients de corrélation de Pearson (PCC) a montré que la mutation RGR/AGA induit une colocalisation de la protéine ORF2 mutée avec le marqueur Golgien GM130 (**Figure 18B**). Les calculs de PCC ORF2/GM130 des autres mutants sont à réaliser. D'autre part, la mutation des résidus R conduisait à l'apparition de formes de la protéine ORF2 de plus haut poids moléculaire dans les EC (**Figure 19B**) ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de la protéine ORF2 dans les SN des cellules transfectées (**Figure 19A**) qui est représentative du niveau de translocation de celle-ci dans la lumière du RE. Ces résultats indiquent que la mutation de la SeqR augmente la fonctionnalité du PS de la protéine ORF2. L'analyse des titres infectieux a montré que la mutation de ces résidus R conduisait à une perte d'infectiosité de l'ensemble des mutants sauf le mutant R33A (**Figure 19D**). Ces résultats suggèrent que la translocation nucléaire de la protéine ORF2 pourrait jouer des fonctions importantes dans le cycle infectieux du HEV.

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

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

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

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

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

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

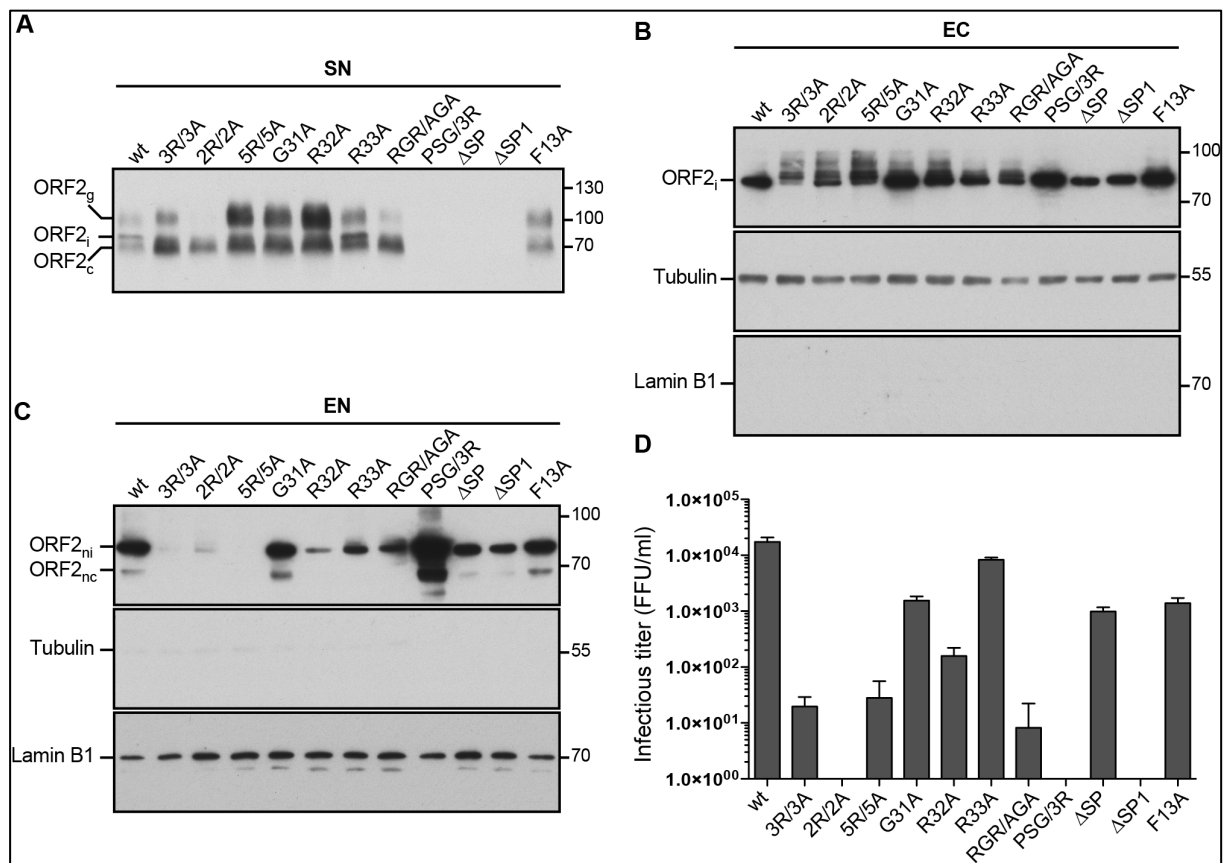


Figure 19: Caractérisation des mutants par Western Blot et titres infectieux.

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

3.1.4. La protéine ORF2 colocalise avec l'Importine α 1

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

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

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

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

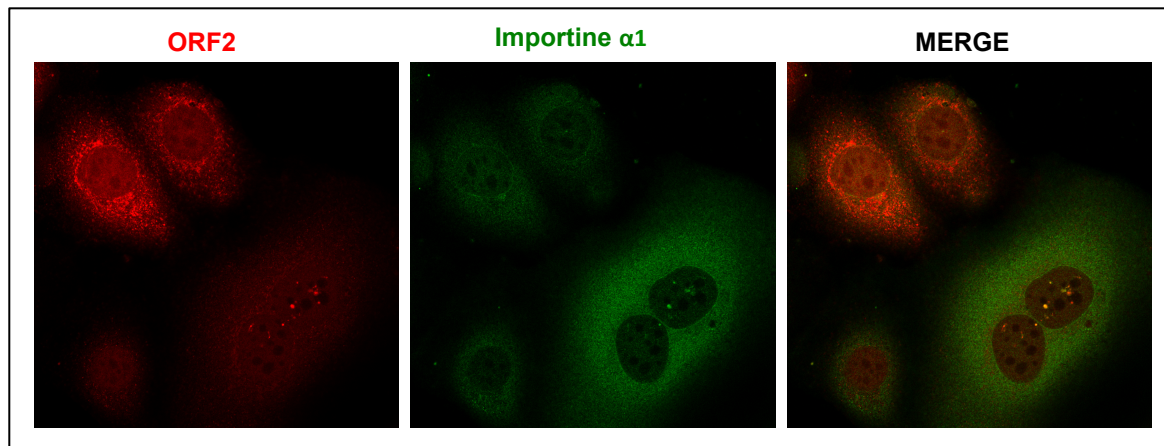


Figure 20: Colocalisation de la protéine ORF2 avec l'Importine $\alpha 1$.

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

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

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

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

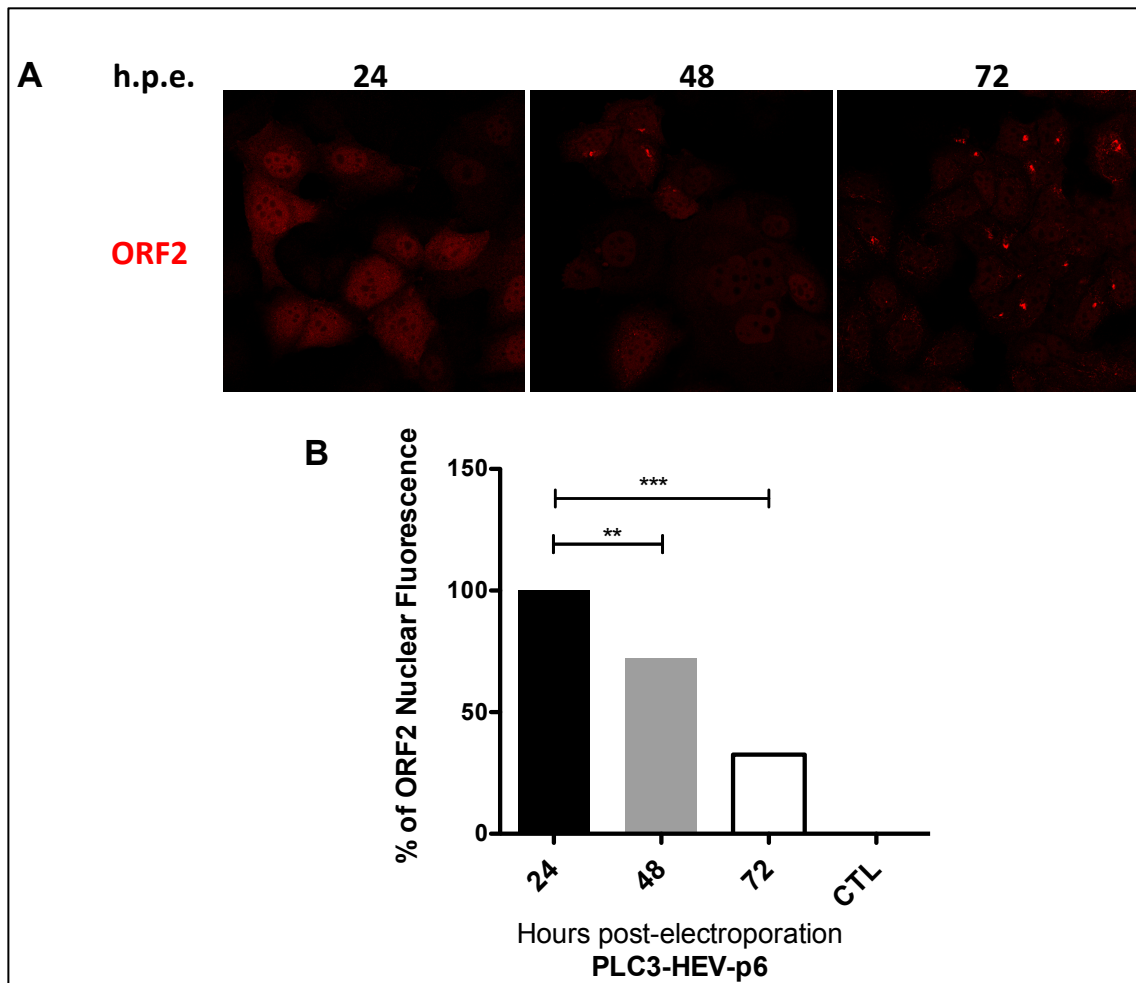


Figure 21: Cinétique du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine ORF2.

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

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

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

Nous avons ensuite analysé le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2. Plusieurs protéines cellulaires et virales sont exportées du noyau vers le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ce mécanisme fait intervenir l'Exportine1 (Expo1 ou CRM1 : Chromosomal Maintenance 1) ainsi que la protéine G Ran couplée au GTP. Dans le noyau, l'Expo1 se lie au cargo (la protéine à transporter) en reconnaissant un signal d'export nucléaire (NES). Les NES sont composés majoritairement d'acides aminés hydrophobes (Leucine, Phenylalanine, Methionine, Isoleucine) ou motifs riches en leucines.

Afin d'analyser le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2, un inhibiteur spécifique de l'Expo1, la leptomycine B (LMB) a été utilisée (pour revue (Mathew & Ghildyal

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

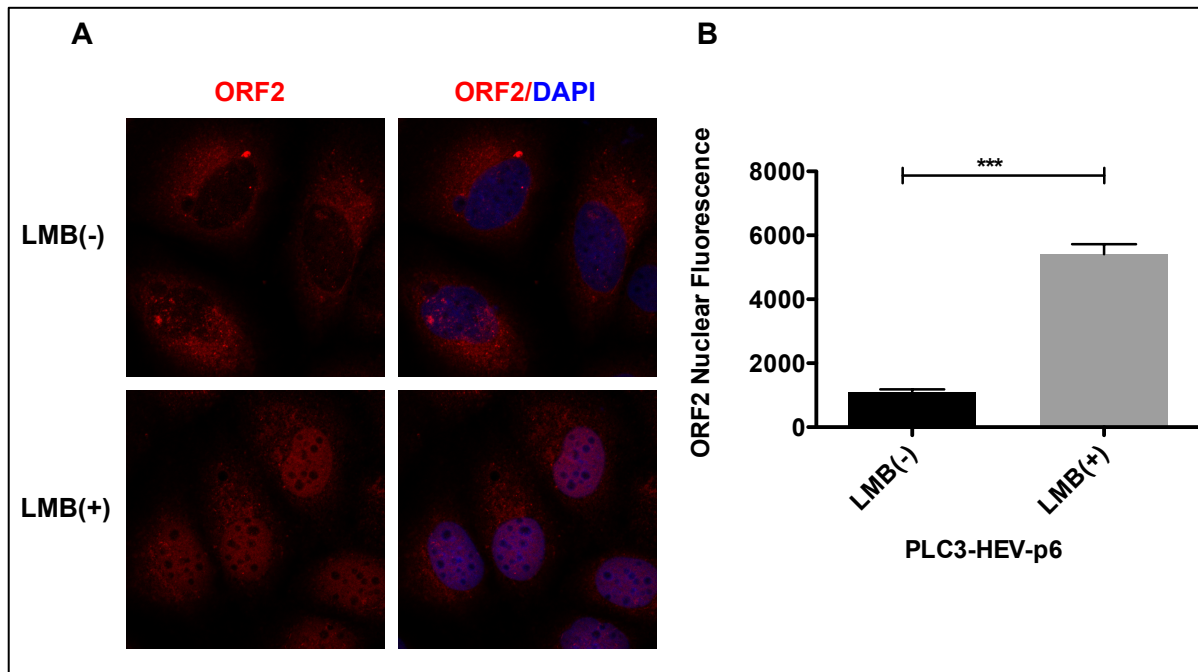


Figure 22: Inhibition de l'export nucléaire dépendant de l'Exportine1.

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

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

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

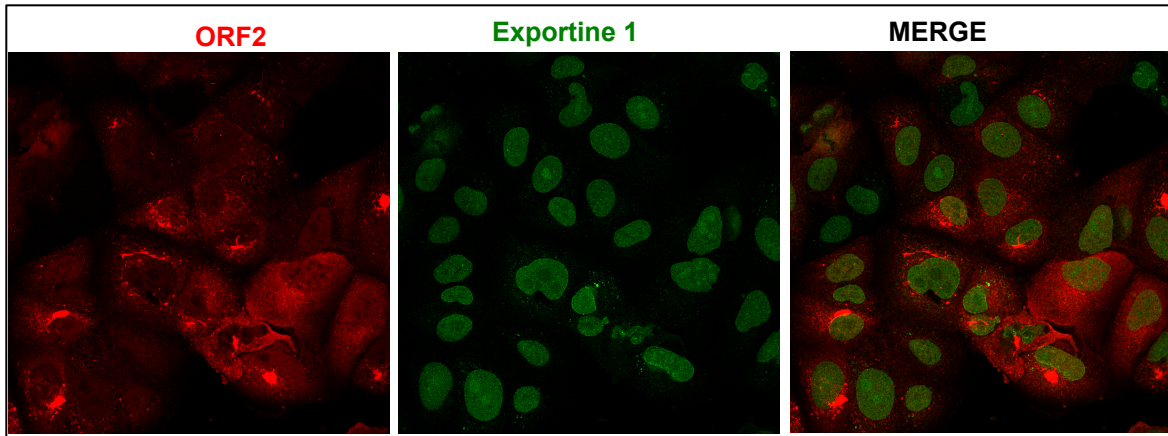


Figure 23: Colocalisation des protéines ORF2 et Exportine1.

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

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

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

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

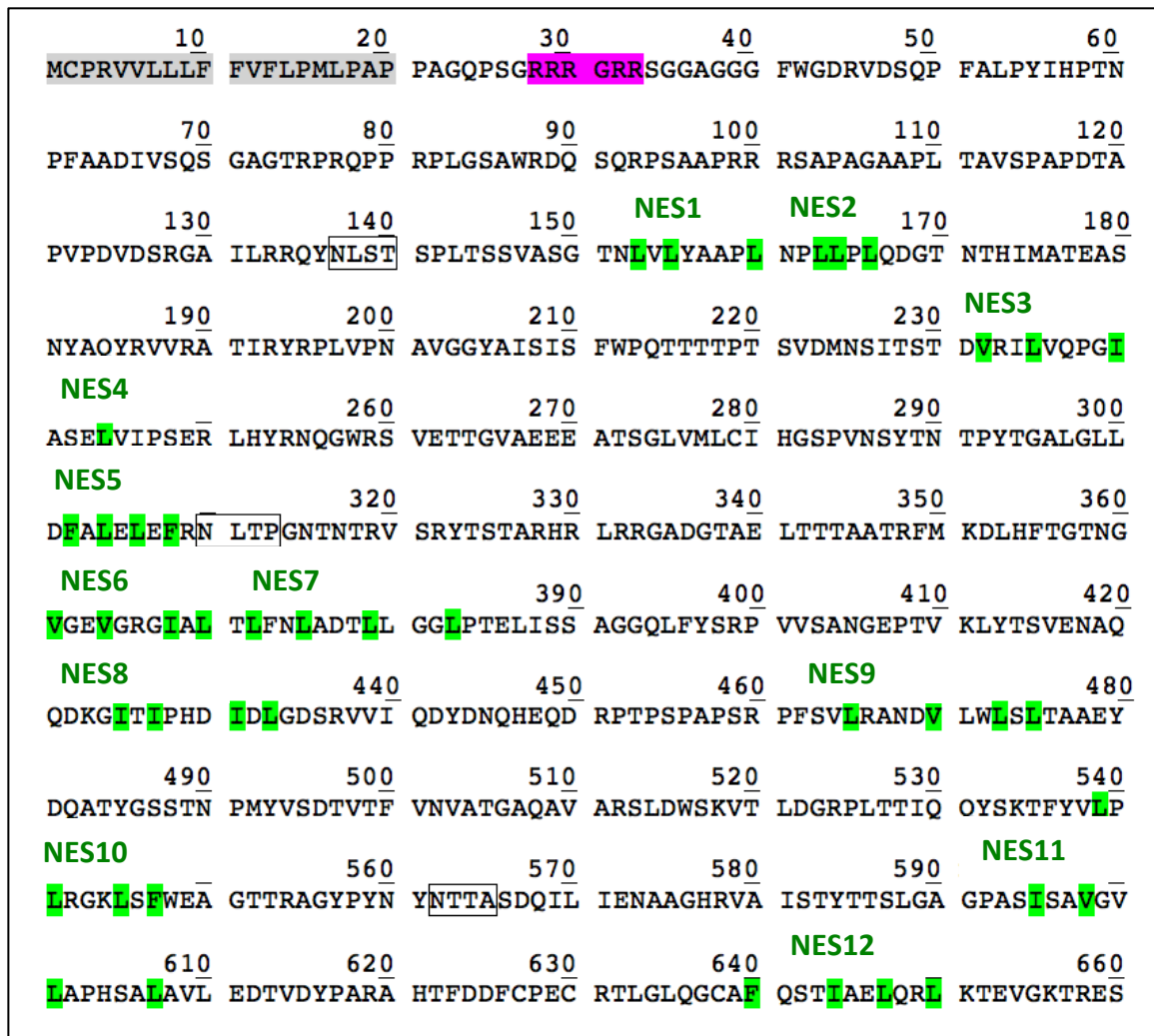


Figure 24: Signaux potentiels d'export nucléaire de la protéine ORF2.

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

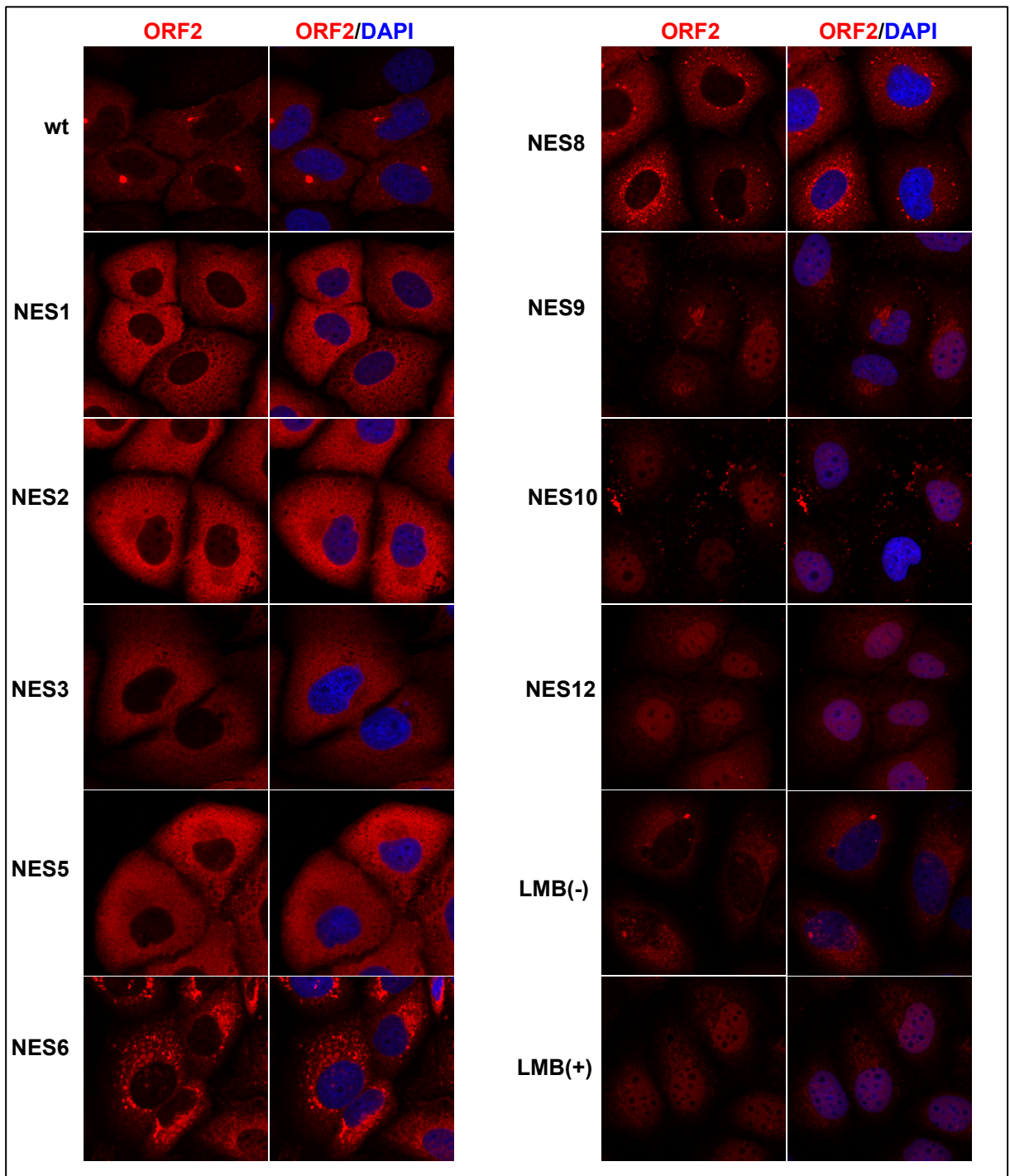


Figure 25: Identification des signaux d'export nucléaire (NES) sur la protéine ORF2.

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

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

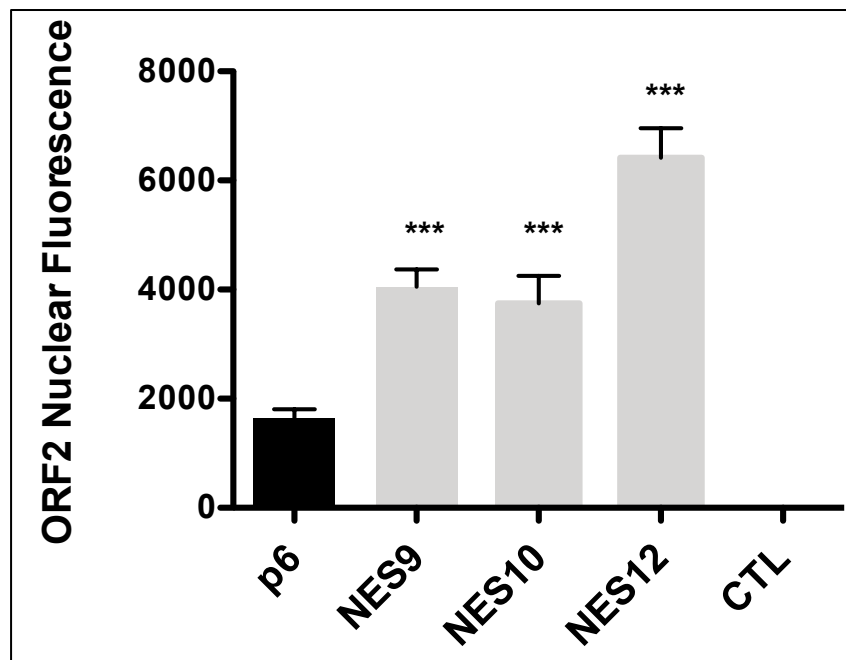


Figure 26: Intensité de fluorescence nucléaire de la protéine ORF2 sauvage et des mutants NES9, NES10 et NES12

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

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

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

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

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

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

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

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

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

maturation des formes ORF2g/c et ORF2i constitue un projet en cours de développement dans le laboratoire.

La protéine ORF2 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation très conservés parmi les différents géotypes du HEV (Zafrullah et al. 1999). Une étude de 293 séquences de différents géotypes du HEV appartenant à l'espèce *Orthohepevirus A* a montré que ces trois sites de N-glycosylation sont très bien conservés suggérant leur importance dans le cycle infectieux du HEV (S. Zhang et al. 2018). Les premières données sur la protéine ORF2 et la N-glycosylation ont été obtenues à partir d'études en système hétérologue en utilisant des vecteurs d'expression SV40 et des cellules de rein de singe (COS-1). Jameel et collègues en 1996 ont caractérisé la protéine ORF2 (souche Hyderabad) comme étant une protéine d'environ 88 kDa, avec une localisation subcellulaire cytoplasmique et à la membrane plasmique. Ils ont montré que la protéine ORF2 a la capacité d'être transloquée dans la lumière du RE par clivage de son PS pour être N-glycosylée. Cette équipe n'a pas identifié les sites de N-glycosylation occupés par des N-glycanes (Jameel et al. 1996). Ensuite en 1999, en utilisant le même système d'étude, Zafrullah et collègues ont montré que les trois sites de la protéine ORF2 étaient N-glycosylés, le site 2 étant le site majeur de N-glycosylation (Zafrullah et al. 1999). En 2007, Surjit et collaborateurs ont montré que la protéine ORF2 se localise au niveau de la membrane plasmique et du RE. En plus, ils ont démontré que la localisation cytoplasmique de l'ORF2 dépend de sa capacité à être rétro-transloquée du RE vers le cytoplasme de manière dépendante de la N-glycosylation (Surjit et al. 2007). En 2008, Graff et collaborateurs ont étudié l'impact de la N-glycosylation de la protéine ORF2 en système infectieux en utilisant la souche Sar-55 (HEV-1) et les cellules S10-3 sous clone de la lignée d'hépatome humain Huh-7. Leurs résultats ont montré que les mutations au niveau des deux premiers sites de N-glycosylation de la protéine ORF2 affectent significativement l'assemblage des particules virales et la mutation du troisième site inhibe l'infectiosité des particules virales indépendamment de la N-glycosylation (Graff et al. 2008). Les résultats sur le statut de la N-glycosylation de la protéine ORF2 obtenus dans ces études restent énigmatiques puisqu'ils ont utilisé des extraits cytoplasmiques pour caractériser le profil de la protéine ORF2. Or, notre équipe a démontré que la protéine ORF2 intracellulaire (ORF2intra) n'est pas N-glycosylée, seules les formes sécrétées le sont (Montpellier et al. 2018). Ces mêmes observations ont été faites par Yin et collaborateurs en 2018 (Yin et al. 2018). Le rôle précis de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV restait donc à définir.

Afin de mieux comprendre le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV, nous avons généré des mutants des différents sites de N-glycosylation dans

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

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

L'impact de la N-glycosylation de la protéine ORF2 sur l'assemblage et l'infectiosité des particules virales du HEV a également été étudié. Nos résultats ont montré que la N-glycosylation ne modifie pas l'assemblage des particules virales et leur infectiosité. Cependant, de manière indépendante de cette modification post-traductionnelle, nous avons montré que les mutants du site N1 inhibaient l'infectiosité des particules virales, les mutants du site N2 affectaient drastiquement l'assemblage des particules virales et les mutants du site N3 avaient

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

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

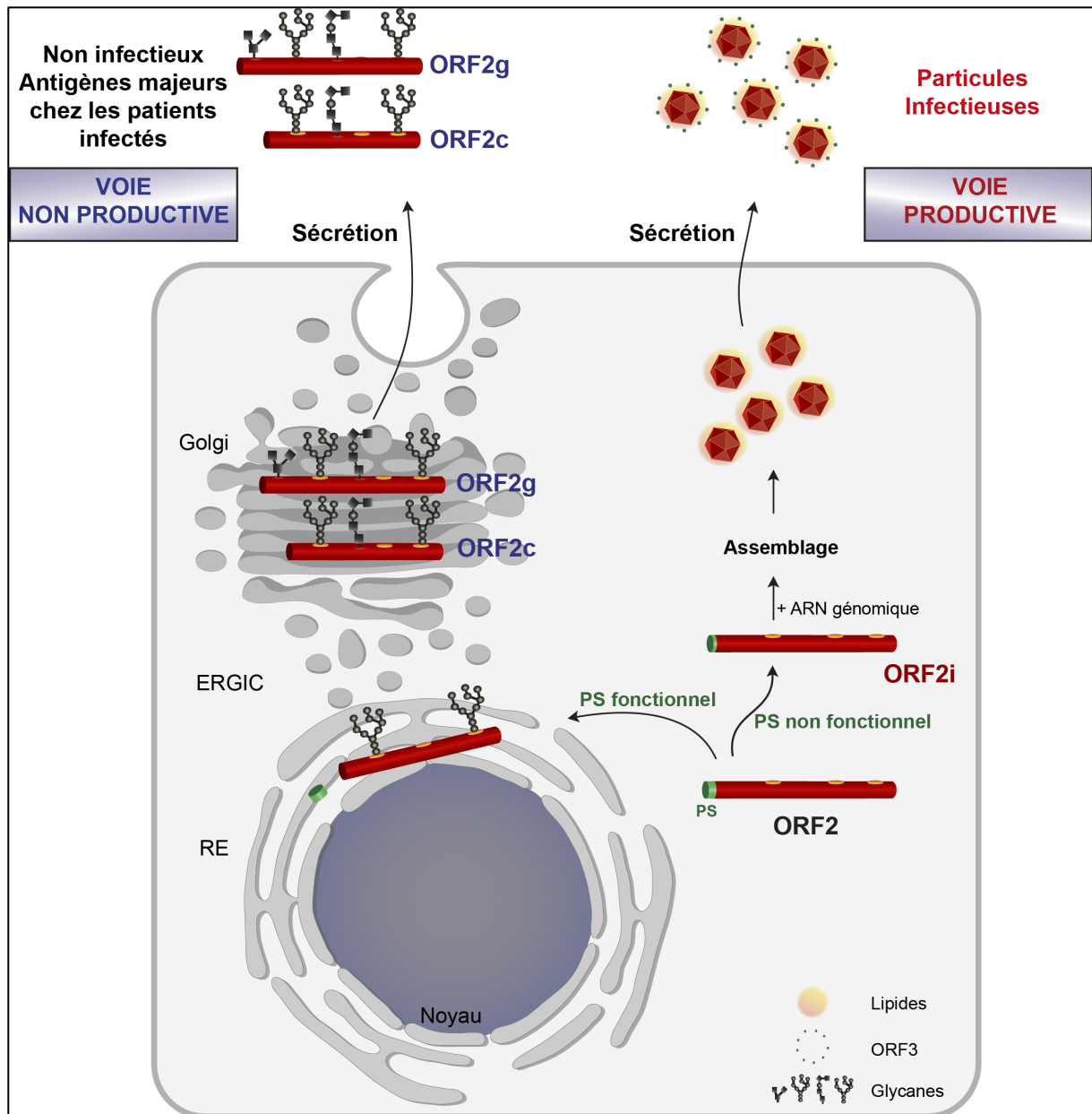


Figure 27: Différentes voies de production de la protéine ORF2.

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

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

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

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

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

Nous avons appelé cette forme nucléaire de la protéine ORF2_{intra}, ORF2_{ni} (n pour nucléaire et i pour intracellulaire). Nous également détecté une forme plus basse de la protéine ORF2_{ni}

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

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

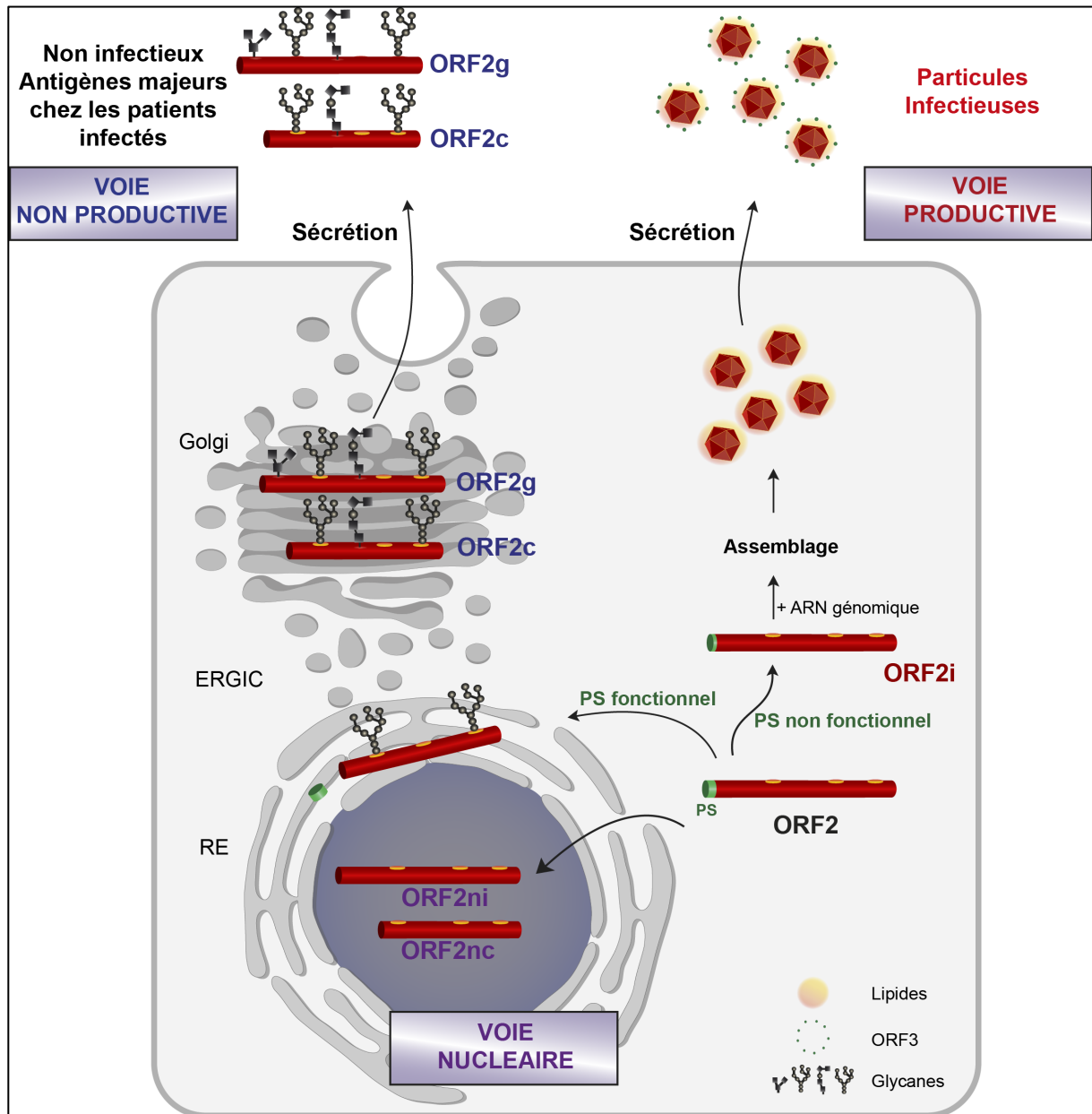


Figure 28: Voies non productive et productive de la protéine ORF2 et la voie nucléaire

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

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

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

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

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

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

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

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

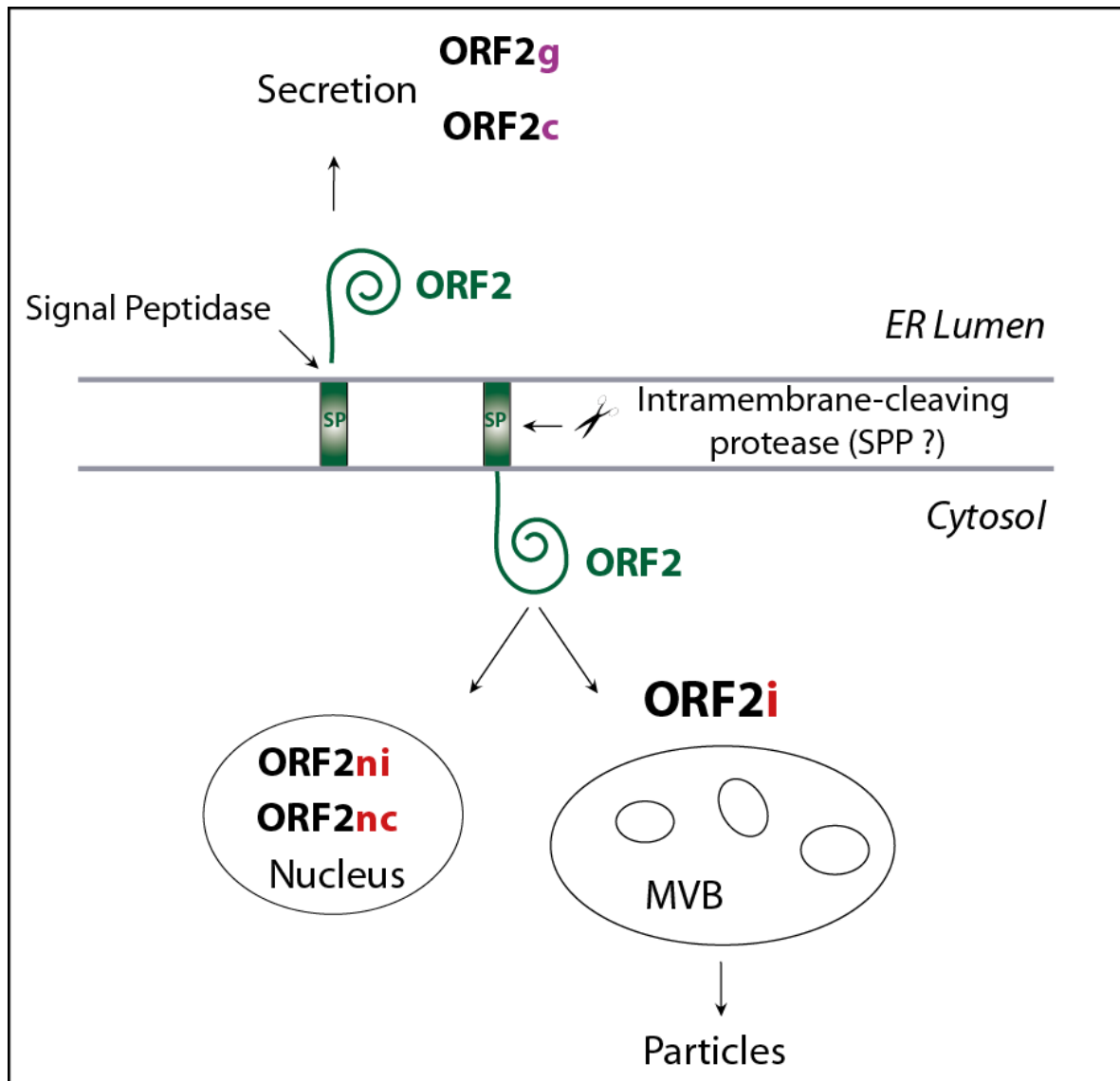


Figure 29: Double topologie de la protéine ORF2.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La protéine NEP du virus *Influenza* possède deux NES qui fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. Lorsque le premier NES est muté, aucune accumulation nucléaire de la protéine NEP n'est observée, seule la mutation des deux NES permet d'observer une accumulation nucléaire de cette protéine (Huang, S. et al. 2013). A l'inverse, nous avons observé une accumulation nucléaire significative de la protéine ORF2 lorsque chaque NES est muté individuellement, suggérant une fonction étroitement liée de ces trois NES indiquant qu'ils pourraient former un « NES tripartite ».

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

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

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

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

(iii) La voie nucléaire dans laquelle la protéine ORF2_{intra} interagirait avec les importines α/β via sa SeqR (²⁸RRRGRR³³), qui est un NLS fonctionnel, pour être transloquée dans le noyau des cellules hôtes et donner la forme ORF2_{ni}. Ce processus a probablement lieu à des temps très précoces du cycle infectieux du HEV afin d'assurer une fonction qui reste à définir. La forme ORF2_{ni} serait clivée dans le noyau pour donner la forme ORF2_{nc}. Elle serait ensuite très

rapidement exportée du noyau vers le cytoplasme en interagissant avec l'Exportine1 au niveau de ses trois NES (en position 465, 540, 640), (**Figure 30**).

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

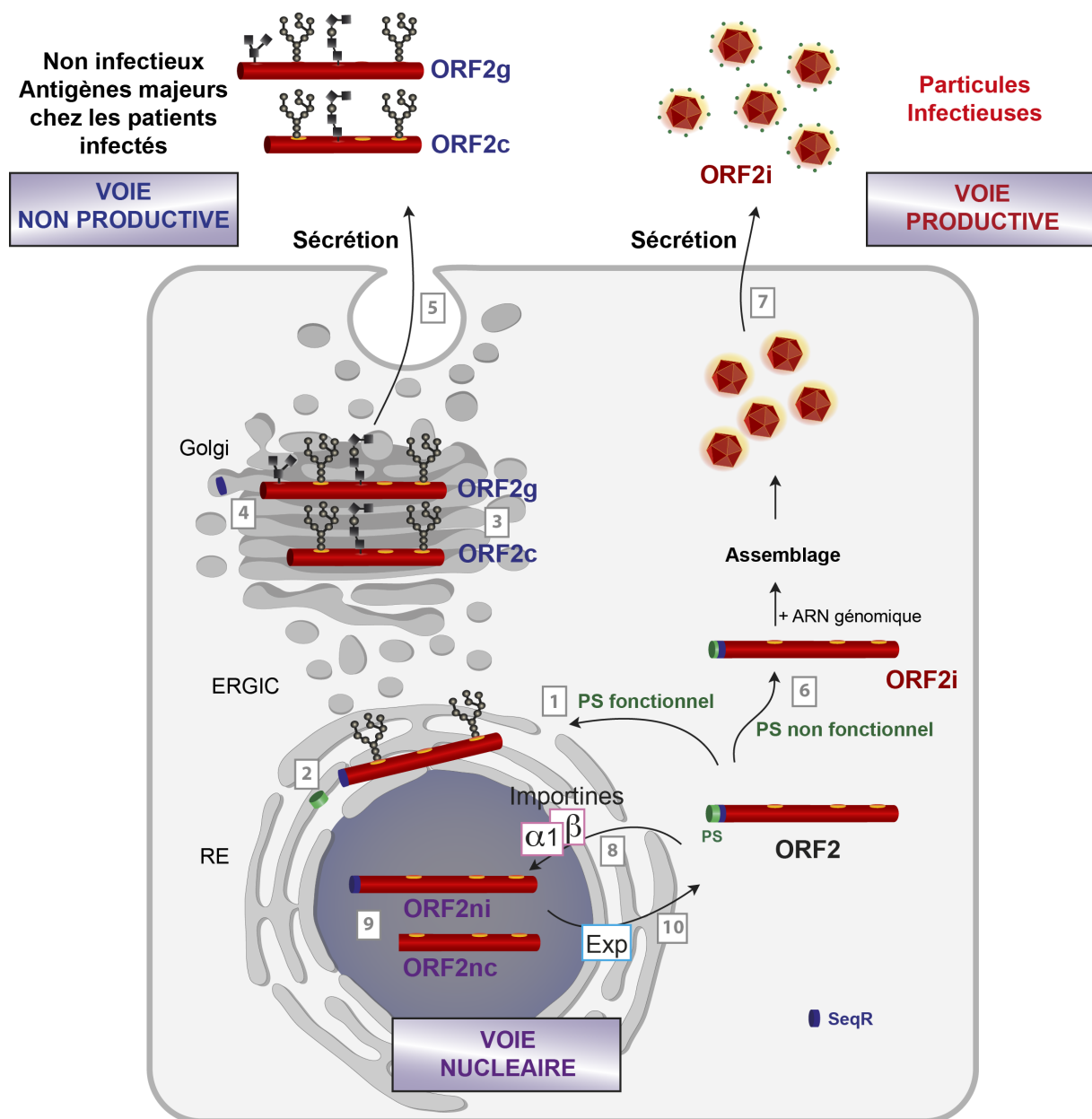


Figure 30: Modèle du cycle cellulaire de la protéine ORF2 du HEV.

La protéine ORF2 (en rouge) est constituée de 660 aa et d'un PS (en vert) en position N-terminale. La protéine ORF2 peut suivre plusieurs voies : **(i) La voie non productive** dans laquelle, une fraction de cette protéine possédant un PS fonctionnel est (1) transloquée dans la lumière du RE suite au clivage de son PS par la signal peptidase (2). (3) Dans la voie de sécrétion, elle est N-glycosylée, O-glycosylée et sialylée pour donner la forme ORF2g. La forme ORF2g est clivée probablement par des furines pour donner la forme ORF2c. (4) L'ORF2g est maturée à son extrémité N-terminale par clivage au niveau de la SeqR (²⁸RRRGRR³³, en violet) par une PC de type Furine. (5) Les protéines ORF2g et ORF2c sont ensuite sécrétées dans le milieu extracellulaire. **(ii) La voie productive** dans laquelle la protéine ORF2 possède un PS non fonctionnel, (6) reste du côté cytosolique des membranes pour encapsider le génome viral. (7) Les virions formés sont ensuite libérés de la cellule. La forme associée au génome viral est appelée ORF2i. **(iii) La voie nucléaire** dans laquelle la SeqR (²⁸RRRGRR³³) joue le rôle de NLS permettant à la protéine ORF2 d'interagir avec les Importines α 1/ β afin d'être transloquée dans le noyau des cellules pour donner la forme ORF2ni (8). La forme ORF2ni est clivée pour donner la forme ORF2nc (9). (10) La protéine ORF2ni est ensuite exportée du noyau vers le cytoplasme en interagissant avec l'Exportine 1 (Exp) grâce à ses trois NES situés en position 465, 540 et 640. ORF2g : ORF2 glycosylée ; ORF2c : ORF2 clivée ; ORF2i : ORF2 infectieuse/intracellulaire ; ORF2ni : ORF2 nucléaire; ORF2nc (ORF2 nucléaire clivée); ERGIC : Compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi.

ANNEXES

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

Résumé

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

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

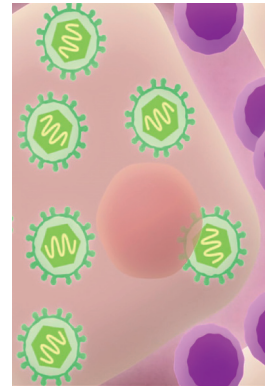
► La première cause d'hépatite aiguë dans le monde est due au virus de l'hépatite E (HEV). Cette infection virale a longtemps été considérée comme un problème touchant les pays en développement. Cependant, depuis l'identification de formes zoonotiques à la fin du siècle dernier, il est apparu que cette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

Alors que les hépatites virales A, B et C sont connues du grand public, l'hépatite E est généralement méconnue. Cette infection, dont l'agent responsable est le virus de l'hépatite E (HEV, E pour *epidemic/enteric*), est pourtant maintenant la première cause d'hépatite aiguë et de jaunisse dans le monde. Deux milliards de personnes vivent dans des pays où cette infection est endémique et sont donc susceptibles de contracter une hépatite E. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estimait, en 2017, à 20 millions le nombre d'infections par le HEV chaque année, avec plus de 3,3 millions de cas d'hépatites E aiguës et 44 000 décès liés à cette infection. Le HEV est présent dans toutes les régions du monde, mais sa prévalence est la plus élevée en Asie de l'est et du sud. En France, la séroprévalence est de 22,4 % à l'échelle nationale. Elle est de 52,2 % dans le sud du pays, particulièrement touché par cette infection.

Le virus de l'hépatite E

Un virus méconnu qui se dévoile

Maliki Ankavay, Jean Dubuisson, Laurence Cocquerel



Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille
1, rue du Professeur Calmette,
U1019-UMR8204-CIIL- Center for
Infection and Immunity of Lille,
F-59000 Lille, France.
laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr

Quatre génotypes majeurs (génotypes 1 à 4) du HEV sont pathogènes pour l'homme. Ils présentent des différences épidémiologiques. Les génotypes 1 et 2 sont généralement rencontrés dans les pays en développement et sont présents exclusivement chez l'homme. Leur transmission se fait par voie féco-orale, essentiellement par consommation d'eau contaminée par les particules virales présentes dans les matières fécales. Les génotypes 3 et 4 sont, eux, essentiellement présents dans les pays industrialisés dans lesquels le nombre de cas rapportés a été multiplié par 10 ces dix dernières années, en raison de l'amélioration des outils diagnostiques et de la recherche du virus en cas d'hépatite aiguë [1]. Ils diffèrent des génotypes 1 et 2 par leur transmission, qui est principalement zoonotique. Ils sont en effet présents chez différents animaux domestiques et sauvages qui constituent des réservoirs viraux à partir desquels l'homme peut se contaminer [2]. La consommation de viande de porc ou de gibier, peu ou pas cuite ou sous la forme de salaison, représente une source importante de contamination. Le HEV est ainsi détectable dans 30 % des saucisses préparées à partir de foie de porc, comme les figatelli corses¹ [3]. Le virus est en effet présent dans 65 % des élevages de porcs en France, 31 % des animaux se révèlent positifs pour le virus et 4 % des foies entrant dans la chaîne alimentaire sont infectés - une cuisson à cœur à 71 °C pendant 20 minutes permet cependant d'inactiver le virus [4]. Le HEV peut également se transmettre par voie parentérale, verticale et transplantationnelle [5]. L'hépatite E est asymptomatique chez les animaux ; elle est généralement aiguë mais spontanément résolutive chez l'homme et, la plupart du temps, ne nécessite pas d'hospitalisation. L'infection peut cependant engendrer de graves complications, notamment chez les femmes

Vignette (© État d'Urgence Production / DNDi / Fondation Mérieux / Inserm / Institut Pasteur / MSF / Réseau Canopé / Universciences / Réalisateur : Gérard Lafon).

¹ Une saucisse fraîche composée principalement de viande et de foie de porc.

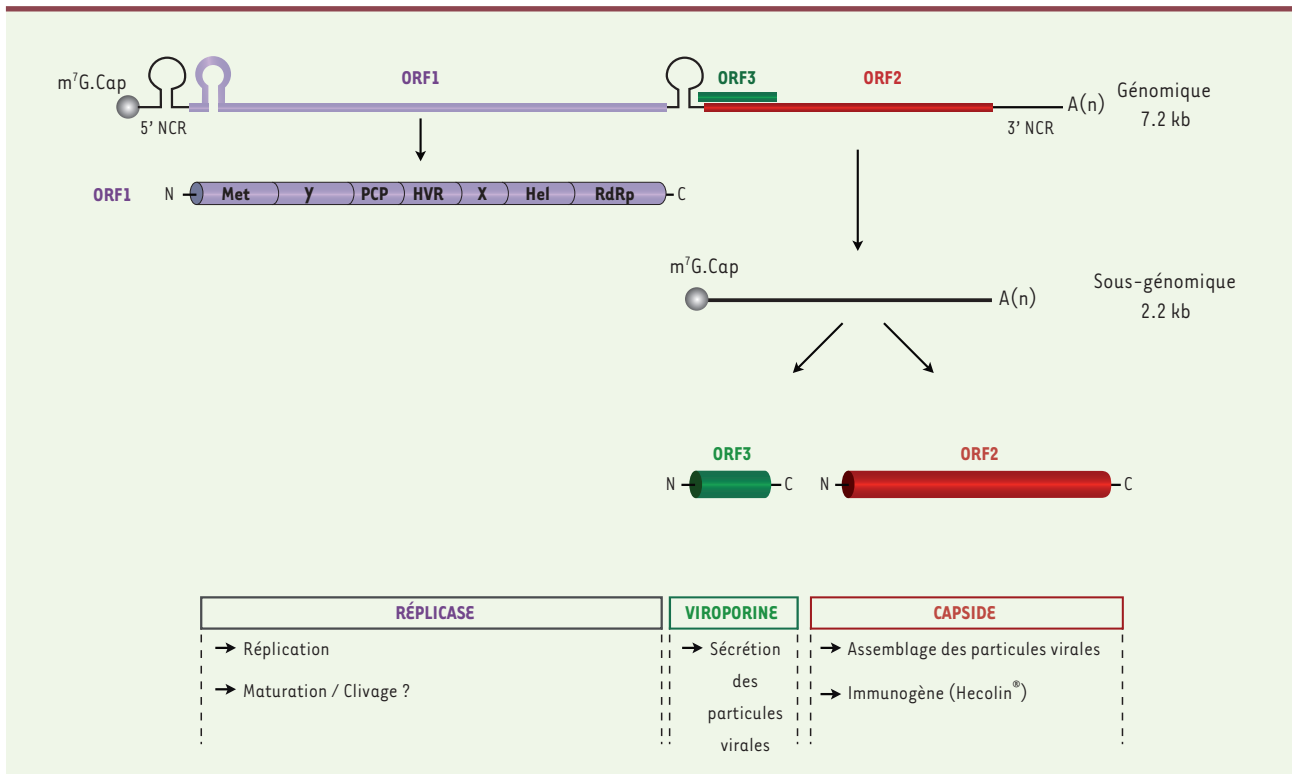


Figure 1. Organisation du génome du HEV. Le HEV possède un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7 200 nucléotides avec respectivement à ses extrémités 5' et 3' une coiffe (m⁷G.Cap) et une queue poly(A). Il présente trois cadres ouverts de lecture (ORF) encadrés par deux régions non codantes (NCR). Ces ORF codent respectivement trois protéines appelées ORF1, ORF2 et ORF3. La protéine ORF1 est une polyprotéine traduite à partir de l'ARN génomique qui est importante pour la réplication virale. Elle possède sept domaines : le domaine méthyl-transférase (Met) ; le domaine Y ; le domaine papaine cystéine protéase (PCP) ; le domaine hypervariable (HVR) ; le macrodomaine X ; le domaine hélicase (Hel) et le domaine ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Les protéines ORF2 et ORF3 sont synthétisées à partir d'un ARN sous-génomique bicistronique de 2,2 kb (ARNmSG). L'ORF2 est la protéine de capsid virale. La protéine ORF3 joue un rôle important dans la sécrétion des particules virales. N : extrémité amino-terminale ; C : extrémité carboxy-terminale ; m⁷G.Cap : coiffe ; A(n) : queue poly(A).

enceintes infectées par le génotype 1 ou 2, chez lesquelles l'hépatite E peut devenir fulminante, atteignant un taux de mortalité situé entre 15 et 25 %. Les personnes ayant une hépatopathie sous-jacente sont également très à risque. L'hépatite E peut également devenir chronique chez les patients immunodéprimés infectés par le génotype 3 [42] (→).

(→ Voir la Nouvelle de J. Izopet et N. Kamar, m/s n° 12, décembre 2008, page 1023

Elle est aussi associée à un certain nombre de désordres extra-hépatiques, notamment neurologiques (syndrome de Guillain-Barré et amyotrophie névralgique) et rénaux (glomérulonéphrite) [6].

Bien que l'hépatite E représente un problème majeur de santé publique dans le monde, aucun traitement spécifique n'est aujourd'hui disponible. La Ribavirine peut cependant être utilisée dans la prise en charge de l'hépatite chronique chez les patients immunodéprimés. Un vaccin recombinant (Hecolin®) a été homologué en Chine en 2011 mais pas dans les autres pays, celui-ci n'ayant pas fait l'objet d'essais d'innocuité, d'immunogénicité et d'efficacité chez les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes atteintes d'hépatopathie.

Le diagnostic de l'hépatite E repose sur la détection du génome viral par amplification (PCR, *polymerase chain reaction*), la détection des anticorps anti-HEV (Ig [immunoglobuline] M et G) ou de l'antigène de capsid. Les anticorps anti-HEV sont détectables dès le début de la symptomatologie : le taux est maximum au bout d'un mois et décroît après 2 à 6 mois pour les IgM ; les IgG persistent de 18 mois à plus de 10 ans. La présence d'IgG anti-HEV témoigne ainsi d'une exposition antérieure au virus. L'infection est considérée comme chronique si l'ARN viral reste détectable plus de 3 mois après l'infection.

Le virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E est un virus appartenant au genre *Orthohepevirus* de la famille des *Hepeviridae* [7]. C'est un petit virus d'environ 30-34 nm de diamètre

qui possède une capsidie de symétrie icosaédrique [8, 9]. Son génome consiste en une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive ([+]) d'environ 7 200 nucléotides présentant respectivement à ses extrémités 5' et 3' une coiffe et une queue poly(A). Cet ARN possède trois cadres ouverts de lecture (ORF), nommés ORF1, ORF2 et ORF3, encadrés par deux régions non codantes (NCR) qui jouent un rôle essentiel dans la réplication et la transcription du génome viral. Les 3 ORF codent respectivement les protéines ORF1, ORF2 et ORF3. Les protéines ORF2 et ORF3 sont produites à partir d'un ARN sous-génomique bicistronique de 2,2 kilobases (ARNsg), dont le promoteur se situe dans la région de jonction entre l'ORF1 et son codon d'initiation (Figure 1).

La protéine ORF1, également appelée réplisase, est une polyprotéine non-structurale de 1 693 acides aminés (aa) présentant plusieurs domaines distincts essentiels à la réplication virale (pour revue [10]). Des analyses de bioinformatique de sa séquence ont permis d'identifier des domaines (Figure 1) dont les activités enzymatiques ont ensuite été démontrées : méthyl-transférase (Met), ARN hélicase (Hel) et ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). En revanche, la fonction exacte du macrodomaine X, du domaine Y et de la région hypervariable (HVR) reste à définir. Une activité enzymatique chymotrypsine a été montrée pour le domaine papaine cystéine protéase (PCP). Le clivage de la polyprotéine en plusieurs polypeptides n'a pas encore pu être confirmé. Néanmoins, il semble que le facteur de coagulation Xa et la thrombine seraient essentiels à la réplication du HEV et pourraient être impliqués dans la maturation de ORF1 [11].

La protéine ORF2 est la protéine de capsidie. Cette protéine de 660 aa possède un peptide signal N-terminal (correspondant aux 20 premiers aa) et trois sites potentiels de N-glycosylation. L'importance de cette modification post-traductionnelle dans le cycle infectieux du HEV reste à définir. La protéine ORF2 possède trois domaines distincts appelés S (*shell*), M (*middle*) et P (*protruding*). Le domaine P serait la cible majeure des anticorps neutralisants. Il pourrait contenir un domaine de liaison du virus à son récepteur cellulaire. Les monomères de capsidie s'assembleraient pour former des décamères qui encapsident l'ARN viral. La capsidie serait constituée de 180 copies disposées en icosaèdre [12-14]. La protéine ORF2 est hautement immunogène. Des études immunologiques et structurales de cette protéine de capsidie ont d'ailleurs contribué au développement du vaccin Hecolin® en Chine [15]. ORF2 est la protéine virale la mieux caractérisée, essentiellement grâce à des études portant sur des formes tronquées de la protéine produites dans des systèmes d'expression hétérologue utilisant le baculovirus ou la bactérie *Escherichia coli*. Ce n'est que très récemment que la séquence exacte de la protéine ORF2 associée aux particules virales infectieuses (ORF2i) a été identifiée : elle correspond aux résidus 14 à 660 de la protéine [9]. Au cours de son cycle infectieux, le HEV produit la protéine de capsidie ORF2 sous trois formes différentes : (1) la forme ORF2i, d'environ 80 kDa, qui est la forme associée aux particules infectieuses. Cette protéine n'est pas glycosylée ; (2) la forme ORF2g (glycosylée), d'environ 90 kDa ; et (3) la forme ORF2c (clivée), d'environ 75 kDa. Ces dernières sont des protéines sécrétées en très grandes quantités mais ne forment pas de particules virales et ne sont pas associées à du matériel infectieux.

Elles sont N-glycosylées, O-glycosylées et sialylées. La forme ORF2c est un produit de clivage N-terminal de la protéine ORF2g (données non publiées). ORF2g et ORF2c sont les antigènes viraux majeurs présents dans le sérum des patients infectés par le HEV [9] ; elles pourraient représenter un leurre immunologique. Une étude très récente a en effet confirmé l'existence des différentes formes d'ORF2 et a montré que la forme ORF2g sécrétée pouvait moduler la réponse immunitaire en interférant avec la reconnaissance des particules virales par les anticorps neutralisants [16]. La forme ORF2c n'a pas été identifiée dans cette étude, probablement en raison des faibles quantités de cette protéine synthétisée ou du type cellulaire utilisé.

La protéine ORF3 est une phosphoprotéine structurale de 113-115 acides aminés. Elle est constituée de deux domaines hydrophobes N-terminaux (D1 et D2) et de deux domaines riches en prolines (P1 et P2). Cette protéine de 13 kDa est présente à la surface des particules virales circulant dans le sérum de patients infectés ou produites en culture cellulaire [9, 17]. Le rôle exact de l'ORF3 dans le cycle infectieux du HEV n'a pas encore été pleinement établi. Néanmoins, il semble qu'elle ait un rôle critique dans la sécrétion des particules virales et très récemment une activité viroporine lui a été attribuée [18]. ORF3 interagit, *via* un motif PSAP (Pro-Ser-Ala-Pro) présent dans son domaine P2, avec la protéine Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) [19, 20], un élément du complexe ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) important pour la formation des exosomes [43] (→) et requis pour le bourgeonnement de plusieurs virus enveloppés [21].

Bien qu'initialement considéré comme un virus non enveloppé, le HEV, comme le virus de l'hépatite A, est désormais identifié comme un virus quasi-enveloppé mais qui ne présente pas de protéine d'enveloppe à sa surface [22, 23]. Contrairement aux particules retrouvées dans les selles de patients, les virions produits en culture cellulaire et ceux qui circulent dans le sang des patients infectés, appelés eHEV, sont associés à des lipides et à la protéine ORF3. L'ultrastructure des particules enveloppées et non enveloppées a été visualisée récemment par microscopie électronique à transmission [9]. Les particules eHEV, associées à des lipides et à la protéine ORF3, seraient moins infectieuses que des particules non lipidées présentes dans les selles [24, 25], probablement du fait de l'utilisation de voies différentes d'entrée dans la cellule cible [23]. Il est à noter que l'enveloppe des eHEV pourrait protéger le virus des anticorps neutralisants [26].

(→) Voir la Synthèse de S. Le Lay et al., m/s n° 11, novembre 2018, page 936

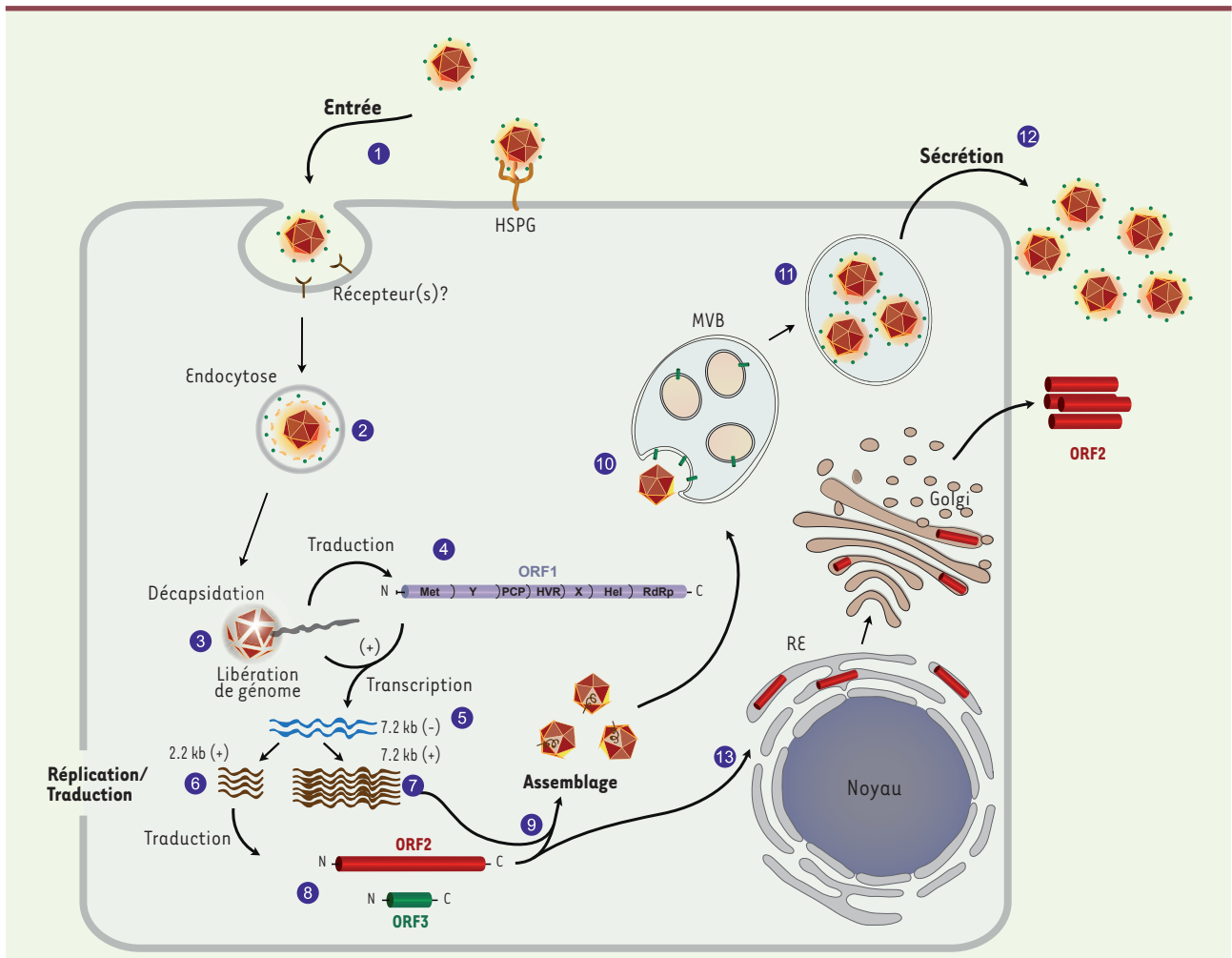


Figure 2. Cycle infectieux du HEV. 1. Le HEV initie son cycle en interagissant de manière peu spécifique avec des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) présents à la surface de la cellule cible, avant d’interagir avec un ou plusieurs récepteurs spécifiques non encore identifiés. 2. Les particules 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 (10), présents au niveau des corps multi-vésiculaires (MVB, multivesicular bodies) seraient ensuite enveloppés d’une bicouche lipidique (11) dans laquelle la protéine ORF3 viendrait s’insérer. 12. Les virions seraient ensuite sécrétés grâce à l’activité viroporine de l’ORF3. 13. Dans la voie non productive, la grande majorité de la protéine ORF2 est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) pour suivre la voie de sécrétion classique des protéines. Cette voie utilisée par ORF2 n’aboutit pas à la formation de particules virales.

Le cycle infectieux du HEV

En raison de la difficulté de l’amplifier en culture cellulaire, les différentes étapes du cycle infectieux du HEV restent encore très mal connues (Figure 2). Néanmoins, il est proposé qu’après son attachement non spécifique à la surface de la cellule cible via des protéoglycanes à héparane sulfate [27], le virus interagirait avec un ou des récepteurs qui restent à identifier. Les particules non enveloppées et

les eHEV entreraient dans les cellules par des mécanismes différents [23] : l’entrée des eHEV impliquerait une endocytose, en suivant une voie dépendant de la clathrine, de la dynamine-2, de Rab5/Rab7 et du cholestérol [23, 28, 29] ; le mécanisme d’entrée des particules non enveloppées reste, lui, à définir. En entrant dans la cellule, les lipides de l’enveloppe des eHEV subiraient une dégradation par les lipases des

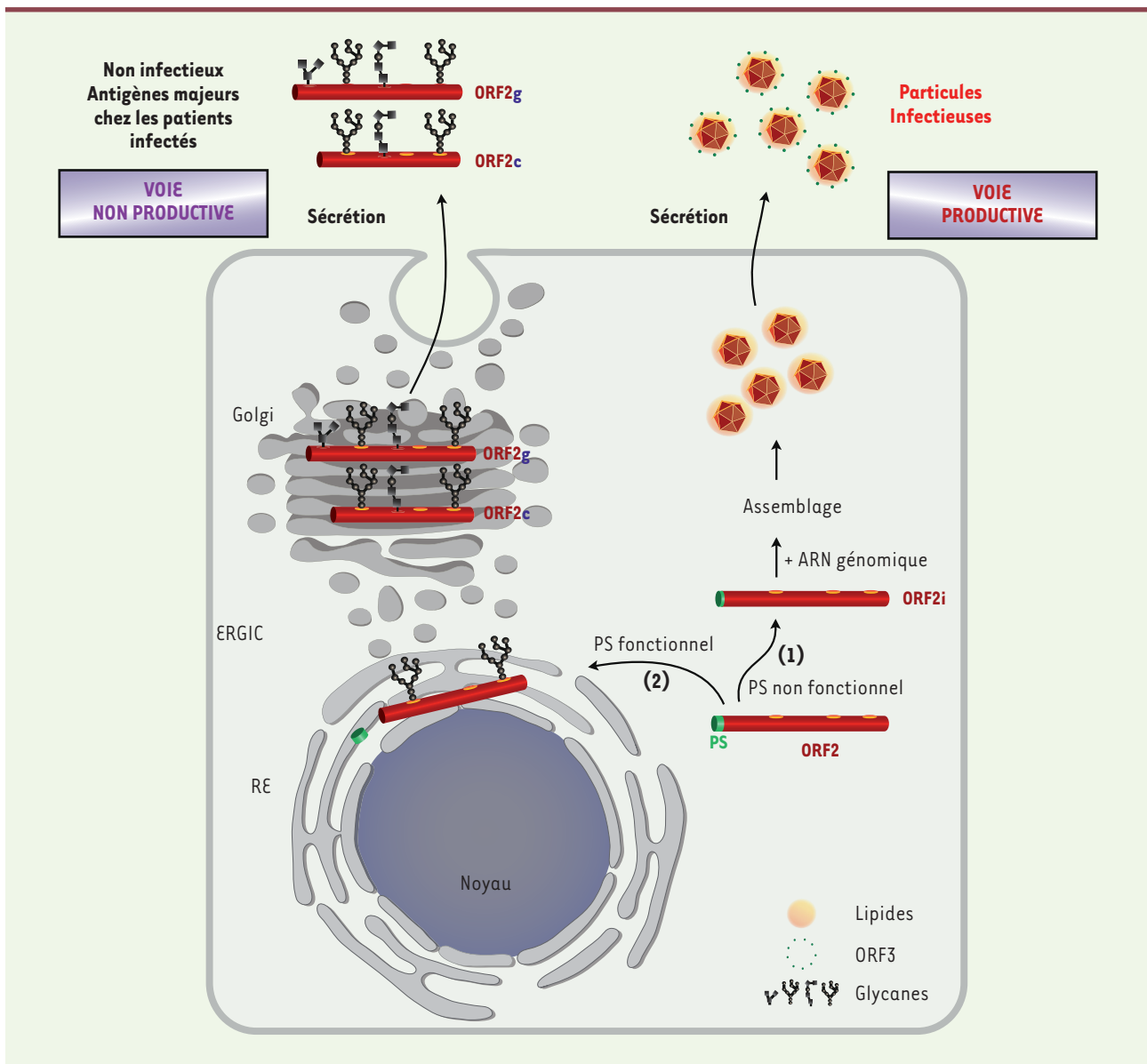


Figure 3. Modèle des voies de production de la protéine de capsid ORF2. La protéine ORF2 pourrait suivre deux voies différentes après sa synthèse. **1.** Une voie productive minoritaire dans laquelle une fraction de la protéine ORF2 possède un peptide signal (PS) non fonctionnel et resterait localisée du côté cytosolique. Elle sert alors à encapsider le génome viral pour former des virions qui sont ensuite sécrétés. Cette protéine ORF2 associée aux particules virales est appelée ORF2i. **2.** Une voie non productive majoritaire dans laquelle une fraction importante de la protéine ORF2 (ORF2g) possédant un PS fonctionnel est transloquée dans la lumière du RE pour suivre la voie de sécrétion classique des protéines. Elle y subit des modifications post-traductionnelles telles que la N-glycosylation, la O-glycosylation et la sialylation. La protéine ORF2g est ensuite partiellement clivée pour produire l'ORF2c. Les protéines ORF2g et ORF2c ne forment pas de particules virales et sont sécrétées en très grandes quantités dans le sérum des patients infectés par le HEV. ORF2g : ORF2 glycosylée ; ORF2c : ORF2 clivée ; ORF2i : ORF2 infectieuse/intracellulaire ; ERGIC : *ER-Golgi intermediate compartment*.

lysosomes libérant la capsid [23]. Après décapsidation, dont le mécanisme reste inconnu, l'ARN viral serait alors libéré dans le cytosol où il serait traduit par la machinerie cellulaire pour produire la réplicase ORF1. L'ORF1 serait à l'origine de 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(+) génomiques de 7,2 kb, mais également des ARN sous-génomiques de 2,2 kb, ensuite *cappés* (coiffés) et polyadénylés. Les ARN sous-génomiques de polarité (+) sont traduits en protéines ORF2 et ORF3. ORF2 est massivement produite et pourrait suivre deux voies [9] (Figure 3) : (1) une voie majeure non-productive,

dans laquelle la protéine est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et suivrait la voie de sécrétion où elle est glycosylée et clivée. Cette voie conduit à la production des formes non infectieuses ORF2g et ORF2c, 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 (ce site n'étant pas défini à ce jour). ORF3, par son activité de viroporine et en interagissant avec différents facteurs cellulaires, favoriserait les étapes tardives du cycle infectieux et la sécrétion des particules virales [30]. Les virions néoformés seraient alors libérés dans le milieu extracellulaire par un mécanisme qui reste à définir mais qui ferait intervenir ORF3 et la voie de sécrétion des exosomes [20, 24, 31-33]. Seules des eHEV sont produites en système de culture cellulaire ou présentes dans le sérum de patients infectés [9]. Il semble donc qu'il puisse exister, dans le tractus intestinal, un processus de délipidation par les acides biliaires et des protéases digestives, plutôt qu'une production naturelle de particules nues.

Les modèles d'étude du HEV

En raison de l'absence, pendant des années, d'un système efficace de culture cellulaire pour produire le HEV, différents outils permettant l'étude des protéines virales ou de certaines étapes du cycle infectieux ont été développés.

Des systèmes d'expression hétérologue ont été particulièrement utilisés. Notamment, la protéine de capsid ORF2 a été essentiellement étudiée en exprimant des formes tronquées dans des cellules d'insectes ou dans la bactérie *Escherichia coli*. Ces études ont permis de réaliser des analyses structurales et fonctionnelles de la capsid virale.

Des réplicons, des unités autonomes de répliation pour lesquelles les ORF2 et 3 sont remplacés par le gène codant une protéine rapporteuse, telle que la GFP (*green fluorescent protein*) ou la luciférase, sont également particulièrement utiles pour l'analyse de la répliation du HEV [34].

Des anticorps spécifiques des trois protéines virales ont également été produits. Les anticorps anti-ORF2 et anti-ORF3 permettent ainsi de détecter ces protéines en système d'expression hétérologue et infectieux. En revanche, les anticorps anti-ORF1 ne permettent de détecter ORF1, ou ses différents domaines, que lorsque la protéine est surexprimée *via* un vecteur d'expression plasmidique [35]. Aucun anticorps détectant ORF1 en système répliatif ou infectieux n'est disponible à ce jour.

Bien que plusieurs tentatives d'infection aient été initialement réalisées dans diverses lignées cellulaires, l'amplification du HEV en culture cellulaire s'est avérée très difficile (pour revue [36]). Le succès de l'amplification du HEV a été obtenu avec l'adaptation de souches de génotypes 3 et 4 à la culture cellulaire, les génotypes 1 et 2 restant difficiles voire impossibles à amplifier. En effet, une souche de génotype 3, puis une souche de génotype 4, ont été adaptées par

Tanaka *et al.* à des cultures de cellules d'hépatome humain (PLC/PRF/5) et d'adénocarcinome pulmonaire (A549), et les mutations nécessaires à l'adaptation du virus ont été définies. En 2011, la souche Kernow-C1, de génotype 3, provenant d'un patient chroniquement co-infecté par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et le HEV a été identifiée pour sa capacité à infecter des lignées cellulaires d'origine humaine, porcine ou de cerf, après six passages en série (Kernow-C1 p6). La capacité accrue de la souche Kernow-C1 p6 à se réplier *in vitro* a pour origine une insertion de 57 aa provenant de la protéine ribosomale humaine S17 au sein du domaine HVR de l'ORF1 du virus. Cette souche recombinante (Kernow-C1 p6) contenant la S17 était présente dans l'échantillon fécal originel du patient. Après six passages en série sur des cellules d'hépatome humain (HepG2/C3A), elle est devenue dominante grâce à sa capacité de propagation plus efficace que les autres souches virales présentes dans l'échantillon. L'insertion de la S17 dans une souche de génotype 1 (Sar55) augmente également de façon significative la capacité de ce génotype à être transfecté dans des cellules de hamster BHK-21. Une autre souche de génotype 3 (LBPR-0379) a été identifiée pour son avantage de croissance en culture cellulaire ; elle présente une insertion de la protéine ribosomale S19 dans le domaine HVR de ORF1. Les mécanismes par lesquels ces insertions améliorent la répliation du HEV *in vitro* et élargissent le spectre d'hôtes du virus sont inconnus et sont d'un intérêt majeur. Ils démontrent la capacité du virus à muter en quasi-espèces et d'acquérir de nouvelles capacités au cours d'une infection chronique. Néanmoins, bien que ces systèmes aient permis de mieux appréhender le cycle infectieux du HEV, ils ne permettent de produire que des titres infectieux faibles, limitant les analyses biochimiques directes des protéines virales et des particules infectieuses. Très récemment, un système utilisant la souche Kernow-C1 p6 et les cellules PLC3, un sous-clone de la lignée PLC/PRF/5, a été décrit [9]. Dans ce système, la protéine ORF2 est produite de manière très précoce et en grandes quantités, et des particules infectieuses sont produites rapidement, dès 4 jours après la transfection. L'amplification puis la purification des particules sur gradient ou cousin d'iodixanol ont permis d'obtenir des titres viraux importants (1 à 5 x 10⁶ FFU [*focus forming units*]/ml) et de déterminer l'ultrastructure des particules virales. C'est ainsi qu'il a pu être montré que les particules produites en culture cellulaire (HEVcc) présentaient une morphologie similaire à celle des particules isolées à partir de patients infectés [9].



Des essais d'infection d'hépatocytes primaires, humains ou de macaques, ont également été réalisés avec succès [37-39]. Des hépatocytes issus de cellules souches pluripotentes constituent également un bon modèle d'étude du HEV, notamment pour des souches virales primaires non adaptées à la culture cellulaire. Ces cellules semblent physiologiquement plus appropriées pour l'étude de souches primaires et pour l'analyse de la réponse immunitaire et des voies de signalisation induites par l'infection HEV [40, 41].

La compréhension des mécanismes de la pathogenèse du HEV nécessite l'utilisation de modèles animaux. L'infection par HEV est généralement asymptomatique chez la plupart des hôtes zoonotiques qui sont de ce fait peu utilisables en laboratoire. Les primates non humains, comme les singes macaques *cynomolgus* et *rhésus*, ont été utilisés avec succès pour étudier la réponse immunitaire à l'infection. Ces modèles sont cependant coûteux et leur utilisation pose des problèmes éthiques. Des modèles de souris au foie humanisé ont récemment été développés [30]. Ceux-ci peuvent se révéler intéressants pour étudier certains aspects de l'infection virale. Cependant, ces souris sont immuno-incompétentes et la reconstitution d'un système immunitaire actif serait nécessaire afin d'évaluer le rôle de la réponse immunitaire dans la pathogenèse de l'infection [44] (→).

De nombreux outils ont donc été récemment développés pour étudier le HEV. Ils posent ainsi les jalons qui permettront de mieux comprendre le cycle infectieux et la pathogénicité du virus. Des avancées notables ont été réalisées dans la caractérisation des protéines du HEV, notamment de sa protéine de capsid ORF2. Cependant, l'abondante sécrétion de cette protéine sous une forme non associée à du matériel infectieux interroge quant à son rôle potentiel dans le contrôle de la réponse immunitaire. Certaines étapes clés du cycle infectieux du virus restent également à caractériser, notamment les facteurs cellulaires impliqués dans son entrée. Finalement, l'identification de formes chroniques chez les personnes immunodéprimées devrait conduire à évaluer les effecteurs de la réponse immunitaire impliqués dans le contrôle de cette infection virale. ♦

SUMMARY

The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself

The first cause of acute hepatitis in the world is due to the hepatitis E virus (HEV). This infection has long been considered as a problem only affecting developing countries. However, since the identification of zoonotic forms at the end of the last century, it has become clear that this infection also affects industrialized countries. The recent renewed interest in HEV has revealed some particularities in this virus. Indeed, although considered as a non-enveloped virus, the HEV viral particle is surrounded by a lipid membrane in the bloodstream. In addition, HEV secretes abundantly into the bloodstream non-infectious forms of its capsid protein that could serve as an immunological bait. This review summarizes recent advances on this virus for which the number of diagnosed cases increases every year. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions *Sophana Ung* pour son aide technique. *Maliki Ankavay* est allocataire doctoral de l'Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites virales (ANRS).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Aspinall EJ, Couturier E, Faber M, et al. Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro Surveill* 2017 ; 22.
- Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, et al. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses* 2016 ; 8 : 270.
- Pavio N, Merbah T, Thébaud A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infect Dis* 2014 ; 20 : 1925-7.
- Barnaud E, Rogée S, Garry P, et al. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* 2012 ; 78 : 5153-9.
- Kamar N, Izopet J, Pavio N, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2017 ; 3 : 17086.
- Pischke S, Hartl J, Pas SD, et al. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *J Hepatol* 2017 ; 66 : 1082-95.
- Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. *J Gen Virol* 2017 ; 98 : 2645-6.
- Bradley DW, Krawczynski K, Cook EH, et al. 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 virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 6277-81.
- Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, et al. Hepatitis E Virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology* 2018 ; 154 : 211-23.e8.
- Parvez MK. The hepatitis E virus nonstructural polyprotein. *Future Microbiology* 2017 ; fmb-2017-0016.
- Kanade GD, Pingale KD, Karpe YA. Activities of thrombin and factor Xa are essential for replication of Hepatitis E Virus and are possibly implicated in ORF1 polyprotein processing. *J Virol* 2018 ; 92 : 17-5.
- Guu TSY, Liu Z, Ye Q, et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 12992-7.
- Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 12986-91.
- Xing L, Li TC, Mayazaki N, et al. Structure of hepatitis E virus-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 33175-83.
- Tang X, Yang C, Gu Y, et al. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 10266-71.
- Yin X, Ying D, Lhomme S, et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 3 : 21345-12.
- Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, et al. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 2008 ; 153 : 1703-13.
- Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : 1147-52.
- Surjit M, Oberoi R, Kumar R, et al. Enhanced I microglobulin secretion from Hepatitis E Virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 8135-42.
- Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 2011 ; 92 : 269-78.
- Votteler J, Sundquist WI. Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Cell Host Microbe* 2013 ; 14 : 232-41.

RÉFÉRENCES

22. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 2013 ; 496 : 367-71.
23. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, et al. Distinct entry mechanisms for non-enveloped and quasi-enveloped hepatitis E virus. *J Virol* 2016 ; 90 : 4232-42.
24. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, et al. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 2009 ; 90 : 1880-91.
25. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, et al. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol* 2012 ; 86 : 5697-707.
26. Feng Z, Lemon SM. Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. *Trends in Microbiol* 2014 ; 22 : 59-64.
27. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, et al. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the Hepatitis E Virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol* 2009 ; 83 : 12714-24.
28. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, et al. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat* 2011 ; 19 : 436-48.
29. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, et al. Hepatitis E Virus enters liver cells through a Dynamin-2, Clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic* 2015 ; 16 : 398-416.
30. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, et al. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018 ; 15 : 96-110.
31. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol* 2014 ; 95 : 2166-75.
32. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, et al. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 2011 ; 92 : 2838-48.
33. Emerson SU, Nguyen HT, Torian U, et al. 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* 2010 ; 84 : 9059-69.
34. Emerson SU, Nguyen H, Graff J, et al. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 2004 ; 78 : 4838-46.
35. Lenggenger D, Gouttenoire J, Malehmir M, et al. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *J Hepatol* 2017 ; 67 : 471-9.
36. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol* 2012 ; 48 : 147-58.
37. Tam AW, White R, Yarbough PO, et al. In vitro infection and replication of Hepatitis E Virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 1997 ; 238 : 94-102.
38. Oshiro Y, Yasue H, Takahashi K, et al. Mode of swine hepatitis E virus infection and replication in primary human hepatocytes. *J Gen Virol* 2014 ; 95 : 2677-82.
39. Yin X, Li X, Ambardekar C, et al. Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006417.
40. Wu X, Thi VLD, Liu P, et al. Pan-genotype Hepatitis E Virus replication in stem cell-derived hepatocellular systems. *Gastroenterology* 2018 ; 154 : 663-74.
41. Helsen N, Debing Y, Paeshuyse J, et al. Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. *J Hepatol* 2016 ; 64 : 565-73.
42. Izopet J, Kamar N. Hépatite E. De la transmission zoonotique du virus à l'évolution chronique de l'infection chez l'immunodéprimé. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 1023-5.
43. Le Lay S, Carmen Martinez M, Andriantsitohaina R. Vésicules extracellulaires, biomarqueurs et bioeffecteurs du syndrome métabolique. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 936-43.
44. Gilgenkrantz H, Gouttenoire J, Mallet V. Un modèle murin pour une infection chronique méconnue : l'hépatite E ! *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 812-4.

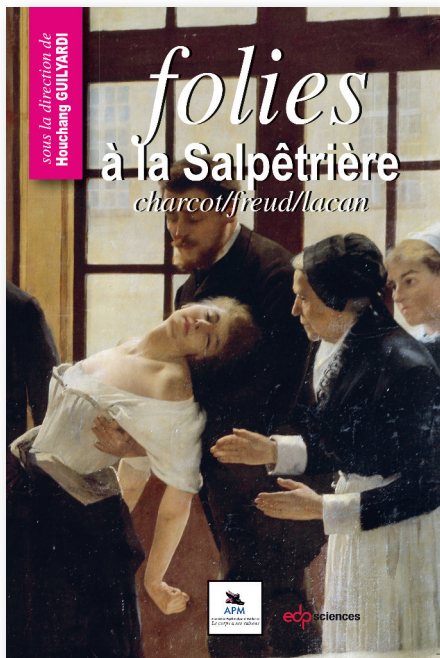
TIRÉS À PART
L. Cocquerel

Possédées du malin au Moyen-Âge, les sorcières hystériques sont vouées au bûcher. Enfermées au XVII^e siècle, maltraitées, elles rejoignent la Cour des Miracles de l'Hospice de la Vieillesse-Femmes à la Salpêtrière... Jusqu'à ce que le Dr Jean-Martin Charcot (1825-1893) mène le combat qui transforme l'ancien hospice en hôpital : l'École de la Salpêtrière de Paris est née, qui devient lieu de recherche, d'enseignement et de soins, de renommée internationale.

Jean Martin Charcot n'a pas bonne presse, et pourtant... Hystérie et folie traversent les siècles, prenant les formes de « l'air du temps ».

De l'utérus migrateur d'Hippocrate aux recherches neurologiques de Charcot. Du désir inconscient avec Freud à la jouissance du parlêtre chez Lacan... C'est à cette traversée historique et conceptuelle que nous convie cet ouvrage.

De l'utérus migrateur d'Hippocrate aux recherches neurologiques de Charcot. Du désir inconscient avec Freud à la jouissance du parlêtre chez Lacan... C'est à cette traversée historique et conceptuelle que nous convie cet ouvrage.



ISBN : 978-2-7598-1268-4

240 pages

20 €

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Folies à la Salpêtrière : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | Signature :

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

Résumé

Contexte

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

Objectif

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

Méthode

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

Résultats

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

Ma participation dans ce projet

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

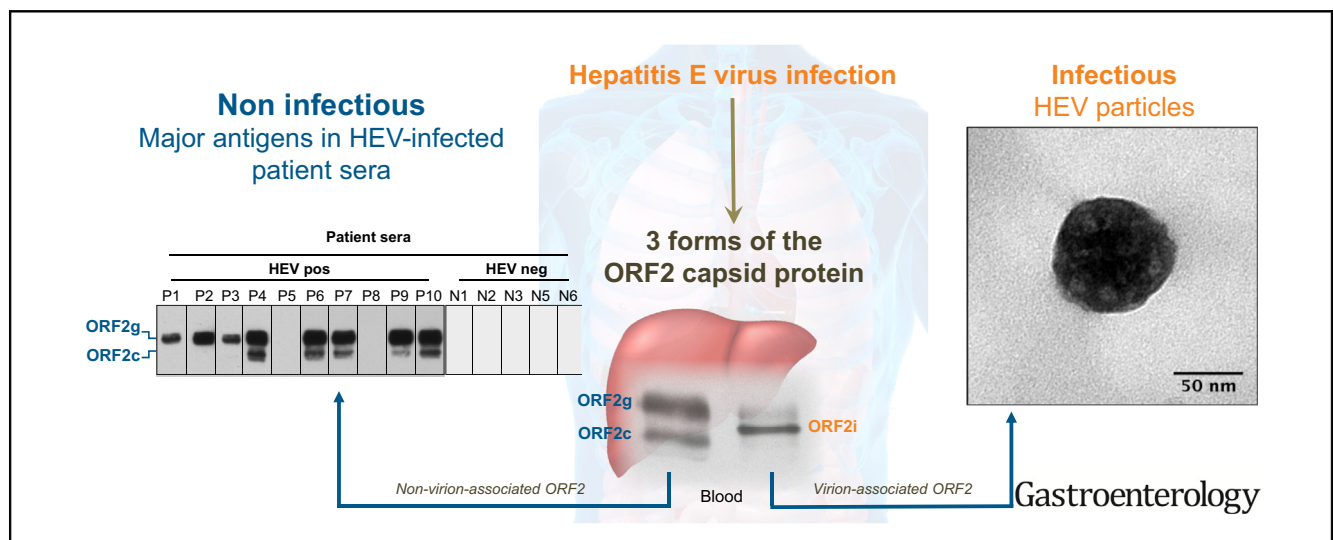
Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Gastroenterology* (IF 2017: 20,877) dans laquelle je suis sixième auteur (**Montpellier et al. 2018**).



Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein

Claire Montpellier,^{1,*} Czeslaw Wychowski,^{1,*} Ibrahim M. Sayed,^{2,3} Jean-Christophe Meunier,⁴ Jean-Michel Saliou,¹ Maliki Ankavay,¹ Anne Bull,⁴ André Pillez,¹ Florence Abravanel,⁵ François Helle,⁶ Etienne Brochot,⁶ Hervé Drobecq,⁷ Rayan Farhat,¹ Cécile-Marie Aliouat-Denis,¹ Juliano G. Haddad,¹ Jacques Izopet,⁵ Philip Meuleman,² Anne Goffard,¹ Jean Dubuisson,¹ and Laurence Cocquerel¹

¹University of Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR8204-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France; ²Laboratory of Liver Infectious Diseases, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Ghent University, Ghent, Belgium; ³Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Assiut University, Assiut, Egypt; ⁴Inserm-U966, University F. Rabelais, Tours, France; ⁵CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de virologie, National Reference Center for Hepatitis E, Toulouse, France; ⁶EA4294, Laboratoire de Virologie, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Centre Hospitalier Universitaire et Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France; ⁷University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161-M3T-Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, Lille, France



See Covering the Cover synopsis on page 7; see editorial on page 20.

BACKGROUND & AIMS: Hepatitis E virus (HEV) infection is a major cause of acute hepatitis worldwide. Approximately 2 billion people live in areas endemic for HEV and are at risk of infection. The HEV genome encodes 3 proteins, including the ORF2 capsid protein. Detailed analyses of the HEV life cycle has been hampered by the lack of an efficient viral culture system. **METHODS:** We performed studies with gt3 HEV cell culture-produced particles and patient blood and stool samples. Samples were fractionated on iodixanol gradients and cushions. Infectivity assays were performed in vitro and in human liver chimeric mice. Proteins were analyzed by biochemical and proteomic approaches. Infectious particles were analyzed by transmission electron microscopy. HEV antigen levels were measured with the Wantai enzyme-linked immunosorbent assay. **RESULTS:** We

developed an efficient cell culture system and isolated HEV particles that were infectious in vitro and in vivo. Using transmission electron microscopy, we defined the ultrastructure of HEV cell culture-produced particles and particles from patient sera and stool samples. We also identified the precise sequence of the infectious particle-associated ORF2 capsid protein. In cultured cells and in samples from patients, HEV produced 3 forms of the ORF2 capsid protein: infectious/intracellular ORF2 (ORF2i), glycosylated ORF2 (ORF2g), and cleaved ORF2 (ORF2c). The ORF2i protein associated with infectious particles, whereas the ORF2g and ORF2c proteins were massively secreted glycoproteins not associated with infectious particles. ORF2g and ORF2c were the most abundant antigens detected in sera from patients. **CONCLUSIONS:** We developed a cell culture system and characterized HEV particles; we identified 3 ORF2 capsid proteins (ORF2i, ORF2g, and ORF2c). These findings will advance our understanding of the HEV life cycle and improve diagnosis.

EDITOR'S NOTES

BACKGROUND AND CONTEXT

Although Hepatitis E virus (HEV) is the major leading cause of enterically transmitted viral hepatitis worldwide, particles and HEV life cycle have been poorly studied and characterized up to now.

NEW FINDINGS

The ultrastructure of HEV cell culture-produced particles and particles from infected patients was defined by electron microscopy. The precise sequence and three forms of the infectious particle-associated ORF2 capsid protein was identified.

LIMITATIONS

This study was limited to HEV genotype 3.

IMPACT

This study leads to major advances into the understanding of molecular mechanisms of the HEV lifecycle that have also a significant impact on HEV diagnosis.

Keywords: Hepatitis E; PLC/PRF/5 Cells; Infectious Particles; ORF2 Products.

Hepatitis E virus (HEV) is the leading cause of enterically transmitted viral hepatitis globally, and is responsible for 20 million infections and 70,000 deaths every year.¹ Although HEV infection is usually self-resolving, severe forms or chronic infections have been described, mainly in immunocompromised patients. A high rate of mortality has also been reported among pregnant women. HEV infection has also been associated with extrahepatic disorders, including renal and neurological disorders.² Four genotypes (gt) are pathogenic in humans. Gt1 and gt2 exclusively infect humans, whereas gt3 and gt4 are zoonotic and mainly infect animals that may transmit the virus to humans. Recently, gt3 infections have been emerging in the Western world, likely due to contaminated blood transfusions and the consumption of contaminated food.¹ The diagnosis of hepatitis E is based on the detection of anti-HEV antibodies and/or viral RNA in patient serum.³ Recently, a new assay based on detecting the HEV capsid protein antigen was developed (Wantai Biologicals, Beijing, China), especially for laboratories with no molecular diagnosis facilities.

HEV is a quasi-enveloped, positive-sense RNA virus expressing 3 open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2, and ORF3.¹ 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. ORF3 encodes a small multifunctional phosphoprotein involved in virion morphogenesis and egress. Although HEV is a nonenveloped virus in bile and feces, patient serum and cell culture-produced particles have been described to be associated with cellular lipids,

as for hepatitis A virus,⁴ and display the ORF3 protein at their surface.⁵

The growth of HEV in cell culture has been proven to be very difficult.⁵ However, several HEV strains have been adapted to cell culture, including the gt3 Kernow C-1 strain, which contains an insertion of a 58-amino acid (aa) human S17 ribosomal protein.⁶ Although these systems have led to increased understanding of the HEV life cycle, they still produce low infectious titers, limiting direct biochemical analysis of viral proteins and infectious material. Notably, the exact sequence of infectious particle-associated ORF2 protein is unknown. In addition, the ultrastructure of particles has never been robustly studied by immune electron microscopy.

In our study, we describe an HEV cell culture system that leads to early and massive expression of viral proteins and infectious particles, permitting their direct biochemical analysis. For the first time, we define the ultrastructure of HEV particles by electron microscopy and identify the precise sequence of the infectious particle-associated ORF2 capsid protein. We demonstrate that in infected cell culture and patients, at least 3 forms of the ORF2 capsid protein are produced. The 2 major ORF2 proteins are not associated with infectious particles, despite being the major antigens present in HEV-infected patient sera.

Materials and Methods

Chemicals and Cell Cultures

PLC/PRF/5 (CRL-8024), PLC1, PLC3, and A549 (CCL-185) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (DMEM/fetal calf serum) at 37°C. Transfected cells were maintained at 32°C in a medium containing DMEM/M199 (1 vol:1 vol), 1 mg/mL of lipid-rich albumin (Albumax I) and 40 nM Na₂SeO₃.

Plasmids and Transfection

Plasmids expressing the cell culture adapted gt3 Kernow C-1 strain (HEV-p6, GenBank accession number JQ679013) or the replicon expressing the *Gaussia* luciferase gene (HEV-p6GLuc) were provided by S.U. Emerson.⁶ The replication-deficient replicon HEV-p6GLucGAD was generated by mutating the GDD motif into the RNA-dependent RNA polymerase gene.⁷

*Authors share co-first authorship.

Abbreviations used in this paper: aa, amino acid; Ag, antigen; BFA, brefeldin A; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DT, sodium deoxycholate and trypsin treatment; ER, endoplasmic reticulum; ffu, focus forming unit; GLuc, *Gaussia* luciferase; GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin; gt, genotype; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus; HEVcc, cell culture-produced HEV particles; HEVser, HEV particles from patient serum; IC, immunocapture; Neura, neuraminidase; O-Gly, O-glycosidase; ORFs, open reading frames; PBS, phosphate buffered saline; p.e., post-electroporation; PHH, primary human hepatocytes; RT, room temperature; real time-qPCR, real-time-quantitative polymerase chain reaction; SP, signal peptide; TEM, transmission electron microscopy; WB, Western blotting.

Most current article

© 2018 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>

Capped RNA transcripts were generated with the mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Austin, TX). Capped RNAs were delivered to cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA).

Kinetics Experiments and Virus Production

PLC1 and PLC3 cells were electroporated with capped HEV-p6 RNA ($20 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ cells). For kinetics experiments, every 2 days, supernatants were harvested and cells were lysed in buffer containing 50 mM TrisHCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% (vol/vol) NP40, 0.05% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche, Basel, Switzerland). For virus production, cells were split every 10 days. Supernatants were collected and stored at -80°C .

Density Gradients

PLC3/HEV-p6 supernatant was concentrated with a Viva-spin ultrafiltration spin column (Sartorius, Gottingen, Germany). Concentrated supernatant or patient serum ($500 \mu\text{L}$) was layered on a 7.5% to 40% iodixanol gradient, which was centrifuged at $160,000g$ for 16 hours at 4°C . Twelve fractions of 1 mL were collected and their density was measured by refractometry. The HEV RNA titer was determined by real-time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Each fraction was used to infect A549 cells. Infectivity was determined by indirect immunofluorescence, immunoblotting, and RNA and viral titration. For patient samples, fractions were used for ORF2 probing, *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) pull-down, and RNA quantification.

Purification of Infectious Particles on Iodixanol Cushion

Supernatant of PLC3/HEV-p6 was concentrated by centrifugation through a 20% iodixanol cushion at $160,000g$ for 4 hours at 4°C . The cushion was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), ultracentrifuged a second time, and the pellet was resuspended in PBS.

Infection of Humanized Mice

Primary human hepatocytes were transplanted into homozygous uPA^{+/+}-SCID mice, as previously described.⁸ Humanized mice were inoculated via intrasplenic route with HEV-p6 purified on iodixanol gradient (fraction6, F6p6, 8.7×10^7 IU/mouse) or with the same volume of fraction6 from a control gradient prepared with concentrated supernatant of non-transfected PLC3 cells (F6 control). Nontransplanted mice inoculated with these preparations served as negative controls. A chimeric mouse inoculated with a gt1 (Sar55, 2.8×10^5 IU/mouse) stool suspension was used as a positive control.⁹ Stool and plasma samples were collected on a weekly basis. Viral RNA was detected and quantified in mouse plasma and stool using real time-qPCR, as described.⁹ Detection of ORF1 and ORF2 in F6p6 mouse samples was performed as described in the [Supplementary Material](#). Sequencing of the S17 region was performed as described.⁹

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The formvar-carbon TEM grids (S162; Oxford Instruments, Abingdon, UK) were either incubated with 0.01% poly-L-lysine

for 30 minutes at room temperature (RT) or with poly-L-lysine and then with anti-ORF3 (Bioss Antibodies, Woburn, MA), anti-ORF2 (1E6), or isotype-matched antibodies ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hour at RT. Grids were washed in PBS and incubated for 2 hours at RT with viral samples. TEM grids were washed in PBS and incubated for 20 minutes in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. Particles trapped on grids were stained with 0.5% uranyl acetate before examination under a JEOL-1230 TEM (JEOL, Peabody, MA). For delipidation, particles were either treated for 1 hour at 37°C with 1% sodium deoxycholic acid, 0.1% trypsin, then processed for TEM, or treated in the same conditions then layered on an iodixanol gradient. After determining density and RNA levels, fraction 11 was processed for TEM.

Glycosidase Digestions

Protein samples were denatured for 10 minutes at 95°C in glycoprotein denaturing buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA). Digestions with glycosidases were carried out for 4 hours at 37°C in the presence of 1% NP40 and the buffer provided by the manufacturer (New England Biolabs). Samples prepared in the same conditions but without glycosidase were used as controls.

GNA Pull-Down

Agarose-conjugated GNA beads were incubated for 2 hours at RT with 50 to $500 \mu\text{L}$ of patient serum or $100 \mu\text{L}$ of supernatant of PLC3/HEV-p6. Beads were washed 8 times with PBS 0.5% NP40. Proteins were eluted in Laemmli buffer and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Unconjugated agarose beads were used as a negative control.

Patient Samples

Patient samples were collected in France between 2012 and 2016. This was a noninterventional study. Samples were obtained only via standard viral diagnostics following a physician's order (no supplemental or modified sampling). Data were analyzed anonymously. The French Public Health Law (CSP Art L 1121-1.1) does not require written informed consent from patients for such a protocol.

Detection of HEV-Antigen (Ag)

Gradient fractions were diluted in PBS and Ag levels were measured with the Wantai HEV-Ag ELISA^{Plus} kit (Wantai Biological Pharmacy Enterprise) according to the manufacturer's instructions.

Results

Establishment of an Efficient HEV Cell Culture System

In an attempt to establish a cell culture system for HEV, we first analyzed HEV replication in 2 subclones of the PLC/PRF/5 cell line, namely PLC1 and PLC3 cells. We used the *Gaussia* luciferase (GLuc)-expressing HEV gt3 replicon named HEV-p6GLuc,⁶ in which the ORF2 coding sequence was replaced with the secreted GLuc sequence. Thus, the amount of secreted GLuc is proportional to viral RNA

synthesis and consequently to HEV replication. PLC1, PLC3, and parental PLC/PRF/5 cells were electroporated with HEV-p6GLuc RNA or with a nonreplicative HEV-p6GLuc genome (HEV-p6GLucGAD). The replication levels of HEV-p6GLuc steadily increased over time in the 3 cell lines (Figure 1A), but PLC1 and PLC3 cells showed higher HEV replication fold increase, as compared to PLC/PRF/5 cells. Experiments were thereafter conducted using PLC1 and PLC3 cells.

We assessed the ability of PLC1 and PLC3 cells to express viral proteins and produce infectious particles in kinetics experiments. PLC1 and PLC3 cells were electroporated with the HEV-p6 RNA strain.⁶ Immunofluorescence with anti-ORF2 and anti-ORF3 antibodies showed that more than 80% of cells expressed viral proteins (Figure 1B), indicating that PLC1 and PLC3 cells are highly transfectable, and that robust replication and expression of viral genome likely occur in these cells. It must be noted that ORF2 expression was inhibited in the presence of Sofosbuvir (Supplementary Figure 1), confirming the specificity of the signal.

We next analyzed the expression of ORF2 and ORF3 proteins in the cell lysates and supernatants of HEV-p6 electroporated PLC1 and PLC3 cells by Western blotting (WB) at different time points. Importantly, the ORF2 protein was detected in the cell lysates and supernatant of PLC1 cells as early as 2 and 4 days post-electroporation (p.e.), respectively (Figure 1C). In HEV-p6 electroporated PLC3

cells, expression of the ORF2 protein was slightly delayed. It must be noted that PLC3 cells grow more slowly than PLC1 cells, which could explain the observed differences. In addition to the major product of ORF2, ORF2-related proteins with lower molecular weights were also detected in cells and supernatants, indicating that the ORF2 capsid protein likely undergoes posttranslational modifications. The ORF3 protein was also early detected at 2 and 4 days p.e. in PLC1 and PLC3 cell lysates, respectively (Figure 1C). In contrast, the ORF3 protein was faintly detected in the supernatants of electroporated cells, indicating that this protein is mainly expressed intracellularly.

The major ORF2 product in the supernatant (Figure 1D, Sup) displayed a higher apparent molecular weight than the intracellular form (Figure 1D, Cells), suggesting that the highly secreted ORF2 protein likely undergoes post-translational modifications. Comparison of intracellular and extracellular ORF3 proteins showed that the secreted ORF3 protein migrated slightly faster than the intracellular protein (Figure 1D), likely reflecting differences in protein phosphorylation¹⁰ or undescribed modifications of the ORF3 protein.

Viral RNA and infectious particles were also monitored in the supernatants of transfected cells collected on different days p.e. HEV RNA levels were assessed by real time-qPCR. High RNA levels were detected as early as 2 days p.e. (Supplementary Table 1). RNA titers increased progressively and reached 1.1×10^8 and 3.3×10^7 copies/mL

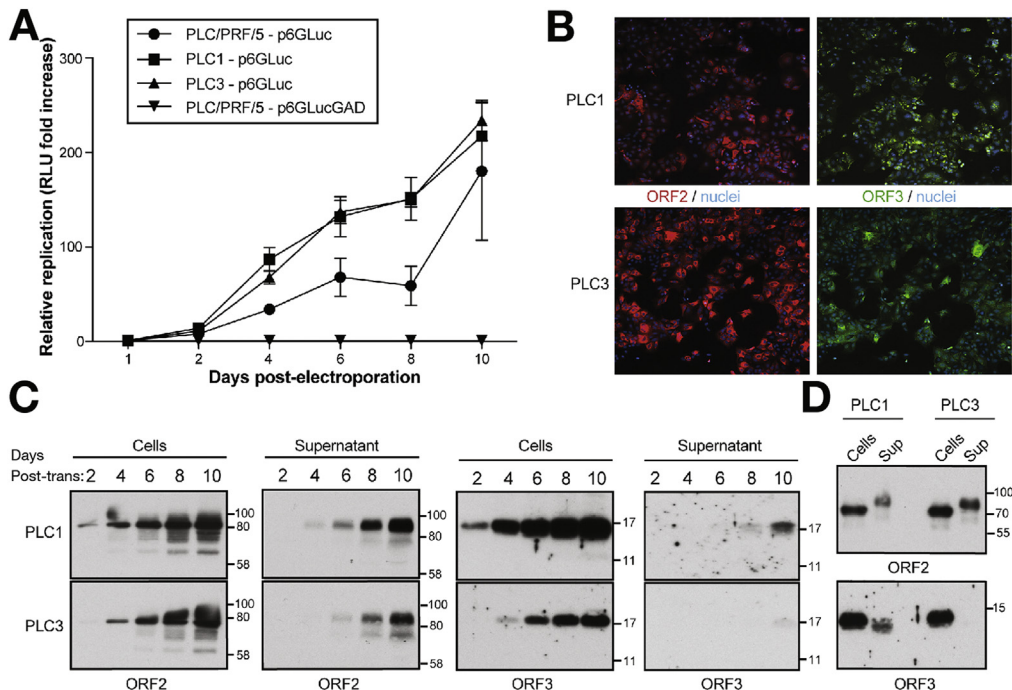


Figure 1. HEV replication and protein expression in transfected PLC/PRF/5-derived cells. (A) PLC/PRF/5, PLC1, and PLC3 cells were electroporated with the HEV-p6GLuc replicon. For each time point, values are presented as fold increase compared with luciferase activities measured at 24 hours p.e. Activities were normalized to intracellular activities. Data are representative of 3 independent experiments. (B) PLC1 and PLC3 cells were transfected with the infectious HEV-p6 RNA. Five days p.e., ORF2 (red) and ORF3 (green) protein expression was analyzed by immunofluorescence. Nuclei are shown in blue. (C) ORF2 and ORF3 protein expression in cell extracts and supernatants at different time points p.e. (D) ORF2 and ORF3 protein expression in cell extracts and supernatants harvested at 10 days p.e.

at day 10 for PLC1 and PLC3 cells, respectively (Supplementary Table 1). In parallel, infectious viral titers were determined and reached 7×10^3 and 1.5×10^3 focus forming unit (ffu)/mL for PLC1 and PLC3 cells, respectively.

These results indicate that assembly of infectious viral particles occurs very early and equally in HEV-p6 electroporated PLC1 and PLC3 cells. However, HEV infectivity represents 1.5×10^4 RNA copies/ffu for PLC1 cells and 2.2×10^4 RNA copies/ffu for PLC3 cells, indicating that the assembly of infectious HEV particles is likely an inefficient process. However, we cannot exclude the possibility that a viral or cellular inhibitor blocks HEV infection and biases the infectious titers. Further experiments were carried out using PLC3 cells.

ORF2 Capsid Protein Is Massively Produced But Only a Small Fraction Is Assembled Into Infectious Particles

To produce large amounts of infectious supernatants, we cultured HEV-p6 transfected PLC3 cells for 47 days. Supernatants were pooled, concentrated, and fractionated on an iodixanol gradient. The distribution of ORF2 protein, ORF3 protein, RNA, and infectious viral particles was analyzed from each fraction (Figure 2). ORF2 protein was detected from fractions 2 to 7 but more abundantly in fractions 3 to 5 (Figure 2A). As observed in the supernatants of transfected cells (Figure 1C), ORF2 protein in fractions 2 to 5 was detected as 2 products, 1 major product of approximately 90 kDa (ORF2g) and a smaller product of approximately 75 kDa (ORF2c). ORF2-related proteins with lower molecular weights were also detected at the top of the gradient in fractions 2 to 5, which might correspond to additional processed forms of the proteins. In contrast, the ORF2 protein was mainly detected as an 80-kDa product (ORF2i) in fractions 6 and 7, which corresponds to the size of intracellular ORF2 (Figure 1C). The ORF3 protein was exclusively detected in fractions 5 to 7 but most abundantly in fraction 6 (Figure 2A). Interestingly, only 1 major peak of RNA was detected in fraction 6, with a density of 1.10 g/mL (Figure 2B). Therefore, a large amount of capsid protein (fractions 2 to 4) was not associated with the viral RNA while the ORF3 protein was.

The infectivity of each fraction was analyzed by infecting A549 cells. Expression of ORF2 and ORF3 proteins was analyzed by WB (Figure 2C) and indirect immunofluorescence (Figure 2D and data not shown) 5 days postinfection. ORF2i and ORF3 proteins were detected in the lysates of cells infected with fractions 5, 6, and 7 (Figure 2C), suggesting that infectious particles were associated with these fractions. Indeed, immunofluorescence staining of A549 cells inoculated with fractions 5, 6, and 7 were positive for

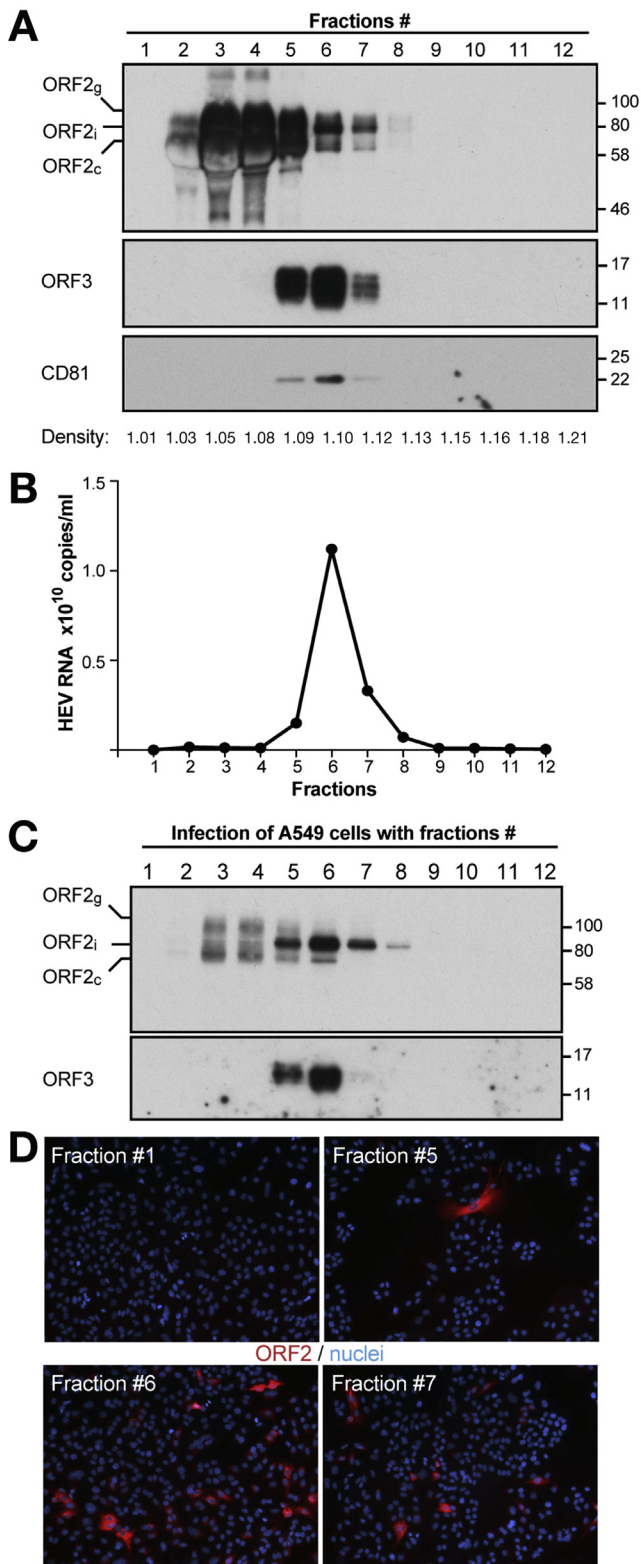


Figure 2. Density gradient of HEV-p6 transfected PLC3 cell supernatant. Concentrated PLC3/HEV-p6 cell supernatant was layered on an iodixanol gradient and ultracentrifuged. Twelve fractions were collected and their densities were measured. (A) Expression of ORF2, ORF3, and CD81 proteins analyzed by WB. (B) HEV RNA levels in each fraction measured by real time-qPCR. A549 cells were infected with an aliquot of each fraction. Five days postinfection, protein expression was analyzed by WB in infected cell lysates (C) and by immunofluorescence (D). For clarity, only some infections are shown.

ORF2 protein expression, whereas cells inoculated with fractions 1 to 4 and fractions 8 to 12 were negative (Figure 2D and data not shown). Fraction 6 showed the highest infectious titer (5×10^6 ffu/mL). Although ORF2g and ORF2c proteins were detected in cells inoculated with fractions 3 and 4 (Figure 2C), no specific infection was observed with these fractions by immunofluorescence (data not shown), indicating that ORF2g and ORF2c are likely very stable proteins binding to the cell surface that can be detected after several days of incubation.

It must be noted that the exosomal CD81 tetraspanin was detected in infectious fractions (Figure 2A), supporting the hypothesis that HEV particles likely exploit the exosomal secretory pathway for their egress.¹¹

Together, our results indicate that during the HEV life cycle, the ORF2 capsid protein is massively produced, but only a small fraction (ORF2i) is assembled into infectious particles that are secreted through the exosomal pathway.

Infection of Human Liver Chimeric Mice With Cell Culture-Produced HEV (HEVcc) Particles

Recently, human liver chimeric mice have been described as valuable models for studying in vivo chronic HEV infection and evaluating antiviral molecules.^{9,12-14} Establishment of HEV infection in chimeric mice was achieved after inoculation of gt1 or gt3 virions. However, inoculation of mice with nontreated cell culture supernatant-derived particles did not result in robust infection. Therefore, we next evaluated whether our HEVcc particles were able to infect primary human hepatocyte-transplanted mice.⁹ Chimeric mice were inoculated via intrasplenic route with either fraction 6 of HEV-p6 (F6p6) purified on iodixanol gradient (Figure 2) or fraction 6 of a control gradient prepared from nontransfected PLC3 cells supernatant (F6 control, neg 1) (Figure 3). A human chimeric mouse inoculated with a gt1 stool suspension (Sar55) was used as a positive control.⁹ A nontransplanted mouse inoculated with F6p6 was used as a second negative control (neg 2). Although to a lesser extent than the gt1-infected mouse, the F6p6-inoculated chimeric mouse still showed signs of active infection (Figure 3). Indeed, HEV RNA was detected in stools of F6p6-inoculated chimeric mouse from week 2 to 10 with a significant increase from week 8 to 10 (Figure 3A and B). Genomic HEV RNA was also detected in mouse liver (Figure 3C) and small intestine content (Figure 3D). RNA load in the F6p6-inoculated mouse increased more slowly as compared with the gt1-inoculated mouse, as previously described,⁹ but for the first time we demonstrate a robust infection of a chimeric mouse inoculated with HEV particles derived from cell culture supernatant.

Because HEV-p6 strain contains the human S17 ribosomal protein fragment that confers a growth advantage,^{6,15} we next sequenced this region of HEV-p6 from the F6p6-infected mouse (stool week 9 post-inoculation and 1 liver piece) and compared it with the inoculum. We did not find any reversion of adaptive mutations in the S17 region (data not shown).

Ultrastructure of HEV Particles

Recently, a new strategy based on the direct specific immunocapture (IC) of hepatitis C virus (HCV) particles on TEM grids led, for the first time, to the precise description of their ultrastructure.¹⁶ To define the morphology of HEVcc particles, which has never been precisely described, we used the same approach on isolated infectious particles. We first analyzed material captured on grids coated with poly-L lysine, a polycationic attachment factor. We observed a fairly homogeneous population of particles of 40 to 70 nm in size (Figure 4A). We next performed IC with an antibody specific to the ORF3 protein that had been described as exposed on lipid-associated HEV particles. We observed particles with an apparent internal icosahedral substructure likely corresponding to the capsid (Figure 4A). The calculation of size distribution showed that particle sizes ranged from 40 to 70 nm. In contrast, no particles were observed when an anti-ORF2 (1E6) (Figure 4A) or isotype control antibodies (data not shown) were used. However, when viral preparation was first partially delipidated by sodium deoxycholate and trypsin (DT) treatment before IC with the anti-ORF2 antibody, 2 populations of particles were immunocaptured: a major population consisting of particles of 30 to 50 nm in size and a more heterogeneous population with particles of 90 to 140 nm (Figure 4B). Thus, DT treatment unmasked the 1E6 epitope on viral particles and led to IC of small HEV particles that likely correspond to naked virions. However, DT treatment did not fully remove ORF3 and associated lipids because some particles were still captured by an anti-ORF3 antibody (Figure 4B). The larger size of these particles is likely due to dissociation of their lipid coats. In contrast, when DT-treated particles were purified on density gradient before IC (Figure 4C, Fraction F11), a highly homogeneous population of particles of approximately 32 nm was immunocaptured with 1E6, whereas no particles were captured by IC anti-ORF3. These particles, with a density of 1.18 g/mL, displayed an icosahedral structure likely corresponding to naked capsids.

We next analyzed the ultrastructure of authentic particles from three HEV-infected patient sera (HEVser). As for HEVcc, no particles were observed by IC anti-ORF2 or IC with irrelevant antibodies (data not shown). In contrast, IC anti-ORF3 resulted in the efficient isolation of pleomorphic populations. HEVser1 and HEVserST-1 particles had a similar morphology to HEVcc particles, whereas HEVser2 particles displayed a thick outer layer likely corresponding to lipids (Figure 5A). The calculation of size distribution of immunocaptured particles showed that the mean and median diameters of HEVser particles were generally larger than those of HEVcc particles and differed between patients (Figure 5B). Particles from HEVser2 were the largest with a mean diameter of 120 nm. These results suggest that additional components, which could be the lipid content of particles, likely determine particle size, as described for HCV particles.¹⁶ However, further investigations will be needed to further characterize HEV particles from patients.

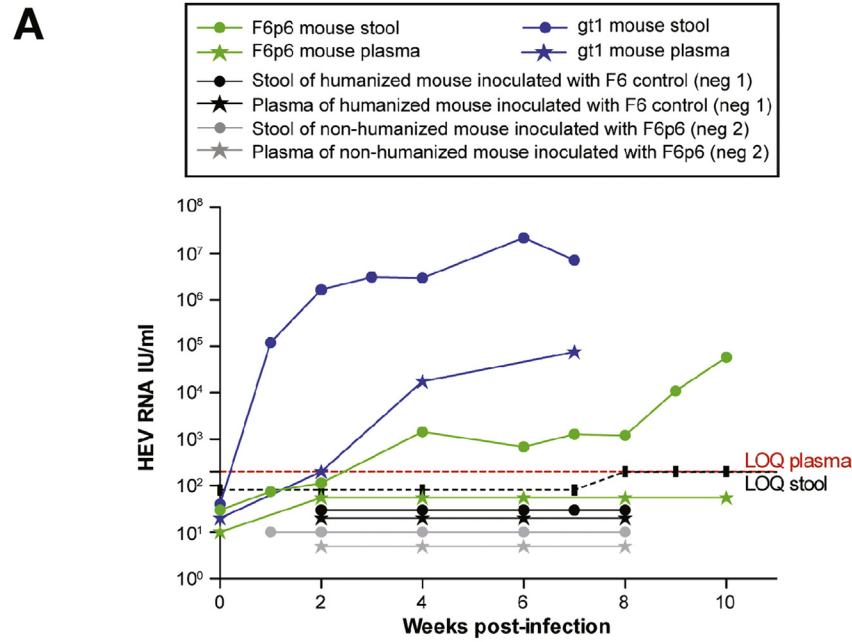
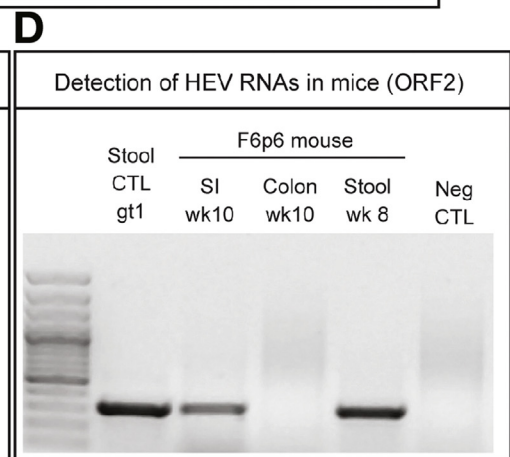
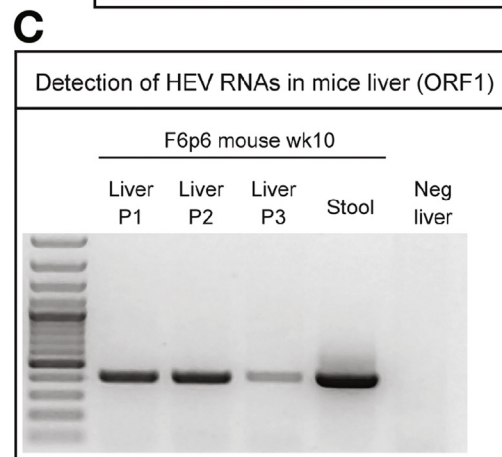
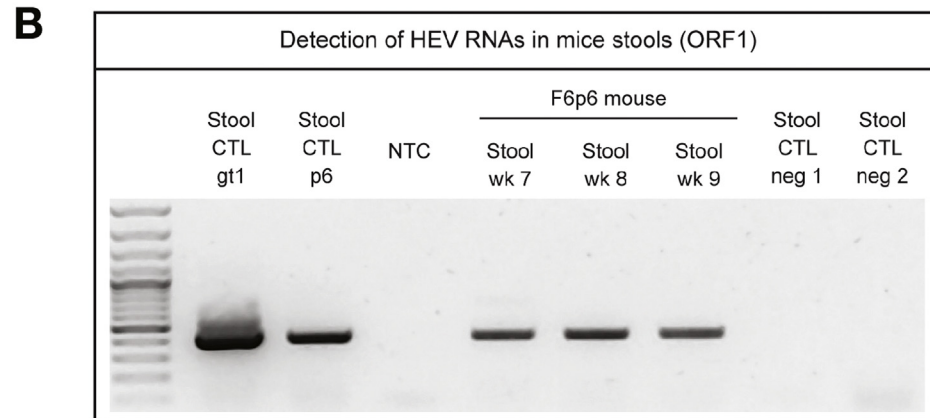


Figure 3. Infection of humanized mice with HEVcc. Primary human hepatocyte-transplanted mice were inoculated by intrasplenic route with either fraction 6 of HEV-p6 purified on iodixanol gradient (F6p6) or fraction 6 of a control gradient prepared from the supernatant of nontransfected PLC3 cells (F6 control, neg1). A human chimeric mouse inoculated with a gt1 (Sar55) stool suspension was used as a positive control. A non-transplanted mouse inoculated with F6p6 was used as a second negative control (neg2). (A) The levels of plus strand-HEV RNAs (IU/mL) were quantified by real time-qPCR in mouse stools and plasma at different time points after inoculation. Standard deviations (SDs) were omitted for clarity. LOQ, limit of quantification. Detection of RNAs by using ORF1 primers in mice stools (B) and liver (C). Stool CTL p6 was from a chimeric mouse inoculated with a p6 cell lysate.⁹ (D) Detection of RNAs by using ORF2 primers. CTL, control; NTC, nontemplate control; neg, negative; P1, piece 1; SI, small intestine.



Last, we analyzed the ultrastructure of stool particles from the ST-1 HEV-infected patient. In contrast to HEVcc and HEVser, stool particles were captured by IC anti-ORF2, whereas no particles were captured by IC anti-ORF3 (Figure 5C). Although particles appeared to be entangled in impurities limiting calculation of size

distribution, the mean diameter of HEV stool particles was 28 nm, which is in accordance with previous observations.¹⁷ As for delipidated HEVcc, stool particles displayed an icosahedral structure likely corresponding to naked capsids. No particles were captured from noninfected patient stools.

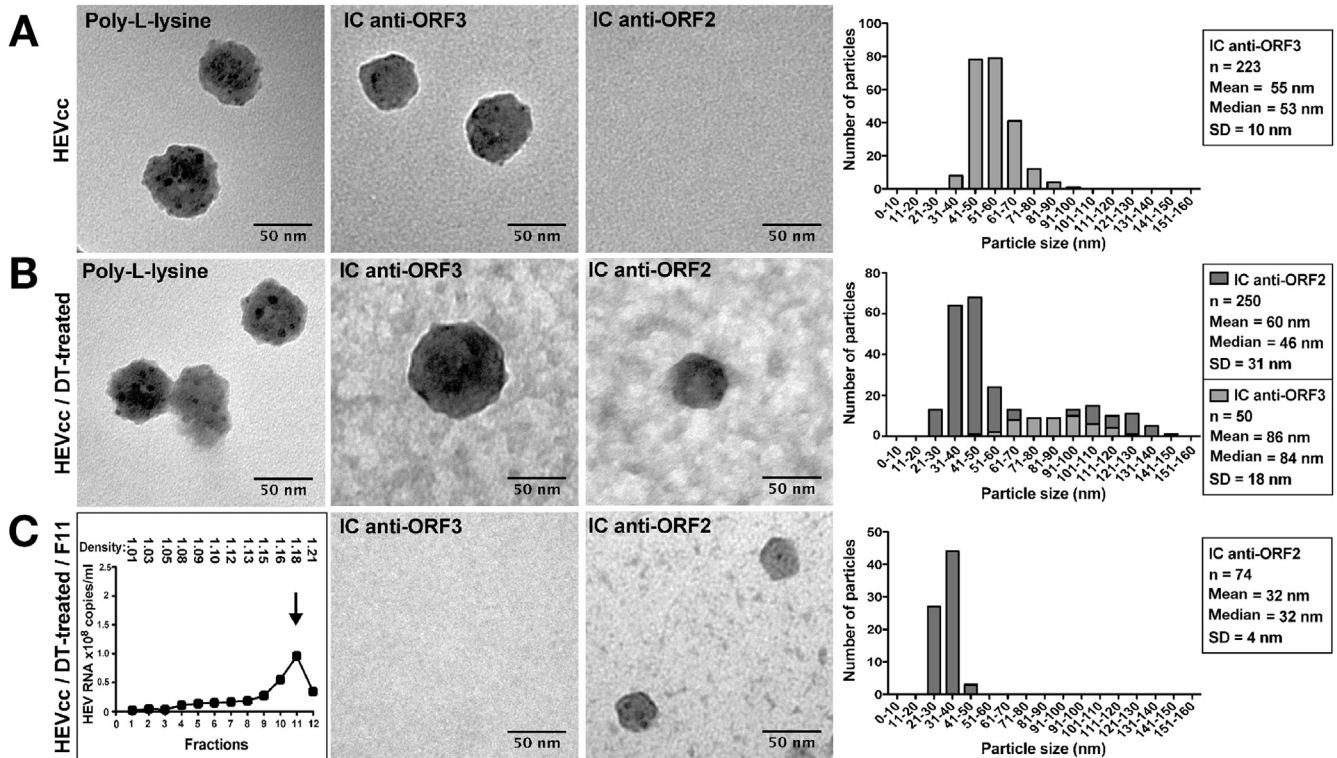


Figure 4. Ultrastructure of HEVcc. Representative electron micrographs of particles immobilized on poly-L-lysine or immunocaptured (IC) with anti-ORF3 or anti-ORF2 antibodies. Histograms on the right show the immunocaptured particle size distribution for the indicated antibody. Mean, median, and standard deviations of particle diameters are indicated in the boxes. Grids were prepared with HEVcc (A) or with HEVcc treated with 1% sodium deoxycholic acid and 0.1% trypsin (DT) (B). In (C), DT-treated particles were purified on density gradient. The infectious fraction containing the highest level of HEV RNAs (F11) and with a density of 1.18 g/mL, was used for IC. Particles were stained with uranyl acetate dihydrate and observed using a JEOL-1230 electron microscope. Scale bars are indicated.

Characterization of the Different Forms of ORF2 Protein

We developed a purification system using a 20% iodixanol cushion to easily separate infectious particles (ORF2i, Figure 6A, Pellet) from ORF2g/ORF2c proteins that are not associated with infectious particles (Figure 6A, Top).

HEV produces large amounts of secreted ORF2g/ORF2c proteins that are likely glycosylated/processed forms of the ORF2 protein. In contrast, infectious particle-associated ORF2 protein (ORF2i) purified by iodixanol gradient (F6p6) or cushion (Pellet/Cushion) displayed the same size as intracellular ORF2 protein (Cells) (Figure 6B), indicating that ORF2i likely does not undergo posttranslational modifications.

Because the ORF2 protein sequence contains 3 potential sites for N-linked glycosylation and multiple sites for O-linked glycosylation, we next analyzed the sensitivity of ORF2 proteins to treatment with different glycosidases (Figure 6C). Endoglycosidase H cleaves within the chitobiose core of high mannose and some hybrid oligosaccharides from N-glycoproteins. Peptide-N-glycosidase F cleaves between the innermost N-acetyl glucosamine and asparagine residues of high mannose, hybrid and complex oligosaccharides from N-glycoproteins. O-Glycosidase (O-Gly) catalyzes the removal of some O-linked disaccharides.

Neuraminidase (Neura) catalyzes the hydrolysis of sialic acid residues from N- and O-glycoproteins. It should be noted that terminal sialic acids block the action of O-Gly. The ORF2i protein expressed from cell lysates or purified HEV particles was resistant to glycosidase digestions (Figure 6C), indicating that this protein is not N- or O-glycosylated. In contrast, secreted ORF2g/ORF2c proteins were sensitive to digestion with endoglycosidase H and peptide-N-glycosidase F glycosidases, as attested by the mobility shift on treatment, indicating that these proteins are N-glycoproteins. ORF2g/ORF2c proteins were resistant to O-Gly treatment but sensitive to treatment with Neura and more markedly to a combination of Neura and O-Gly. These results indicate that ORF2g/ORF2c proteins are sialylated and O-glycosylated proteins. Importantly, ORF2g/ORF2c proteins were precipitated by a Galanthus Nivalis Agglutinin (GNA) pull-down, a lectin that interacts with high-mannose-type glycans confirming the oligomannosidic nature of ORF2g/ORF2c N-glycans (Figure 6D) and allowing the easy and specific precipitation of ORF2g/ORF2c proteins.

We demonstrated that secreted ORF2g/ORF2c are glycosylated proteins, indicating that these proteins go through the secretory pathway. However, ORF2g/ORF2c proteins were not detected at the intracellular level. We

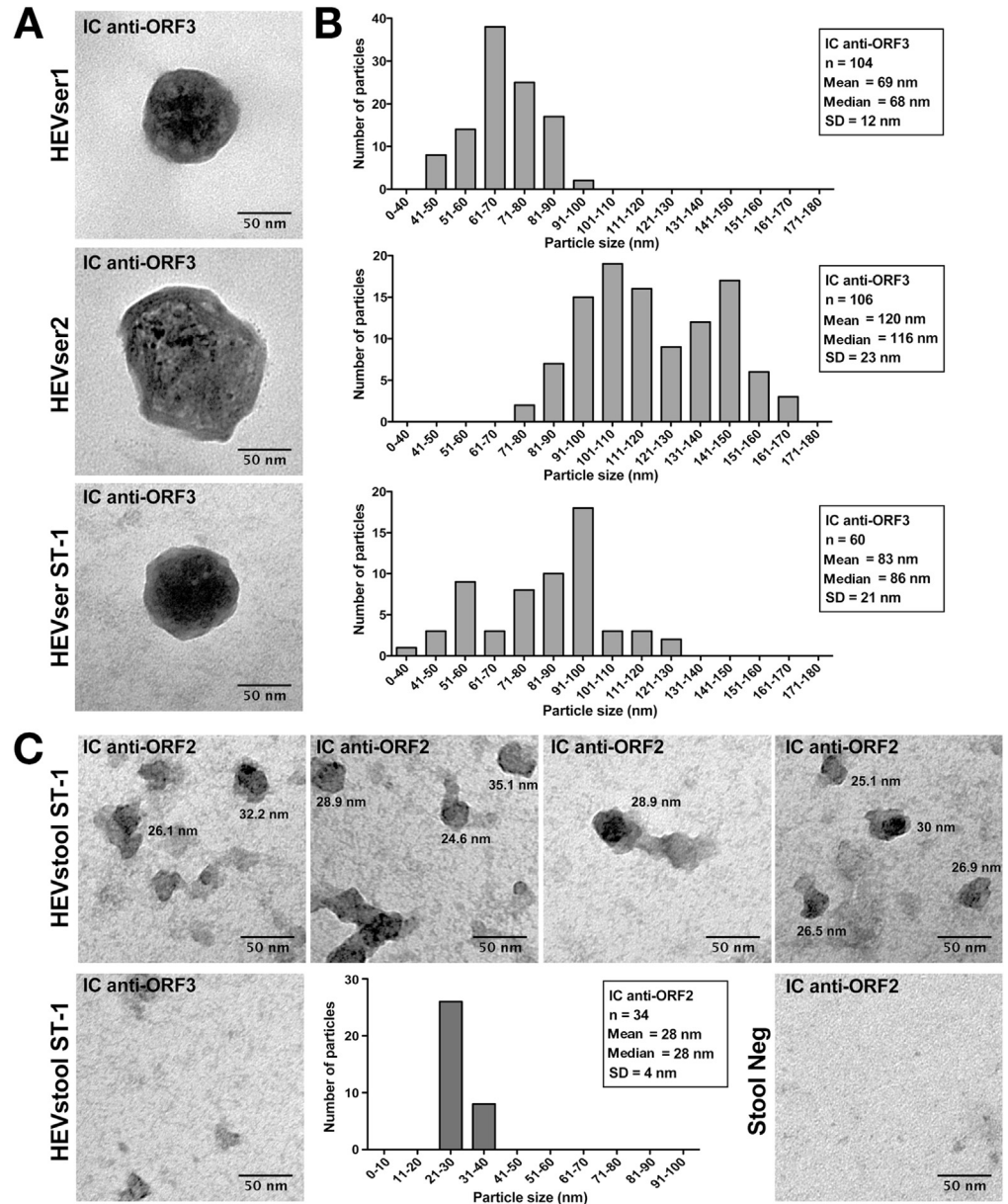


Figure 5. Ultrastructure of HEV particles from patient sera and stool. (A) Representative electron micrographs of IC anti-ORF3 with particles from 3 HEVser. (B) Histograms show the immunocaptured particle size distribution. Mean, median, and standard deviation (SD) of particle diameters are indicated in the boxes. (C) Representative electron micrographs of IC anti-ORF3 and IC anti-ORF2 of particles from HEV-infected patient stools (HEVstool) and noninfected patient stools (Stool neg). Scale bars and particle sizes are indicated.

therefore hypothesized that ORF2g/ORF2c proteins might move rapidly through the secretory pathway and be secreted quickly without intracellular accumulation. We thus treated HEV-p6 expressing PLC3 cells with Brefeldin A (BFA), a protein secretion inhibitor¹⁸ (Figure 6E). Upon BFA treatment, secretion of ORF2g/ORF2c proteins was blocked. Interestingly, a diffuse band likely corresponding to ORF2g and a faint band likely corresponding to ORF2c were detected in the lysate of BFA-treated cells, indicating that upon protein secretion blocking, ORF2g/ORF2c proteins accumulate in the cell, thus validating our hypothesis.

We next analyzed the sequence of ORF2 proteins by mass spectrometry. Viral particles purified on iodixanol cushion and ORF2g/ORF2c proteins immunoprecipitated with an anti-ORF2 antibody (4B2) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The

Colloidal blue-stained bands corresponding to ORF2i, ORF2g, and ORF2c in WB (Supplementary Figure 2) were digested in-gel with trypsin or AspN and then analyzed by nano scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Identified peptides and sequence covering are shown in Supplementary Figure 2. For the 3 proteins, the C-terminal end was fully covered, demonstrating the absence of processing at their C-termini. For ORF2i protein, a semi-tryptic peptide covering half of the signal peptide (SP) was unexpectedly identified (Supplementary Figure 2A, dashed line), suggesting that the SP of ORF2i might not be cleaved. For ORF2g, tryptic and semi-AspN peptides starting with Ser³⁴ were identified, suggesting that the first aa of the ORF2g protein might correspond to Ser³⁴ (Supplementary Figure 2B). For ORF2c, tryptic peptides starting with Iso²³⁴ were identified, suggesting that the first aa of the ORF2c protein might correspond to one of the aa in

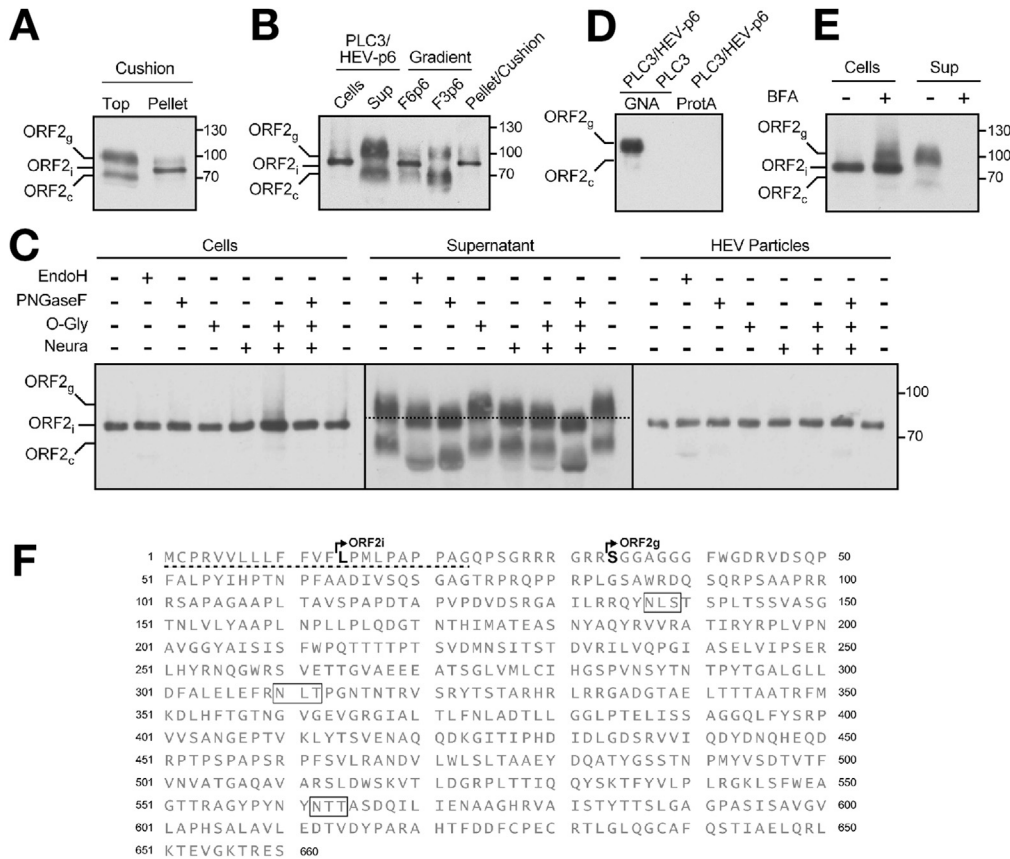


Figure 6. Characterization of the different ORF2 products. (A) Detection by WB of ORF2 proteins in the top and pellet of the PLC3/HEV-p6 cell supernatant purified onto iodixanol cushion. (B) Comparison of ORF2 products expressed in the cell lysates and supernatant of PLC3/HEV-p6 cells, in infectious fraction 6 (F6p6) and noninfectious fraction 3 (F3p6) from iodixanol gradient, and in the pellet of PLC3/HEV-p6 cell supernatant purified on the iodixanol cushion. (C) PLC3/HEV-p6 cell lysate, supernatant and purified HEV particles were denatured and digested with indicated glycosidases (+) or not (-). The *dashed line* shows the migration shift of ORF2 proteins following glycosidase treatment. (D) ORF2 protein detection after incubation of the supernatant of PLC3/HEV-p6 or PLC3 cells with GNA- or ProteinA-conjugated agarose beads. (E) PLC3/HEV-p6 cells were treated (+) or not (-) with BFA (16 hours, 1 μ g/mL) and the ORF2 protein expression in cells and supernatant was analyzed. (F) Sequence of ORF2 proteins analyzed by nano scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The *dashed line* corresponds to the signal peptide. *Frames* indicate potential N-glycosylation sites. The first aa of ORF2i and ORF2g identified by TMPP-Ac-OSu labeling are in *bold*.

proximity to Iso²³⁴ (Supplementary Figure 2C). Because semi-tryptic and semi-AspN peptides correspond to either natural protein processing or nonspecific proteolytic events during proteomics analyses, we further performed labeling with N-succinimidylloxycarbonylmethyl tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium bromide (TMPP-Ac-OSu), which binds specifically to the N-terminus of intact proteins.¹⁹ Peptides identified with TMPP-Ac-OSu modification confirmed that the first aa of ORF2i and ORF2g corresponds to Leu¹⁴ and Ser³⁴, respectively (Figure 6F, Supplementary Figures 2 and 3). In contrast, as TMPP-Ac-OSu labeling did not identify the first aa of ORF2c, further studies are necessary to clarify this observation. Together, these data indicate that the ORF2g protein loses its SP and is likely processed by secretory pathway proteases. In contrast, the ORF2i protein is not processed by a signal peptidase and therefore likely not translocated into the endoplasmic reticulum (ER) lumen.

ORF2g/ORF2c Proteins Are the Major Antigens in HEV-infected Patient Sera

Because we demonstrated that in cell culture, HEV mainly produces glycosylated forms of ORF2 proteins that are not associated with infectious particles, we next sought to determine whether the same occurs in infected patients. Sera from 10 patients chronically infected with HEV and from 5 HEV-negative patients were precipitated by GNA pull-down and probed for the ORF2 protein (Figure 7A), as described previously. GNA-pulldown of PLC3/HEV-p6 supernatant was used as a positive control. Strikingly, 8 and 5 of 10 HEV-positive sera displayed large amounts of the ORF2g and ORF2c proteins, respectively. ORF2 proteins were not detected in HEV-negative sera. In addition, the detection of ORF2g/ORF2c proteins was dependent neither on the patient's HEV strain nor on the serum viral load (Supplementary Table 2). Importantly, fractionation of a patient serum (P6 patient) on an iodixanol gradient

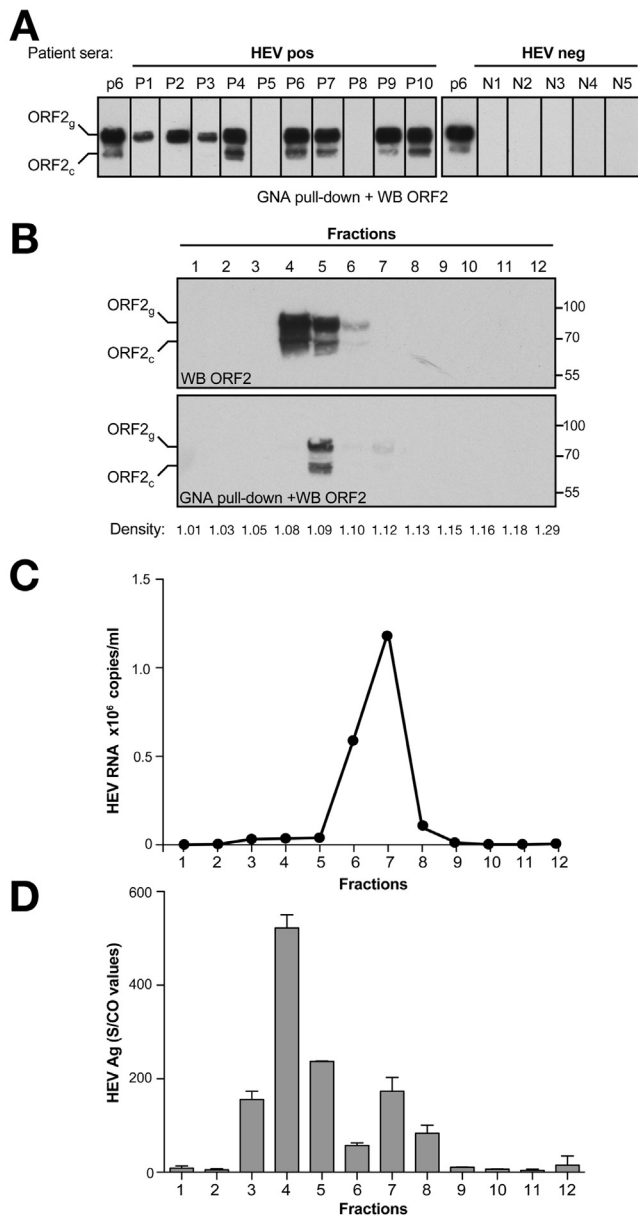


Figure 7. ORF2g and ORF2c proteins are the major HEV antigens in infected patients. (A) GNA pull-down on patient sera followed by ORF2 probing. Pull-down of PLC3/HEV-p6 supernatant was used as a positive control. (B) Fractionation on iodixanol gradient (7.5%–40%) of the P6 patient serum and analysis of the ORF2 content of each fraction by WB and GNA pull-down. (C) HEV RNA levels in each fraction measured by RT-qPCR. (D) Detection of HEV Ag in each gradient fraction using the Wantai HEV-Ag ELISA^{Plus} kit. Results are expressed as signal to cutoff ratios (S/CO).

followed by GNA pull-down of each fraction (Figure 7B) demonstrated that, as in cell culture, very large amounts of ORF2g/ORF2c proteins were isolated in light fractions (fractions 4 and 5) and pull-down by GNA. However, these fractions were not associated with infectious material, because they were not associated with the viral genome (Figure 7C). It should be noted that the ORF2 proteins present in fraction 4 were likely not precipitated by GNA beads due to the presence of high amounts of human

albumin. Our results indicate that ORF2g/ORF2c proteins are likely the major antigens in HEV-infected patient sera. Therefore, we quantified ORF2 proteins in each fraction of the gradient with the Wantai HEV-antigen ELISA^{Plus} assay (Figure 7D). Interestingly, the highest amount of antigen was detected in fraction 4, containing the ORF2g/ORF2c proteins, whereas lower amounts of antigens were detected in the other fractions and notably in fraction 7, the infectious fraction. Together, our results indicate that in infected patients, HEV produces high amounts of glycosylated antigen protein that are not associated with infectious particles and might lead to a bias in diagnosis of active HEV infection.

Discussion

By combining the highly replicative and cell culture-adapted p6 strain⁶ and highly transfectable subclones of PLC/PRF/5 cells, we developed a new cell culture system for which viral replication and protein expression were detected very early posttransfection. Time-course experiments showed that the ORF2 protein was early and massively secreted into the supernatant of transfected cells, as recently reported.^{20,21} Interestingly, ORF2 and ORF3 proteins migrated differently when detected either in cell lysate or supernatant, indicating that these proteins likely undergo posttranslational modifications during their secretion. Further experiments would be necessary to identify such modifications in the ORF3 protein. The ORF2 protein contains 3 potential sites for N-linked glycosylation and multiple sites for O-linked glycosylation. Using expression vectors, it has been previously shown that the ORF2 protein is glycosylated and expressed on the cell surface,^{22–24} but it is not clear whether the glycosylated ORF2 protein is the natural form of the virion. Recently, it has been suggested that the HEV virion capsid is likely glycosylated,²⁰ although Graff et al²⁵ showed the opposite. Our study revealed that HEV produces large amounts of ORF2 proteins, named ORF2g and ORF2c, that are secreted, sialylated, and N- and O-glycosylated but are not associated with infectious virions. A large portion of ORF2 proteins is likely translocated into the ER lumen where they are N-glycosylated and likely processed by proteases to generate ORF2g and ORF2c proteins. These 2 proteins move rapidly through the secretory pathway where they are O-glycosylated and sialylated, then quickly secreted. Interestingly, the presence of RGRR residues upstream of the ORF2g N-terminus suggests that a furin-like protease might be involved in its maturation. Further experiments would be necessary to characterize glycosylation and processing sites in the ORF2 sequence, notably the mechanism leading to the production of the ORF2c protein. In contrast, the ORF2i protein seen on an intracellular level and in virions is likely not translocated into the ER lumen and stays in the cytosolic compartment. Our results suggest the existence of 2 production pathways for the HEV capsid protein: (1) a major nonproductive pathway in which ORF2 proteins are delivered to the secretion route where they are processed and quickly secreted, and (2) a productive pathway in which cytosolic ORF2 proteins are delivered to the virion assembly

sites. Further studies are needed to thoroughly investigate these pathways.

In contrast to previous studies,^{9,13} we succeeded in infecting chimeric mice with gt3 HEVcc particles. The separation of infectious particles from ORF2g/ORF2c proteins by density gradient might explain our success, as these proteins interfere with the capacity of virions to infect target cells (Supplementary Figure 4), using a mechanism that needs to be elucidated.

We found that during its life cycle, HEV highly secretes glycosylated forms of the ORF2 protein, which circulate in infected patients and are the major antigens in patient sera. It would be interesting to define which form of ORF2 protein is recognized by antibodies from patients that have resolved their infections. HEV may produce ORF2g/ORF2c proteins as immunological bait. Interestingly, using TEM analyses, we found that ORF2g/ORF2c proteins do not form particulate material (data not shown) in contrast to other viruses such as hepatitis B virus, where the surface antigen forms subviral particles.

Our TEM analyses showed that HEVcc are particles of 40 to 70 nm in size, displaying internal structures and the ORF3 protein at their surface. DT treatment and ultracentrifugation uncloned small icosahedral capsids similar to those found in patient stools (Balayan et al¹⁷ and our study), indicating that HEVcc are associated with lipids in which ORF3 is embedded. Our analyses showed that, although much larger, HEVser particles have a morphology similar to HEVcc particles. HEVser virions display the ORF3 protein at their surface and are likely highly associated with lipids. As HEVser diameters differed between patients, it would be interesting to determine if the observed size variations are related to lipid content, as recently demonstrated for HCV particles.¹⁶

Recently, the Wantai HEV-Ag-ELISA assay was marketed for diagnosing HEV infection. Comparative studies of this assay showed high levels of specificity and sensitivity.^{26–29} However, some discrepancies between antigen detection and RNA quantification were found in some samples in which the HEV antigen was detected in the absence of detectable RNA.^{27–29} In our hands, the antigen assay was also very sensitive. However, we found that ORF2g/ORF2c proteins, which are not associated with infectious virions, were the main antigens recognized by the kit. Together, these data indicate that the results obtained with the HEV-Ag-ELISA assay must be cautiously interpreted. Indeed, this assay might not necessarily detect an active infection, because ORF2g/ORF2c proteins seem to be very stable in cell culture but likely also in patient sera,²⁸ suggesting that these proteins might remain in patient sera even when HEV is no longer replicating in the liver.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>.

References

1. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, et al. Update on hepatitis E virology: implications for clinical practice. *J Hepatol* 2016;65:200–212.
2. Pischke S, Hartl J, Pas SD, et al. Hepatitis E virus: infection beyond the liver? *J Hepatol* 2017;66:1082–1095.
3. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E: an emerging global disease—from discovery towards control and cure. *J Viral Hepat* 2016;23:68–79.
4. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 2013;496:367–371.
5. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol* 2012;48:147–158.
6. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, et al. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol* 2012;86:5697–5707.
7. Emerson SU, Nguyen H, Graff J, et al. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 2004;78:4838–4846.
8. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 2005;41:847–856.
9. Sayed IM, Verhoye L, Cocquerel L, et al. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* 2017;66:920–929.
10. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* 1997;71:9045–9053.
11. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol* 2014;95:2166–2175.
12. Allweiss L, Gass S, Giersch K, et al. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J Hepatol* 2016;64:1033–1040.
13. van de Garde MDB, Pas SD, van der Net G, et al. Hepatitis E virus (HEV) genotype 3 infection of human liver chimeric mice as a model for chronic HEV infection. *J Virol* 2016;90:4394–4401.
14. Sayed IM, Foquet L, Verhoye L, et al. Transmission of hepatitis E virus infection to human-liver chimeric FRG mice using patient plasma. *Antiviral Res* 2017;141:150–154.
15. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, et al. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:2438–2443.
16. Piver E, Boyer A, Gaillard J, et al. Ultrastructural organization of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut* 2017;66:1487–1495.
17. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirol* 1983;20:23–31.

18. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992;116:1071–1080.
19. Gallien S, Perrodou E, Carapito C, et al. Ortho-proteogenomics: multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol. *Genome Res* 2008;19:128–135.
20. Qi Y, Zhang F, Zhang L, et al. Hepatitis E virus produced from cell culture has a lipid envelope. *PLoS One* 2015; 10:e0132503.
21. Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, et al. Establishment of hepatitis E virus infection-permissive and -non-permissive human hepatoma PLC/PRF/5 subclones. *Microbiol Immunol* 2015;59:89–94.
22. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, et al. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* 1996;70:207–216.
23. Torresi J, Meanger J, Lambert P, et al. High level expression of the capsid protein of hepatitis E virus in diverse eukaryotic cells using the Semliki Forest virus replicon. *J Virol Methods* 1997;69:81–91.
24. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, et al. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* 1999;73:4074–4082.
25. Graff J, Zhou Y-H, Torian U, et al. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol* 2008;82:1185–1194.
26. Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, et al. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol* 2016; 79:1–5.
27. Zhao C, Geng Y, Harrison TJ, et al. Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 2015;22:957–963.
28. Behrendt P, Bremer B, Todt D, et al. Hepatitis E virus (HEV) ORF2 antigen levels differentiate between acute and chronic HEV infection. *J Infect Dis* 2016;214: 361–368.
29. Geng Y, Zhao C, Huang W, et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol* 2016;64:37–43.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received January 10, 2017. Accepted September 14, 2017.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Laurence Cocquerel, PhD, Molecular and Cellular Virology, CIL, CNRS-UMR8204 and Inserm-U1019, Institut Pasteur de Lille, Bâtiment IBL, 1 rue du Pr. Calmette, CS50447, 59019 Lille cedex, France. e-mail: czeslaw.wychowski@ibl.cnrs.fr, laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr; fax: (33) 3 20 87 12 01.

Acknowledgments

We thank Sandrine Belouzard, Karin Seron, and Sophana Ung for their technical contribution. We thank Suzanne U. Emerson (National Institutes of Health) and Shoshana Levy (Stanford University) for providing us with reagents. We thank Lydia Linna for proofreading the manuscript.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

This work was supported by the French “Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales” (ANRS) and the University of Lille. M.A. was supported by a fellowship from the ANRS. P.M. was supported by grants from the Research Foundation Flanders (FWO Vlaanderen), Ghent University (BOF GOA and IRO), and the Belgian State (BELSPO IAP HEPRO-2). I.M.S. was supported with PhD fellowships from the Egyptian Government and Ghent University. J.G.H. was supported by a fellowship from the Lebanese Association for Development.

Supplementary Methods

Antibodies

Two rabbit anti-open reading frame ORF3 polyclonal antibodies were used in this study, one provided by S.U. Emerson (National Institutes of Health, Bethesda, MD)¹ and the other from Bioss Antibodies (Woburn, MA). Mouse anti-hepatitis E virus (HEV) ORF2 monoclonal antibodies (MAbs) (1E6, antibody registry #AB-827236 and 4B2 #AB-571018) were from Millipore (Bedford, MA). Anti-CD81 MAb (5A6) was kindly provided by S. Levy. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

Luciferase Assay

Cells were electroporated with HEV-p6GLuc RNA or HEV-p6GlucGAD RNA. One day post-electroporation, the medium was collected (D1, Day 1) and replaced with Dulbecco's modified Eagle's medium/M199/Additives. Every 2 days (D2, D4, D6, D8, D10) for 10 days, a sample of medium was collected from each well. *Gaussia* luciferase (GLuc) activities were determined with the *Renilla* luciferase assay system (Promega, Madison, WI) and using a Tristar LB941 luminometer (Berthold, Bad Wilbad, Germany). Values were normalized relative to those at D1.

Infectious Titers

A549 cells were infected with dilutions (10^{-1} to 10^{-7}) of infectious supernatants or fractions of iodixanol gradient for 6 hours at 37°C. The inocula were removed and replaced by fresh complete medium. Five days postinfection, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence. Cells labeled with anti-ORF2 antibody 1E6 were counted as infected cells. The number of infected cells was determined for each dilution and used to define the infectious titer in focus forming unit (ffu)/mL.

Indirect Immunofluorescence

Cells were fixed with methanol/acetone (1 vol:1 vol) 20 minutes at -20°C and then processed for immunofluorescence detection as previously described.² Mouse anti-HEV ORF2 MAb (1E6/IgG2b) and rabbit anti-ORF3 polyclonal antibody (S.U. Emerson) were used at a 1/800 and 1/2000 dilution, respectively. Image acquisition was carried out using an Axiophot 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

RNA Extraction and Quantification

Samples were treated with RNase A for 30 minutes at room temperature before nucleic acid extraction with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). HEV RNA levels were quantified by RT-qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) assay by using primers and probes targeting a conserved 70-base pair (bp) region in the ORF2/ORF3 overlap, as previously described.³

Detection of HEV ORF1 in Mouse Liver and Stool Samples

RNA extracted from mouse stool and mouse liver was converted into cDNA using Superscript IV enzyme (Life Technologies, Gent, Belgium) with specific primers⁴ according to the manufacturer's instructions. An amount of 10 μ L purified cDNA was used in first PCR run using ORF1 primers⁴ and Dream Taq DNA polymerase (ThermoFischer Scientific, Gent, Belgium) according to the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, extension at 72°C for 1 minute), and final extension at 72°C for 5 minutes. An amount of 10 μ L of the first PCR product was used for the second PCR run using Dream Taq DNA polymerase according to the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 20 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds) and final extension at 72°C for 5 minutes; the expected band size was 415 bp.

Detection of HEV ORF2 in Mouse Samples

First, a 1-step reverse transcription-PCR was performed on 10 μ L of extracted RNA using the LightCycler Multiplex RNA Virus Master (Roche, Vilvoorde, Belgium) in combination with the primers RT_5'-CCCTTRTCYTGCTGMGCATTCTC-3', Fow_5'-AATTATGCYAGTAYCGRGTTG-3' and Rev_5'-CCCTTRTCYTGCTGMGCATTCTC-3' according to the following conditions: RT step at 50°C for 10 minutes, initial denaturation at 95°C for 1 minute, followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 5 seconds, annealing at 47°C for 45 seconds, and extension at 60°C for 45 seconds) and final extension at 60°C for 7 minutes. Nested PCR reaction was done on 10 μ L of the first-round PCR product using Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) and the primers Fow_5'-GTWATGCTYTGATW CATGGCT-3' and Rev_5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3' according to the following conditions: initial denaturation at 95°C for 30 seconds, followed by 30 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 47°C for 45 seconds, and extension at 68°C for 40 seconds) and final extension at 68°C for 7 minutes. The expected size of the nested PCR product was 348 bp.

Particle Size Distribution

Series of electron micrographs (numbers as indicated) were acquired at random from anti-ORF2 or anti-ORF3 IC TEM grids. The images were then analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health) to determine the particle size distribution.

Mass Spectrometry and N-Terminus Identification

For ORF2i analyses, viral particles purified on iodixanol cushion were used. For ORF2g/ORF2c analyses, proteins from a supernatant of PLC3/HEV-p6 cells were immunoprecipitated with the 4B2 anti-ORF2 antibody (Millipore).

Proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis. Colloidal blue–stained bands corresponding to ORF2i, ORF2g, and ORF2c proteins in Western blot were cut into 2 slices for in-gel digestion with trypsin or AspN. NanoLC-MSMS analyses of the protein digests were performed on a UltiMate-3000 RSLCnano System coupled to a Q-Exactive instrument (ThermoFisher Scientific), as previously described.⁵ For N-terminus identification, viral particles or immunoprecipitated ORF2g/ORF2c proteins were denatured for 20 minutes at 80°C then incubated for 3 hours at room temperature in 50 mM NaPO₄, pH8.2, 10% CH₃CN, 1% SDS, 2 mM TMPP-Ac-OSu. Following trypsin digestion, mass spectrometry analyses were performed as described previously and identified TMPP-labeled N-terminal peptides were validated as previously described.⁶

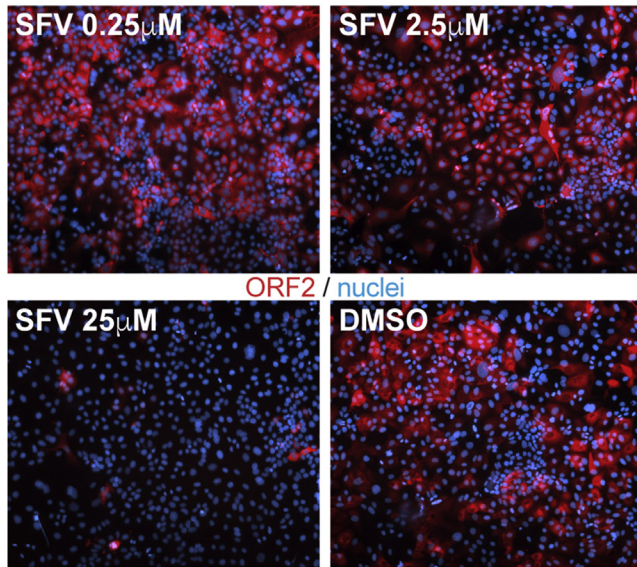
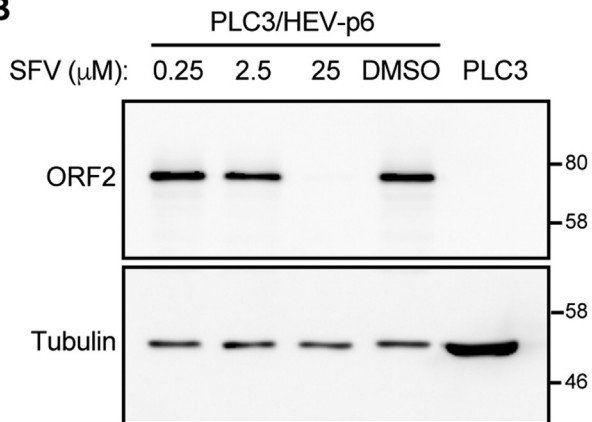
Collected raw data were processed and converted into *.mgf peak list format with Proteome Discoverer 1.4 (ThermoFisher Scientific). Tandem mass spectrometry data were interpreted using search engine Mascot (version 2.4.0; Matrix Science, Boston, MA) with a tolerance on mass measurement of 0.2 Da for precursor and 0.2 Da for fragment ions, against a composite target-decoy database (40,584 total entries) built with Swissprot *Homo sapiens* database (TaxID=9606, 20 May 2016, 20,209 entries) fused with the sequences of ORF2 (H9E9C9_HEV) 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 1 trypsin or 3 AspN missed cleavages were allowed. Semispecific cleavage was also authorized. Peptides were filtered out according to the cutoff ion score > 25 and a minimal size of 7 amino acid residues.

Supplementary References

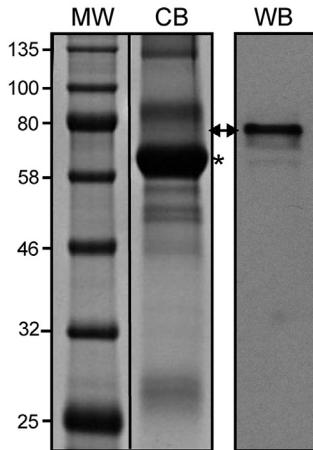
1. Graff J, Nguyen H, Yu C, et al. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* 2005;79:6680–6689.
2. **Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, et al.** The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 2008;3:e1866.
3. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, et al. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* 2012;50:897–902.
4. Sayed IM, Verhoye L, Cocquerel L, et al. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* 2017; 66:920–929.
5. **Barthe P, Veyron-Churlet R, de Visch A, et al.** *Mycobacterium tuberculosis* LppM displays an original structure and domain composition linked to a dual localization. *Structure* 2016;24:1788–1794.
6. Gallien S, Perrodou E, Carapito C, et al. Ortho-proteogenomics: multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol. *Genome Res* 2009;19:128–135.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

A**B**

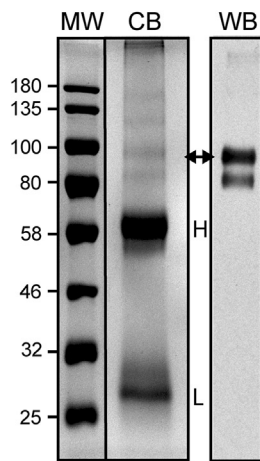
Supplementary Figure 1. Sofosbuvir (SFV) inhibits ORF2 expression. HEV-p6 electroporated PLC3 cells were cultured in the presence of SFV at the indicated concentrations. At 10 days post-electroporation, ORF2 expression was analyzed by immunofluorescence (A) and Western blotting (B) by using anti-ORF2 antibody 1E6. Tubulin was used as a loading control. DMSO, dimethyl sulfoxide.

A ORF2i



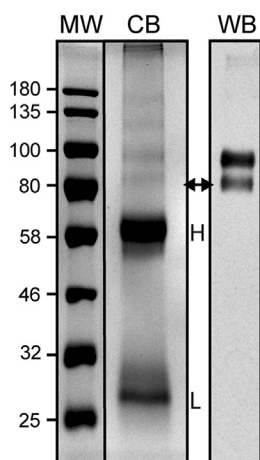
Signal peptide		ORF2i				
1	MCPRVLLLLF	FVFLPMLPAP	PAGQPSGRRR	GRRSGGAGGG	FWGDRVDSQP	50
51	FALPYIHPTN	PFAADIVSQS	GAGTRPRQPP	RPLGSAWRDQ	SQRPSAAPRR	100
101	RSAPAGAAPL	TAVSPAPDTA	PVPDVDSRGA	ILRRQYNLST	SPLTSSVASG	150
151	TNLVLYAAPL	NPLLPLQDGT	NTHIMATEAS	NYAQYRVVRA	TIRYRPLVPN	200
201	AVGGYAISIS	FWPQTTTTPT	SVDMNSITST	DVRILVQPGI	ASELVIPSER	250
251	LHYRNQGWRS	VETTGVAEED	ATSGLVMLCI	HGSPVNSYTN	TPYTGALGLL	300
301	DFALELEFRN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	LRRGADGTAE	LTTTAATRFM	350
351	KDLHFTGTNG	VGEVGRGIAL	TLFNLADTLL	GGLPTELISS	AGGQLFYSRP	400
401	VVSANGEPTV	KLYTSVENAQ	QDKGITIPHD	IDLGDSRVVI	QDYDNQHEQD	450
451	RPTPSPAPSR	PFSVLRANDV	LWLSLTAAEY	DQATYGSSTN	PMYVSDTVTF	500
501	VNVATGAQAV	ARSLDWSKVT	LDGRPLTTIQ	QYSKTFYVLP	LRGKLSFWEA	550
551	GTTRAGYPYN	YNTTASDQIL	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV	600
601	LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTIAELQRL	650
651	KTEVGKTRES					660

B ORF2g



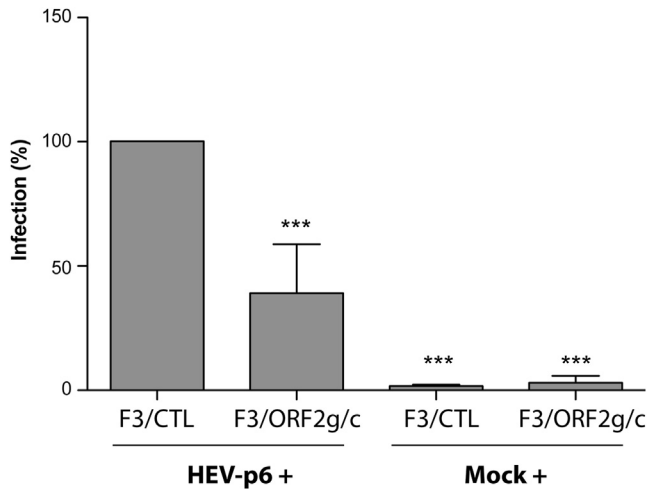
Signal peptide		ORF2g				
1	MCPRVLLLLF	FVFLPMLPAP	PAGQPSGRRR	GRRSGGAGGG	FWGDRVDSQP	50
51	FALPYIHPTN	PFAADIVSQS	GAGTRPRQPP	RPLGSAWRDQ	SQRPSAAPRR	100
101	RSAPAGAAPL	TAVSPAPDTA	PVPDVDSRGA	ILRRQYNLST	SPLTSSVASG	150
151	TNLVLYAAPL	NPLLPLQDGT	NTHIMATEAS	NYAQYRVVRA	TIRYRPLVPN	200
201	AVGGYAISIS	FWPQTTTTPT	SVDMNSITST	DVRILVQPGI	ASELVIPSER	250
251	LHYRNQGWRS	VETTGVAEED	ATSGLVMLCI	HGSPVNSYTN	TPYTGALGLL	300
301	DFALELEFRN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	LRRGADGTAE	LTTTAATRFM	350
351	KDLHFTGTNG	VGEVGRGIAL	TLFNLADTLL	GGLPTELISS	AGGQLFYSRP	400
401	VVSANGEPTV	KLYTSVENAQ	QDKGITIPHD	IDLGDSRVVI	QDYDNQHEQD	450
451	RPTPSPAPSR	PFSVLRANDV	LWLSLTAAEY	DQATYGSSTN	PMYVSDTVTF	500
501	VNVATGAQAV	ARSLDWSKVT	LDGRPLTTIQ	QYSKTFYVLP	LRGKLSFWEA	550
551	GTTRAGYPYN	YNTTASDQIL	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV	600
601	LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTIAELQRL	650
651	KTEVGKTRES					660

C ORF2c



Signal peptide		ORF2c				
1	MCPRVLLLLF	FVFLPMLPAP	PAGQPSGRRR	GRRSGGAGGG	FWGDRVDSQP	50
51	FALPYIHPTN	PFAADIVSQS	GAGTRPRQPP	RPLGSAWRDQ	SQRPSAAPRR	100
101	RSAPAGAAPL	TAVSPAPDTA	PVPDVDSRGA	ILRRQYNLST	SPLTSSVASG	150
151	TNLVLYAAPL	NPLLPLQDGT	NTHIMATEAS	NYAQYRVVRA	TIRYRPLVPN	200
201	AVGGYAISIS	FWPQTTTTPT	SVDMNSITST	DVRILVQPGI	ASELVIPSER	250
251	LHYRNQGWRS	VETTGVAEED	ATSGLVMLCI	HGSPVNSYTN	TPYTGALGLL	300
301	DFALELEFRN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	LRRGADGTAE	LTTTAATRFM	350
351	KDLHFTGTNG	VGEVGRGIAL	TLFNLADTLL	GGLPTELISS	AGGQLFYSRP	400
401	VVSANGEPTV	KLYTSVENAQ	QDKGITIPHD	IDLGDSRVVI	QDYDNQHEQD	450
451	RPTPSPAPSR	PFSVLRANDV	LWLSLTAAEY	DQATYGSSTN	PMYVSDTVTF	500
501	VNVATGAQAV	ARSLDWSKVT	LDGRPLTTIQ	QYSKTFYVLP	LRGKLSFWEA	550
551	GTTRAGYPYN	YNTTASDQIL	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV	600
601	LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTIAELQRL	650
651	KTEVGKTRES					660

Supplementary Figure 2. Characterization of the different ORF2 products. Viral particles purified on iodixanol cushion and ORF2g/ORF2c proteins immunoprecipitated with an anti-ORF2 antibody (4B2) were resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Colloidal blue (CB) staining and Western blot (WB) are shown. The *arrow* indicates ORF2i (A), ORF2g (B) and ORF2c (C). The *asterisk* indicates human albumin. H and L indicate the heavy and light chains of immunoglobulins used in immunoprecipitation. ORF2 forms were digested in-gel with trypsin or AspN and analyzed by nano liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Peptide covering is highlighted in *gray* on the sequence of each ORF2 product. *Dashed lines* correspond to semi-trypsinic and semi-AspN peptides. Leu¹⁴ and Ser³⁴ in *bold* correspond to the first amino acid of ORF2i (A) and ORF2g (B), respectively, that were identified by semispecific cleavage and TMPP-Ac-OSu labeling. No evidence was found for the N-terminal part of ORF2c (C).



Supplementary Figure 4. ORF2g/c proteins inhibit cell culture-produced HEV particles (HEVcc) infection. Huh-7.5 cells were inoculated with purified HEVcc (HEV-p6) in combination with either fraction 3 (F3) of iodixanol gradients prepared with a supernatant of PLC3/HEV-p6 cells (F3/ORF2g/c) or with F3 of iodixanol gradients prepared with a supernatant of nontransfected PLC3 cells (F3/CTL). Huh-7.5 cells inoculated with an iodixanol cushion prepared with a supernatant of nontransfected PLC3 cells are shown as Mock in the presence of F3/CTL or F3/ORF2g/c. Ten hours post-infection, inocula were removed and replaced by fresh complete medium. Four days postinfection, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence. Cells labeled with the anti-ORF2 antibody 1E6 were counted as infected cells. Values were adjusted to 100% infection for cells infected with HEV-p6 + F3/CTL. Results are representative of 3 independent experiments, but presented results are the mean \pm SD of 2 independent experiments performed in duplicate. *** $P < .001$.

Supplementary Figure 3. Tandem mass spectrometry spectrum of N-terminal peptides of ORF2i and ORF2g proteins. (A, B) Semi-trypsin peptide 14 to 28 obtained from nontreated (A) or TMPP-Ac-Osu-labeled (B) ORF2i protein. +572 corresponds to the TMPP mass increment following TMPP-Ac-Osu labeling. (C, D) Trypsin peptide 34 to 55 obtained from nontreated (C) or TMPP-Ac-Osu-labeled (D) ORF2g protein. (E, F) Semi-AspN peptide 34-56 obtained from nontreated (E) or TMPP-Ac-Osu-labeled (F) ORF2g protein.

Supplementary Table 1. Hepatitis E Virus (HEV) RNA Levels and Infectious Titers of PLC1/HEV-p6 and PLC3/HEV-p6 Cell Supernatants

		Days post-electroporation					Fold increase
		2	4	6	8	10	
PLC1/HEV-p6	RNAs ^a	8×10^6	2.4×10^7	6×10^7	7.7×10^7	1.1×10^8	14
	Titers ^b	2×10^2	1×10^3	2.5×10^3	5×10^3	7×10^3	35
PLC3/HEV-p6	RNAs ^a	4.2×10^6	5×10^6	1.2×10^7	2×10^7	3.3×10^7	8
	Titers ^b	<10	1.7×10^2	5×10^2	9×10^2	1.5×10^3	> 150

^aHEV copies/mL.^bffu/mL.**Supplementary Table 2.** Features of HEV Patient Sera Used in GNA Pull-Down

Patients	Genotype	Serum titer ^a	Amount used in GNA pull-down ^b	Ag levels ^c	ORF2 proteins ^d
P1	3c	1.3×10^8	6.5×10^6	17.4	ORF2g
P2	3c	3.7×10^7	1.8×10^6	19.4	ORF2g
P3	3c	2.1×10^7	2.1×10^6	17.4	ORF2g
P4	ND	2.0×10^5	1.0×10^5	20.2	ORF2g/ORF2c
P5	3f	7.0×10^5	3.5×10^5	ND	—
P6	3c	1.6×10^8	1.6×10^7	19.4	ORF2g/ORF2c
P7	3c	1.2×10^7	1.2×10^6	18.6	ORF2g/ORF2c
P8	3f	1.2×10^5	0.6×10^5	5.0	—
P9	3f	1.5×10^5	0.7×10^5	19.7	ORF2g/ORF2c
P10	3f	1.2×10^6	0.6×10^6	18.9	ORF2g/ORF2c

NOTE. The dashes mean that ORF2 proteins were not detected.

GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin; HEV, hepatitis E virus; ND, not determined.^aIn HEV RNA copies/mL.^bIn HEV RNA copies.^cIn S/CO values. Samples were diluted 100 times in PBS and quantified with the Wantai HEV-Ag-enzyme-linked immunosorbent assay kit.^dDetected in GNA pull-down + Western blot anti-ORF2.

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

Résumé

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

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

Ma contribution dans ce projet

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

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

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

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




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

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

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

RESEARCH ARTICLE

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

Rayan Farhat¹ | Maliki Ankavay¹ | Nadjet Lebsir¹ | Jérôme Gouttenoire² | Catherine L. Jackson³  | Czeslaw Wychowski¹ | Darius Moradpour² | Jean Dubuisson¹ | Yves Rouillé¹  | Laurence Cocquerel¹ 

¹Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR 8204-CIIL- Center for Infection and Immunity of Lille, University of Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Lille, France

²Division of Gastroenterology and Hepatology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

³Institut Jacques Monod, CNRS UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Correspondence

Dr Laurence Cocquerel, Molecular & Cellular Virology, CIIL, CNRS-UMR8204 & Inserm-U1019, Institut Pasteur de Lille, Bâtiment IBL, 1 rue du Pr. Calmette, CS50447, 59019 Lille cedex, France.
Email: laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales; ANRS; Gilead Sciences International Research Scholars Program in Liver Disease; Swiss National Science Foundation, Grant/Award Number: 31003A-156030

Abstract

The hepatitis E virus (HEV) genome is a single-stranded, positive-sense RNA that encodes three proteins including the ORF1 replicase. Mechanisms of HEV replication in host cells are unclear, and only a few cellular factors involved in this step have been identified so far. Here, we used brefeldin A (BFA) that blocks the activity of the cellular Arf guanine nucleotide exchange factors GBF1, BIG1, and BIG2, which play a major role in reshuffling of cellular membranes. We showed that BFA inhibits HEV replication in a dose-dependent manner. The use of siRNA and Golgicide A identified GBF1 as a host factor critically involved in HEV replication. Experiments using cells expressing a mutation in the catalytic domain of GBF1 and overexpression of wild type GBF1 or a BFA-resistant GBF1 mutant rescuing HEV replication in BFA-treated cells, confirmed that GBF1 is the only BFA-sensitive factor required for HEV replication. We demonstrated that GBF1 is likely required for the activity of HEV replication complexes. However, GBF1 does not colocalise with the ORF1 protein, and its subcellular distribution is unmodified upon infection or overexpression of viral proteins, indicating that GBF1 is likely not recruited to replication sites. Together, our results suggest that HEV replication involves GBF1-regulated mechanisms.

1 | INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is increasingly recognised as the major cause of acute hepatitis worldwide. This virus is annually responsible for 20

million infections with 3.4 million symptomatic cases and 70,000 deaths mainly occurring in less developed regions of the world (Debing, Moradpour, Neyts, & Gouttenoire, 2016). Although infection by HEV is usually self-resolving, severe forms or chronic infections have been described, mainly in immunocompromised patients. A high rate of mortality has also been reported among pregnant women. In addition, HEV infection has been associated with a broad range of extrahepatic manifestations, including renal injury and a variety of neurological disorders (Kamar, Marion, Abravanel, Izopet, & Dalton, 2016). Four genotypes (gt) are pathogenic in humans. gt1 and gt2 exclusively infect humans, whereas gt3 and gt4 are zoonotic and mainly infect mammals with occasional transmission to humans

Abbreviations: aa, amino acid; BFA, brefeldin A; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ER, endoplasmic reticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment; FCS, foetal calf serum; FLuc, *Firefly* luciferase; GBF1, guanine nucleotide-exchange factor Golgi brefeldin A resistance Factor 1; GCA, Golgicide A; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GLuc, *Gaussia* luciferase; gt, genotype; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus; MAb, monoclonal antibody; ORFs, open reading frames; p.e., post-electroporation; PBS, phosphate buffered saline; WB, western-blotting

(Doceul, Bagdassarian, Demange, & Pavio, 2016). In industrialised countries, the most common genotype causing HEV infection is gt3. Importantly, due to the evolution toward chronicity in immunocompromised infected patients, HEV transmission through blood transfusion, resistance of some infected patients to ribavirin and complications in patients with preexisting liver disease, HEV infection is now considered as an emerging problem in industrialised countries (Sayed, Vercouter, Abdelwahab, Vercauteren, & Meuleman, 2015).

HEV has been classified as the sole member of the *Orthohepevirus* genus within the *Hepeviridae* family (Smith et al., 2014). It is a quasi-enveloped virus containing a linear, single-stranded, positive-sense RNA genome that encodes three open reading frames (ORFs), namely, ORF1, ORF2, and ORF3 (Tam et al., 1991). ORF1 is the largest gene that encodes a non-structural polyprotein (ORF1 protein) that contains several functional domains essential for viral replication (Koonin et al., 1992). These functional domains include the methyltransferase (Met), papain-like cysteine protease, RNA helicase (Hel), and RNA-dependent RNA polymerase (reviewed in Debing et al., 2016). To date, there is no clear evidence of ORF1 protein processing by protease and antibodies that robustly recognise ORF1 protein are not available. ORF2 encodes the ORF2 viral capsid protein, which is involved in particle assembly, binding to host cells and eliciting neutralising antibodies. Very recently, we demonstrated that during its lifecycle, HEV produces three forms of the ORF2 capsid protein: ORF2i (infectious/intracellular ORF2), ORF2g (glycosylated ORF2), and ORF2c (cleaved ORF2). The ORF2i protein is associated with infectious particles, whereas ORF2g and ORF2c proteins are massively produced glycoproteins that are not associated with infectious particles and are the major antigens present in HEV-infected patient sera (Montpellier et al., 2017). ORF3 encodes a small multifunctional phosphoprotein that is involved in virion morphogenesis and egress (reviewed in Holla, Ahmad, Ahmad, & Jameel, 2013).

Due to difficulties in efficiently propagating HEV in cell culture, numerous pathways and processes of the HEV lifecycle remain to be elucidated. Notably, mechanisms leading to HEV replication are particularly poorly understood. However, it has been shown that the ORF1 protein might be membrane-associated and localised in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC), suggesting that HEV replication might occur within the early secretory pathway (Perttilä, Spuul, & Ahola, 2013). Plus-strand RNA virus replication occurs in close association with host cell membranes. In infected cells, cellular and viral factors cooperatively generate particular structures resembling organelles that are named viral replication factories. This compartmentalisation allows for coordination of the different steps of the replication cycle, highly efficient RNA replication, and protects the viral genome from cell defence mechanisms. It has to be noted that for a number of viruses, the viral budding site is located near the replication factories, indicating a spatial coordination of replication and viral assembly steps. To induce these massive membrane rearrangements, viruses use cellular factors active on membranes and exploit the cellular pathways involved in membrane homeostasis (reviewed in Paul, 2013). In particular, some viruses divert components from the cellular secretory pathway. Indeed, it has been shown in our laboratory that the guanine nucleotide-exchange factor Golgi brefeldin A (BFA) resistance Factor 1

(GBF1) is necessary for hepatitis C virus (HCV) replication (Farhat et al., 2016; Goueslain et al., 2010). GBF1 has also been identified as a cellular factor essential for the replication of a number of other viruses such as picornaviruses and coronaviruses (Belov, Feng, Nikovics, Jackson, & Ehrenfeld, 2008; Lanke et al., 2009; van der Linden, van der Schaar, Lanke, Neyts, & van Kuppeveld, 2010; Verheije et al., 2008).

To investigate HEV replication mechanisms, we used BFA, a fungal metabolite inhibiting the activation of Arf proteins, small G-proteins regulating the cellular secretory pathway. The inactive, cytoplasmic GDP-bound form of Arf proteins, upon nucleotide exchange to GTP, undergoes conformational changes that allow Arf-GTP proteins to bind membranes. The active GTP-bound form of Arf proteins is essential for the formation of secretory vesicles, actin remodelling and phospholipid metabolism by recruiting to membranes effectors that mediate these processes. BFA blocks Arf activation by inhibiting a subset of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that regulate the conversion of Arf-GDP into Arf-GTP. In human cells, BFA inhibits the function of three of the 15 known Arf GEFs: GBF1, BIG1, and BIG2, by stabilising normally transient complexes formed between the GEF and Arf-GDP. Here, we demonstrate that BFA inhibits HEV replication and identified GBF1 as the BFA-sensitive GEF required for HEV replication.

2 | RESULTS

2.1 | BFA inhibits HEV replication

In order to investigate the role of the cellular membranes during HEV infection, we used BFA that blocks several membrane trafficking pathways and causes major membrane rearrangements in the host cell (Klausner, Donaldson, & Lippincott-Schwartz, 1992). The *Gaussia luciferase* (Gluc)-encoding subgenomic replicon construct derived from the HEV gt3 Kernow-C1 p6 strain was modified to produce the subgenomic replicon p6^{SP}GLuc. In this replicon, the first 20 amino acids matching with the signal peptide of *Gaussia luciferase* were deleted to block secretion of the luciferase. In this context, the amount of intracellular GLuc is proportional to viral RNA synthesis and consequently to HEV replication. In addition, this system allows replication to be monitored independently of protein secretion that is blocked by BFA. Huh-7.5 cells were electroporated with in vitro-transcribed p6^{SP}GLuc RNA and luciferase activities were measured at 6, 24, 48, and 72 hr post-electroporation (p.e.). For each time point, values are presented as fold increase compared to luciferase activities measured at 6 hr p.e. As shown in Figure 1a, the level of p6^{SP}GLuc steadily increased over time to reach a fold increase of 490 times at 72 hr p.e., indicating that the p6^{SP}GLuc replicon efficiently replicates in Huh-7.5 cells and can be used as a tool to study the HEV replication step. HEV-p6^{SP}GLuc-electroporated Huh-7.5 cells were then treated for 16 hr with different concentrations of BFA (Figure 1b). In parallel, transfected cells were treated with sofosbuvir, an inhibitor of HCV polymerase, which has been recently described as a HEV replication inhibitor (Dao Thi et al., 2016; Figure 1c). Luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e. For each BFA

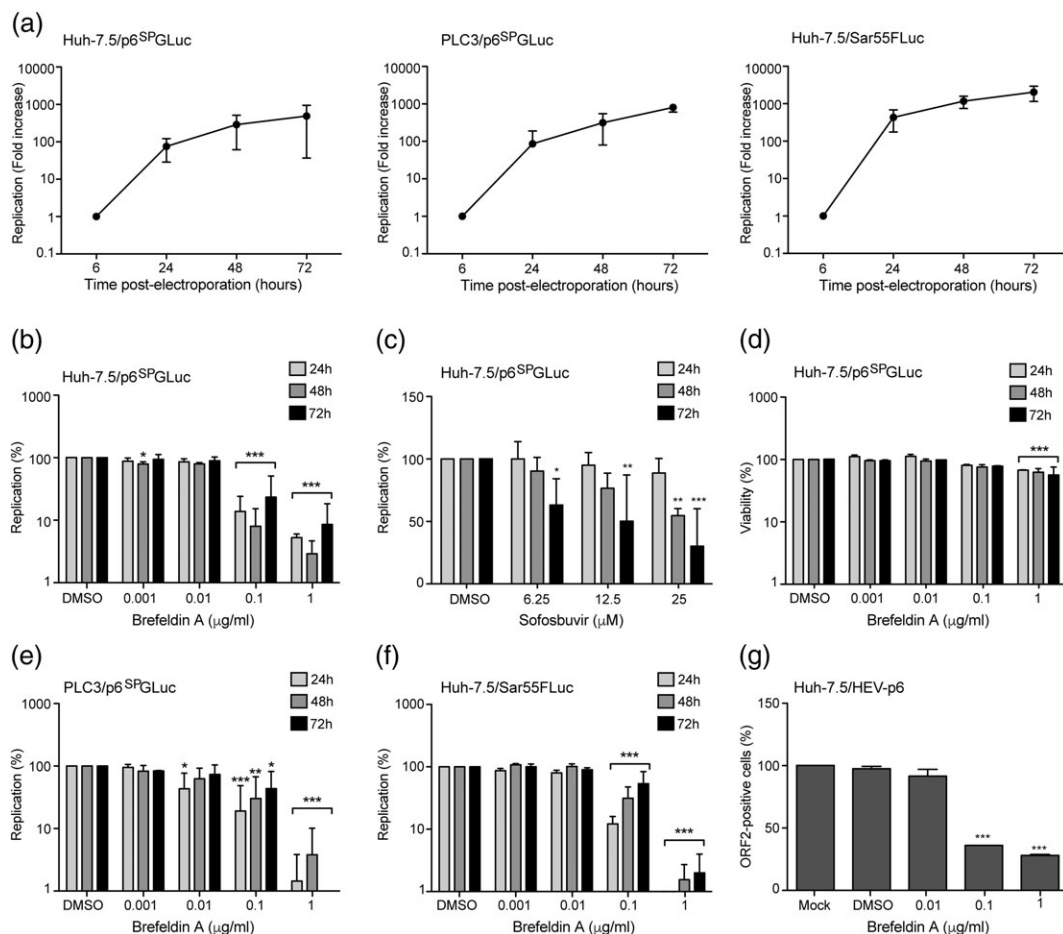


FIGURE 1 Brefeldin A inhibits hepatitis E virus (HEV) replication. (a) Huh-7.5 and PLC3 cells were electroporated with in vitro-transcribed p6^{SP}GLuc RNA or Sar55FLuc RNA. Luciferase activities were measured at 6, 24, 48, and 72 hr post-electroporation (p.e.). For each time point, values are presented as fold increase compared to luciferase activities measured at 6 hr p.e. (b–d) At 6 hr p.e., HEV-p6^{SP}GLuc-electroporated Huh-7.5 cells were treated for 16 hr with brefeldin A (b and d) or sofosbuvir (c) at indicated concentrations. Luciferase activities (b and c) and viability (d) were quantified at 24, 48, and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells treated with 0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO). PLC3 cells electroporated with p6^{SP}GLuc RNA (e), and Huh-7.5 cells electroporated with gt1 Sar55FLuc RNA (f) were treated for 16 hr with brefeldin A at indicated concentrations. Luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells treated with 0.2% DMSO. (g) Huh-7.5 cells were electroporated with the full-length infectious p6 strain RNA and then treated with brefeldin A for 16 hr at indicated concentrations. At 96 hr post-transfection, cells were fixed and analysed by immunofluorescence with an anti-ORF2 capsid protein antibody. Values were adjusted to 100% infection for non-treated cells (mock). Results are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. *, **, and *** mean *p*-values below .05, .01, and .001, respectively

concentration, values are presented as a percentage of replication compared to non-treated cells (dimethyl sulfoxide [DMSO]). As expected, treatment of p6^{SP}GLuc-electroporated Huh-7.5 cells with sofosbuvir led to a dose-dependent decrease of HEV replication with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 10.6 μM. Interestingly, treatment of electroporated Huh-7.5 cells with BFA also led to a dose-dependent decrease of HEV replication with an IC₅₀ of 0.02 μg/ml (Figure 1b), indicating that BFA is an inhibitor of gt3 HEV replication. Next, to verify that the decrease of HEV replication was not due to a toxic effect of the BFA treatment, we performed a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium viability assay on Huh7.5 cells treated for 16 hr with BFA. As shown in Figure 1d, although a weak toxicity was observed at 1 μg/ml, the concentration of 0.1 μg/ml for which HEV replication was reduced by 1 log had no significant toxic effect, indicating that the inhibitory effect of BFA on HEV replication was not due to cell toxicity. In order to confirm the inhibitory effect of BFA on HEV

replication in another cell line, we next analysed BFA activity on HEV replication in PLC3 cells, a PLC-PRF-5 derived cell clone that highly replicates HEV genome (Montpellier et al., 2017) (Figure 1a, PLC3/p6^{SP}GLuc). As shown in Figure 1e, BFA efficiently inhibited p6^{SP}GLuc replication in transfected PLC3 cells, indicating that the inhibitory effect of BFA on HEV replication is not cell line dependent. We also analysed the antiviral activity of BFA in Huh-7.5 cells transfected with the gt1 Sar55 *Firefly luciferase* (FLuc)-encoding subgenomic replicon (Sar55FLuc) (Figure 1a and 1f). As for gt3, BFA at 0.1 and 1 μg/ml strongly inhibited gt1 replication, indicating that the BFA inhibitory effect on HEV replication is not genotype dependent. Lastly, we performed experiments with the full-length infectious p6 clone (Shukla et al., 2012). Huh7.5 cells were electroporated with the full-length p6 strain RNA, and then, BFA was added for 16 hr. At 96 hr post-transfection, cells were fixed and analysed by immunofluorescence with an anti-ORF2 capsid protein antibody. As shown in Figure 1g, treatment with BFA at 0.1 and 1 μg/ml led to significant

decrease of ORF2-positive cells, indicating that BFA inhibits the HEV lifecycle.

Altogether, our results demonstrate that BFA inhibits HEV replication, likely by blocking a cellular factor necessary for this step in the viral lifecycle.

2.2 | GBF1 is likely required for HEV replication

BFA inhibits several cellular membrane trafficking pathways, primarily through inhibition of its major cellular targets, members of the Arf GEF family. Among the 15 members of the Arf GEF family in human cells, only three are inhibited by BFA: BIG1, BIG2, and GBF1 (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Gillingham & Munro, 2007). To check which of the three BFA-sensitive GEFs are required for HEV replication, we analysed the effect of their depletion on HEV replication (Figure 2). However, GBF1 silencing was toxic in our experimental conditions due to the slow kinetics of HEV replication, which requires long depletion times. As an alternative, we used Golgicide A (GCA) that specifically inhibits GBF1 with no effect on BIG1 and BIG2 (Sáenz et al., 2009). Huh7.5 cells were transfected with siRNA pools targeting BIG1, BIG2, BIG1 and BIG2 or a non-targeting siRNA pool (Figure 2a). Two days post-transfection, depleted cells were electroporated with the p6^{SP}GLuc replicon, and luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e., as described previously. As shown in Figure 2b, depletion of BIG1, BIG2 or BIG1 and BIG2 together did not result in any significant decrease of HEV replication levels. In contrast, when p6^{SP}GLuc-electroporated Huh-7.5 cells were treated with GCA, which specifically targets GBF1, HEV replication levels were strongly inhibited (Figure 2c) without any significant toxicity (Figure 2d). Altogether, our results suggest that GBF1 is likely the BFA- and GCA-sensitive factor required for HEV replication.

2.3 | HEV replication is resistant to BFA in cells expressing a point mutation in GBF1

In a previous study assessing the role of GBF1 in HCV replication, we have isolated BFA-resistant cell clones derived from the Huh-7 hepatoma cell line (Farhat et al., 2013). The R2 cell line is resistant to 0.1 µg/ml of BFA and able to support HCV replication in the presence of 100 times more of BFA than the parental Huh-7 cell line. This resistance is due to a point mutation (M832L) in the *sec7* catalytic domain of GBF1, which is known to impair the binding of BFA (Farhat et al., 2013). In order to confirm that BFA inhibition of HEV replication was only related to the effect of the drug on GBF1, we transfected the p6^{SP}GLuc replicon in R2 and parental Huh-7 cells (Figure 3). BFA was added for 16 hr as in the previous experiments. HEV replication was strongly inhibited by BFA in parental Huh-7 cells (Figure 3a). In contrast, the replication of p6^{SP}GLuc was almost insensitive to BFA in R2 cells regardless of the concentration of BFA (Figure 3b).

Together, these results support the conclusion that GBF1 is the BFA-sensitive factor that is required for HEV replication, and that the inhibition of HEV replication is not due to a direct effect on the virus.

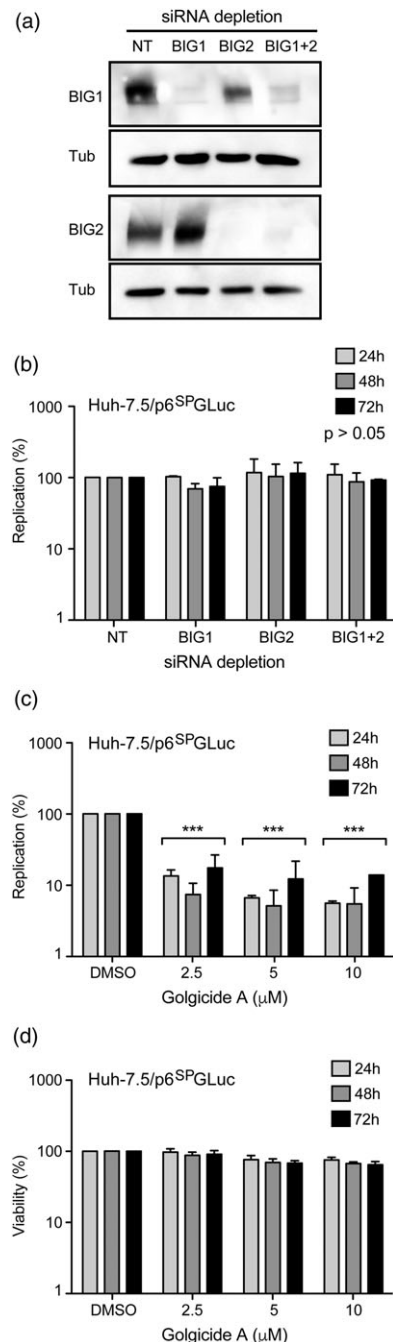


FIGURE 2 GBF1 is the brefeldin A-sensitive factor required for hepatitis E virus replication. (a) Huh-7.5 cells were transfected with siRNA pools targeting BIG1, BIG2, BIG1, and BIG2 or a non-targeting siRNA pool. Two days post-transfection, silencing of BIG1, BIG2, or BIG1, and BIG2 was controlled by western blotting with antibodies directed against BIG1 or BIG2. Antibodies directed against tubulin were used to control protein loading. (b) Two days post-transfection, depleted cells were electroporated with the p6^{SP}GLuc replicon, and luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells transfected with non-targeting siRNA pool. (c and d) hepatitis E virus-p6^{SP}GLuc-electroporated Huh-7.5 cells were treated for 16 hr with Golgicide A at indicated concentrations. Luciferase activities (c) and viability (d) were quantified at 24, 48 and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells treated with 0.2% of dimethyl sulfoxide. Results in (b), (c), and (d) are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. *** means p-values below .001

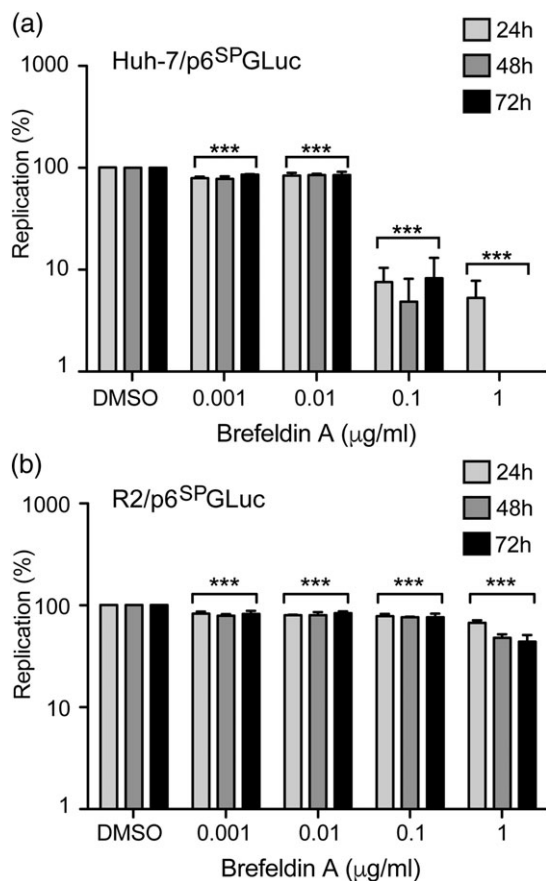


FIGURE 3 Hepatitis E virus replication in brefeldin A-resistant cells. Huh-7 cells (a) and brefeldin A-resistant R2 cells (b) were electroporated with p6^{SP}GLuc RNA and treated for 16 hr with brefeldin A at indicated concentrations. Luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells treated with 0.2% of dimethyl sulfoxide. Results are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. *** means *p*-values below .001

2.4 | Expression of wild-type GBF1 or BFA-resistant GBF1 mutant rescues HEV replication in BFA-treated cells

To further confirm that GBF1 is the only host factor sensitive to BFA that is required for HEV replication, we next used a GBF1 complementation assay (Figure 4). Indeed, it has been shown that GBF1 overexpression or expression of the M832L BFA-resistant GBF1 mutant can rescue HCV replication from BFA inhibition whereas expression of the E794K catalytically inactive GBF1 mutant cannot (Farhat et al., 2016; Goueslain et al., 2010; Jackson & Casanova, 2000; Niu, Pfeifer, Lippincott-Schwartz, & Jackson, 2005). We therefore transfected Huh-7.5 cells with plasmids expressing YFP-fused wildtype GBF1 (GBF1wt), M832L BFA-resistant GBF1 mutant (GBF1ML) or E794K inactive GBF1 mutant (GBF1EK). A plasmid expressing only the YFP protein was used as a control (YFP). Two days post-transfection, expression levels of YFP-fused GBF1 proteins and YFP protein were controlled by western blotting (Figure 4a) and fluorescent microscopy (Figure 4b), and transfected with the full-length infectious p6 RNA (Figure 4c). Cells were next treated for 16 hr with 75 ng/ml BFA, a concentration that inhibits approximately

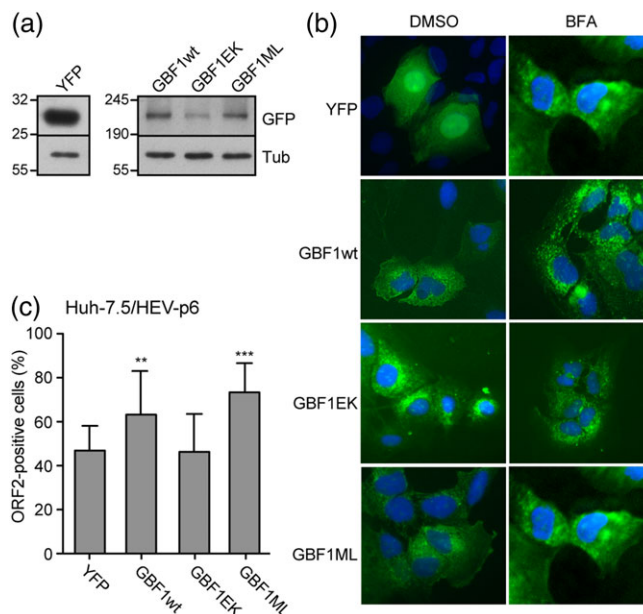


FIGURE 4 GBF1 complementation assay in cells treated with brefeldin A (BFA). Huh-7.5 cells were transfected with a plasmid expressing the YFP protein or with plasmids expressing YFP-fused wildtype GBF1 (GBF1wt), M832L BFA-resistant GBF1 mutant (GBF1ML), or E794K inactive GBF1 mutant (GBF1EK). Two days post-transfection, expression levels of YFP-fused GBF1 proteins, and YFP protein were controlled by western blotting with an anti-GFP antibody (a) and microscopy (b). Expression of constructs in cells treated with BFA (75 ng/ml) is shown in (b). (c) Two days post-transfection, cells were electroporated with the full-length infectious p6 RNA and cultured for 16 hr in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) or 75 ng/ml BFA. At 96 hr p.e., cells were fixed and analysed by immunofluorescence with an anti-ORF2 capsid protein antibody. For each construct, the percentage of ORF2-positive cells in BFA-treated cells is compared to cells cultured in the absence of BFA. Results are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. ** and *** mean *p*-values below .01 and .001, respectively

60% of the HEV replication. It has to be noted that BFA treatment had no impact on the subcellular localisation of GBF1 proteins (Figure 4b). Four days p.e., cells were fixed and analysed by immunofluorescence with an anti-ORF2 capsid protein antibody, as described in Figure 1. For each transfection, control DMSO values were set to 100%, and the corresponding percentage was calculated for the BFA treatment condition. As shown in Figure 4c, upon treatment with BFA, the number of ORF2-positive cells was reduced by approximately 50% in cells transfected with YFP and GBF1EK mutant. In contrast, overexpression of GBF1wt led to an increase of 20% in the number of ORF2-positive cells, and the expression of the BFA-resistant mutant M832L restored more than 35% of HEV replication, as compared to DMSO treated cells, indicating a protective effect of functional GBF1 overexpression over BFA-induced inhibition of HEV replication.

2.5 | GBF1 is likely required for the activity of HEV replication complexes and not for their assembly

Several viruses of the *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, and *Flaviviridae* families rely on GBF1 for their replication (Belov et al., 2008; Carpp, Rogers, Moritz, & Aitchison, 2014; Goueslain et al., 2010; Lanke

et al., 2009; Liang, Zheng, Bao, & Zhang, 2017; Qin et al., 2014; van der Linden et al., 2010; Verheije et al., 2008; Wang, Du, & Jin, 2014). However, it has been shown that GBF1 is not involved in the formation of poliovirus, mouse hepatitis coronavirus, and HCV replication complexes but rather in their maturation or activity (Belov et al., 2008; Goueslain et al., 2010; Verheije et al., 2008). In order to investigate how GBF1 is involved in HEV replication, we next performed time-course experiments in which BFA was added for 16 hr at various time points (0, 24, and 48 hr) after electroporation, and replication levels were measured at 24, 48 and 72 hr p.e. (Figure 5). A strong inhibition of HEV replication by BFA was observed whatever the time of addition of the drug, even when BFA was added 48 hr p.e., indicating that BFA is able to inhibit HEV replication in cells in which replication complexes are already formed. Together, these results suggest that GBF1 is required for the activity of HEV replication complexes and not for their assembly.

2.6 | Subcellular localisation of GBF1 in HEV-replicating cells and HEV ORF1-expressing cells

Because we demonstrated that GBF1 is a cellular factor required for HEV replication, we next analysed GBF1 subcellular localisation in HEV-replicating PLC3 cells using immunofluorescence confocal microscopy (Figure 6). Due to the lack of tools to probe ORF1 protein

in HEV-replicating cells (Lenggenhager et al., 2017), co-localisation studies of GBF1 with the HEV replicase could not be performed. Therefore, non-transfected PLC3 cells and cells transfected with the full-length infectious p6 clone were co-stained with antibodies directed against GBF1 and the ORF2 capsid protein. As expected, in non-transfected PLC3 cells, GBF1 staining was observed in Golgi-like perinuclear structures and in cytoplasmic small dot-like structures (Figure 6, PLC3). Similar intracellular GBF1 distributions were observed in HEV-replicating cells (Figure 6, PLC3/HEV-p6), indicating that the major subcellular localisation of GBF1 is not modified upon HEV replication and therefore is likely not recruited and stably maintained on HEV replication complexes. The same results were obtained in transfected Huh-7.5 cells (data not shown). As an alternative approach to determining whether GBF1 is recruited to the replication sites, we analysed the subcellular localisation of GBF1 in cells overexpressing the non-structural ORF1 polyprotein in combination or not with the structural ORF2 and ORF3 proteins (Figure 7). The ORF1 protein was detected with three different antibodies directed against either the Met, Hel, or Pol domain. We observe no difference in the localisation of GBF1 upon expression of the viral proteins. In addition, GBF1 and ORF1 did not co-stain regardless of the antibody used, strengthening our hypothesis that GBF1 is probably not recruited to HEV replication sites.

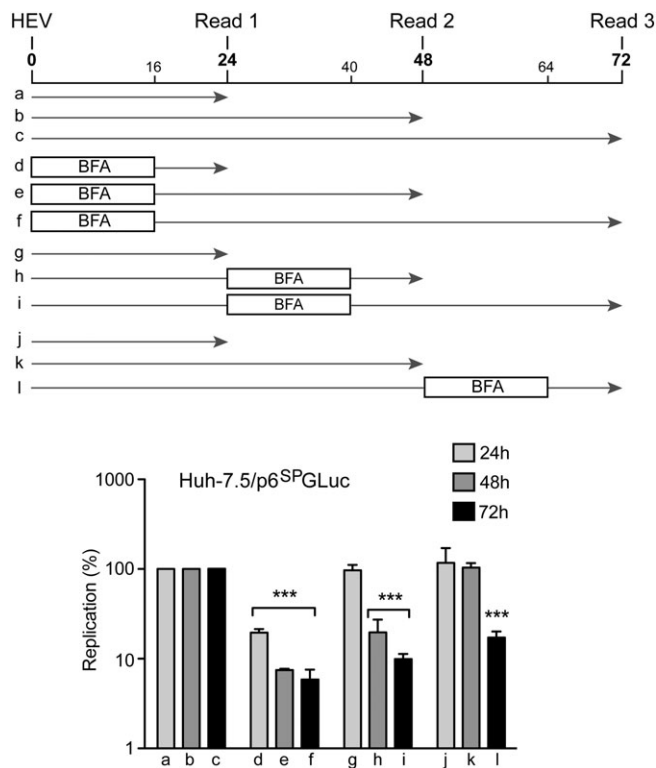


FIGURE 5 Inhibition of hepatitis E virus replication by brefeldin A (BFA) in time course experiments. Huh-7.5 cells were electroporated with p6^{SP}GLuc RNA and treated for 16 hr with BFA (0.1 μg/ml) at 0 (d–f), 24 (g–i), or 48 hr (j–l) p.e. Luciferase activities were measured at 24, 48, and 72 hr p.e. Values are presented as a percentage of replication compared to cells treated with dimethyl sulfoxide (a–c). Results are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. *** means *p*-values below .001

3 | DISCUSSION

Due to difficulties to amplify HEV in cell culture and the absence of tools to analyse HEV non-structural proteins, mechanisms leading to HEV replication are particularly poorly understood. The site of RNA replication within the host cell has not been identified yet. However, the use of vector systems showed that the non-structural ORF1 polyprotein might be membrane-associated and localised in the ERGIC, suggesting that HEV replication might occur within the early secretory pathway (Perttilä et al., 2013). In our study, we show that activity of HEV replication complexes strongly depends on GBF1, a GEF regulating the activity of Arf small G-proteins, which in turn are key regulators of the cellular secretory pathway. We demonstrate that BFA and GCA, a specific inhibitor of GBF1, inhibit HEV replication and that GBF1 is the only BFA-sensitive cellular factor required for HEV replication.

GBF1 orchestrates retrograde Golgi-to-ER transport by activating Arf proteins that regulate COPI-coated vesicles transport (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). GBF1 also participates in Golgi morphogenesis and lipid droplet metabolism (Jackson & Bouvet, 2014). In addition, GBF1 is hijacked by several positive-strand RNA viruses including *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, and *Flaviviridae* members for their replication (Belov et al., 2008; Carpp et al., 2014; Goueslain et al., 2010; Lanke et al., 2009; Liang et al., 2017; Qin et al., 2014; van der Linden et al., 2010; Verheije et al., 2008; Wang et al., 2014). For instance, GBF1 was shown to interact with poliovirus and coxsackievirus B3 (CVB3) non-structural protein 3A (Wessels et al., 2006; Wessels et al., 2007). GBF1 overexpression rescues enterovirus replication in cells treated with BFA, whereas its silencing strongly inhibits viral replication (Belov et al., 2008; Lanke et al., 2009). The precise role of GBF1 in enterovirus replication is not clear. It has been

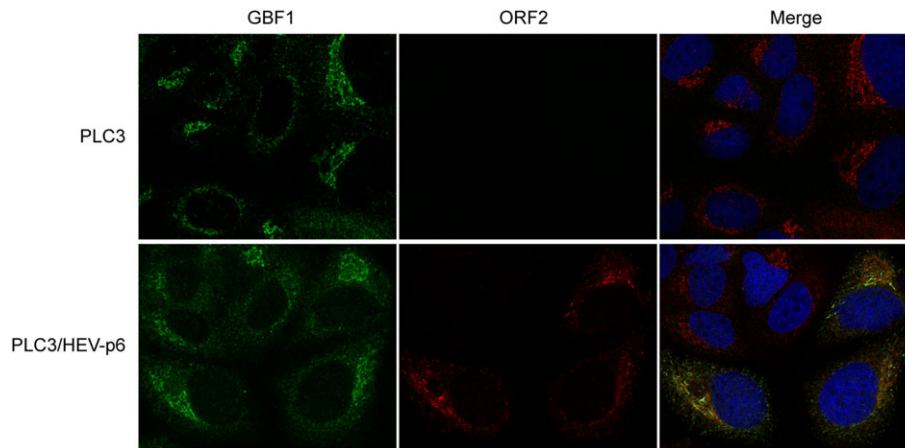


FIGURE 6 Intracellular distribution of GBF1 in hepatitis E virus (HEV)-replicating and non-replicating cells. PLC3 cells were electroporated with water or with the full-length infectious p6 strain RNA. At 3 days p.e., cells were fixed, permeabilized, and processed for double-label immunofluorescence for GBF1 (red) and ORF2 (green). Nuclei are in blue. Representative confocal images are shown together with the merge image

proposed that Arf-activating function of GBF1 would be necessary for enterovirus replication to recruit other cellular factors supporting replication such as the phosphatidylinositol kinase PI4KIII (Hsu et al., 2010). However, more recent data suggest that enterovirus replication requires the N-terminal region of the GBF1 protein but not its Arf-GEF activity (Belov, Kovtunovych, Jackson, & Ehrenfeld, 2010; Viktorova, Nchoutmboube, Ford-Siltz, & Belov, 2015). In contrast, GBF1-mediated Arf1 activation is crucial for mouse hepatitis coronavirus RNA replication (Verheije et al., 2008). GBF1 is also a host factor required for HCV replication (Goueslain et al., 2010). In contrast to enteroviruses, no interaction between GBF1 and viral proteins has been reported so far. In addition, it has been shown recently that the role of GBF1 in HCV replication is mediated by its Arf-GEF activity (Farhat et al., 2016). Interestingly, Arf4 and Arf5 were shown to be essential for mediating GBF1 function in HCV replication, yet depletion of these two Arf proteins did not inhibit the secretory pathway, instead affecting lipid metabolism (Farhat et al., 2016). In our study, we demonstrate that GBF1 has essential functions in HEV replication. Further experiments using Arf protein expression knockdown, and mutants of the catalytic Sec7 domain of GBF1 (Farhat et al., 2016), are now necessary to define the importance of Arf-GEF activity of GBF1 in HEV replication.

Many positive-strand RNA viruses manipulate the internal membranes of host cells to establish their replication complexes, frequently on the cytosolic leaflet of remodelled membranes. This compartmentalisation allows coordination of the different steps of the replication cycle, resulting in highly efficient RNA replication as well as protection of the viral genome from cell defense mechanisms. These remodelled membranes are characterised by two different types of membrane structures: the invaginated vesicle or spherule type induced for instance by Dengue virus and the double membrane vesicle induced for instance by poliovirus and HCV (reviewed in Paul, 2013). To induce and maintain such membrane rearrangements, viruses usurp cellular factors that are active on membranes. For instance, enteroviruses recruit Arf GEFs to rearrange Golgi and ERGIC membranes (Belov et al., 2006) and ER-resident reticulin proteins (Tang et al., 2007), whereas alphaviruses subvert amphiphysins

localised at the plasma membrane for membrane remodelling and viral RNA replication (Neuvonen et al., 2011). As mentioned previously, GBF1 is essential for the replication of enteroviruses, coronaviruses, and flaviviruses, all of which are viruses inducing remodelling of intracellular membranes. In the present study, we demonstrated that GBF1 is a cellular factor required for the activity of HEV replication complexes. Based on the fact that viruses using GBF1 for their replication induce membrane rearrangements, we can therefore speculate that HEV replication might depend on such membrane reshuffling. Further studies using electron microscopy of cells highly replicating the HEV genome are thus required to test this hypothesis.

In order to determine whether GBF1 is recruited by the ORF1 protein at replication complexes, as observed for poliovirus and CVB3 non-structural protein 3A (Wessels et al., 2006; Wessels et al., 2007), we analysed the subcellular distribution of GBF1. However, although the full-length protein or domains of the non-structural ORF1 protein can be detected by antibodies in cells transfected with vector systems (Lenggenhager et al., 2017; Perttilä et al., 2013), these antibodies fail to detect ORF1 protein in HEV-replicating cells (data not shown; Lenggenhager et al., 2017). This lack of tools directed against ORF1 prevents us from analysing whether GBF1 is recruited to replication complexes in HEV-replicating cells. As an indirect approach, we first analysed the subcellular distribution of GBF1 in HEV replicating and non-replicating cells and found no evidence of a change in its intracellular localisation. As a second alternative approach, we studied the subcellular distribution of GBF1 in cells overexpressing the ORF1 viral replicase and found that GBF1 intracellular pattern was unaffected by viral protein expression. In addition, we did not find any evidence of GBF1-ORF1 co-localisation. These results suggest that, as for its involvement in HCV replication, GBF1 might have an indirect role in HEV replication by activating effectors involved in HEV replication. However, further experiments of co-staining of ORF1 protein and GBF1 in HEV-replicating cells are needed to elucidate the involvement of GBF1 in HEV replication. The development of tools allowing the probing of ORF1 protein in HEV-replicating cells is thus essential to characterise the mechanisms of HEV replication and the involvement of GBF1.

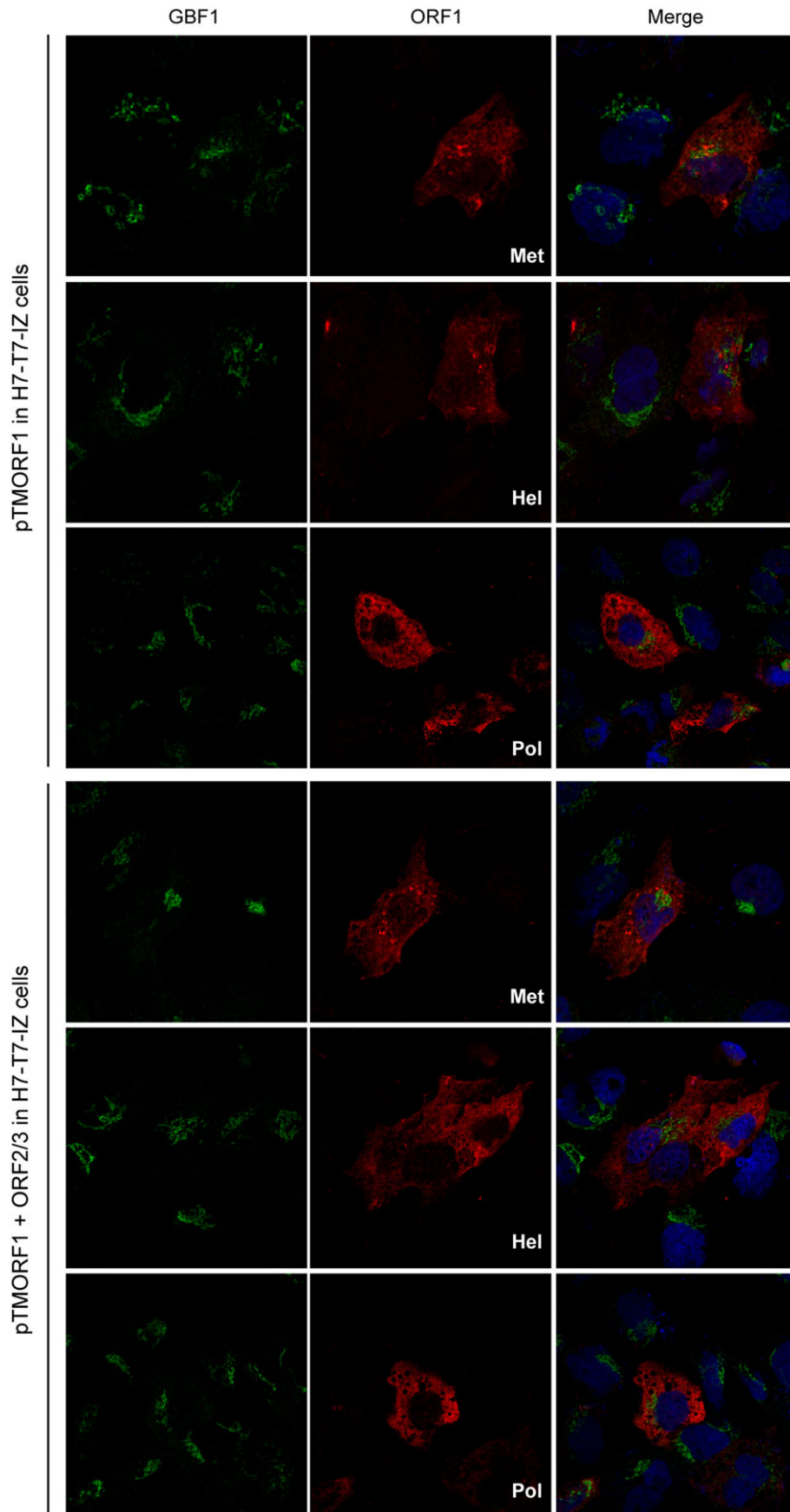


FIGURE 7 Intracellular distribution of GBF1 in hepatitis E virus ORF1-expressing cells. H7T7IZ cells were transfected with pTM-ORF1 or in combination with pTM-ORF2/3. Twenty four hours post-transfection, cells were fixed, permeabilized, and processed for double-label immunofluorescence for GBF1 (green) and ORF1 methyltransferase, helicase, or polymerase domain (red). Nuclei are in blue. Representative confocal images are shown together with the merge image

In conclusion, our results highlight a functional connection between HEV RNA replication and the early secretory pathway of the host cell. Identifying more precisely the function of GBF1 in HEV replication and a potential effect of HEV replication on intracellular membranes should also provide new insights into the understanding of cellular mechanisms underlying HEV RNA replication.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Chemicals and reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), foetal calf serum (FCS), and 4',6-diamidino-2-phenylindole were purchased from Life Technologies. Mowiol 4-88, and Golgicide A were from Calbiochem. Protease inhibitors cocktail (complete) was from Roche. Sofosbuvir was purchased from Selleckchem (Houston, USA). Other chemicals were from Sigma.

4.2 | Cell culture

Huh-7 (Nakabayashi, Taketa, Miyano, Yamane, & Sato, 1982), Huh-7.5 (Blight, Mckeating, & Rice, 2002), R2 (Farhat et al., 2013), and PLC3 (Montpellier et al., 2017) cells were grown in DMEM supplemented with 2 mM glutamax-I and 10% inactivated FCS (DMEM/FCS) at 37 °C/5% CO₂.

The Huh-7-derived H7T7IZ cells stably expressing the T7 RNA polymerase (Romero-Brey et al., 2012; kindly provided by Volker Lohmann and Ralf Bartenschlager, University of Heidelberg, Germany) were used for the transfection of the T7 promoter-driven expression vectors, pTM-ORF1, and pTM-ORF2/3 plasmids, allowing the expression of ORF1 and ORF2/3, respectively (Lenggenhager et al., 2017).

4.3 | Antibodies

Rabbit anti-HEV ORF1 polyclonal antibodies against the Met, the Hel, and the polymerase domain were kindly provided by Tero Ahola (University of Helsinki, Finland; Perttilä et al., 2013). Mouse anti-HEV ORF2 MAAb (1E6/IgG2b, antibody registry #AB-827236) was from Millipore. Mouse anti-GFP mAb was from Roche. Rabbit anti-BIG1 and BIG2 antibodies were from Bethyl Laboratories. Mouse anti-GBF1 (IgG1, antibody registry #AB-399487) was from BD Biosciences. Mouse anti-β tubulin was from Sigma. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch.

4.4 | Viability assay

Sub-confluent cell cultures grown in 96-well plates were incubated with BFA, GCA, or DMSO for 16 hr, or incubated all the time with Sofosbuvir, and kept in culture for 24, 48, or 72 hr. A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium based viability assay (CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay from Promega) was conducted as recommended by the manufacturer.

4.5 | Plasmids and transfection

Plasmids expressing the cell culture adapted gt3 Kernow C-1 strain (HEV-p6, GenBank accession number JQ679013), or the replicon expressing the *Gaussia* luciferase gene (p6GLuc) were provided by S. U. Emerson (Shukla et al., 2012). The p6GLuc replicon construct was used to generate a new replicon construct (p6^{SP}GLuc) in which the 20 first amino acids matching with the signal peptide of *Gaussia luciferase* were deleted to block luciferase secretion. Fusion polymerase chain reaction were done with external primers (5'-GCGGGGTCATGCATGGTATT-3', 5'-ACCCATACGTAGCCTGATCG-3') and internal primers (5'-GATCACCATGAAGCCCACCCGAGAACAACGA-3', 5'-TGGGCTTCATGGTATCCCATGGGCGATGC-3'). The gt1 Sar55 strain replicon expressing the *Firefly* luciferase has been described previously (Pudupakam et al., 2009) (kindly provided by X.J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA). Capped RNA transcripts were generated with the mMMESSAGE mMACHINE® kit (Ambion) and delivered into cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell™ apparatus (Bio-Rad). Plasmids expressing yellow fluorescent protein (YFP), YFP-tagged GBF1, YFP-tagged GBF1 E794K, or YFP-tagged GBF1 M832L have been described previously (Goueslain et al., 2010; Niu et al., 2005).

4.6 | Luciferase assays

P24 wells were seeded in with 2 × 10⁶ cells that were electroporated with 2.5 μg of p6^{SP}GLuc or Sar55FLuc RNA. Drugs (BFA, GCA, or Sofosbuvir) were added 2 hr p.e. and kept for 16 h. At 6, 24, 48, and 72 hr p.e., cells were lysed with the buffer provided by the manufacturer (Promega), and *Gaussia* or *Firefly* luciferase activities were determined with the corresponding luciferase assay system (Promega) and using a TriStar LB941 luminometer (Berthold). Luciferase activities at 6 hr p.e. were used to determine electroporation efficiencies.

4.7 | RNA interference

RNA interference experiments were carried out with pools of four different synthetic double-stranded siRNAs to the same target (on-target plus smart pool reagents from Dharmacon). The control used in this study was the on-target plus non-targeting siRNA #1 (D-001810-01-20). For siRNA transfection, 3 μl of lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies) was added to 0.5 ml of D-PBS and incubated for 3 min. In a six-well plate, 2.5 μl of siRNA at 20 μM was spotted in the centre of a well. In case of double siRNA transfection, 1.25 μl of each siRNA was used. Then, the diluted transfection reagent was added to the siRNA, and the mixture was incubated for 30 min at room temperature. At the end of this incubation, 2.5 × 10⁵ freshly trypsinised cells in a volume of 2 ml of culture medium were added to the transfection mix, and the cells were returned to 37 °C. Two days post-transfection, cells were trypsinised, and p6^{SP}GLuc replicon RNA was electroporated, as described previously.

4.8 | GBF1 complementation

Huh-7.5 cells seeded in six-well plates were transfected with 0.5 μg of plasmids expressing YFP-fused wild type GBF1, YFP-fused mutant

GBF1, or YFP protein with the Trans-IT LT1 reagent following the instructions of the manufacturer (Mirus). Two days post-transfection, expression of GBF1 proteins was controlled by western blotting and fluorescence microscopy. Cells were then electroporated with the infectious full-length p6 RNA and cultured for 16 hr in the presence of BFA (75 ng/ml). At 96 hr p.e., cells were fixed with methanol and stained with an anti-ORF2 antibody (1E6). For each transfection with GBF1 proteins or YFP, ORF2-positive cells values were adjusted to 100% for cells cultured in the presence of DMSO.

4.9 | Immunoblotting

Transfected cells were rinsed three times with cold PBS and lysed at 4 °C for 20 min in a buffer containing 50 mM of TrisCl, 100 mM of NaCl, 2 mM of ethylenediaminetetraacetic acid, 1% of Triton-X, 0.1% of sodium dodecyl sulfate, pH 7.5, 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, and a protease inhibitors cocktail (Complete). Insoluble material was removed by centrifugation at 4 °C. The proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Proteins of interest were revealed with specific primary antibodies, followed by species-specific secondary antibodies conjugated to peroxidase. Proteins were visualised using enhanced chemiluminescence (ECL Plus; GE healthcare). The signals were recorded using a LAS 3000 apparatus (Fujifilm).

4.10 | Immunofluorescence microscopy

Indirect immunofluorescence labelling was performed as previously described (Rouille et al., 2006). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Cells transfected with the full-length p6 RNA were stained with a mouse anti-ORF2 MAb (1E6), and positive cells were counted for each condition.

For confocal microscopy analyses, PLC3 cells transfected with the full-length p6 RNA were co-stained with GBF1 and ORF2 antibodies. H7T7IZ cells transfected with pTM-ORF1 or in combination with pTM-ORF2/3 were co-stained with GBF1 and ORF1 Met, Hel, or polymerase domain antibodies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Ung for his technical assistance. We are grateful to S. U. Emerson, X. J. Meng, V. Lohmann, R. Bartenschlager, and T. Ahola for providing us with reagents. We thank A. Weber for his contribution. We thank the imaging core facility of the Biolmaging Center Lille-Nord de France for access to the instruments.

DISCLOSURES

All authors disclose no conflicts.

ORCID

Catherine L. Jackson  <http://orcid.org/0000-0002-0843-145X>

Yves Rouillé  <http://orcid.org/0000-0003-0788-9271>

Laurence Cocquerel  <http://orcid.org/0000-0002-2136-5178>

REFERENCES

- Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J., & Ehrenfeld, E. (2006). Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *Journal of Virology*, *81*, 558–567.
- 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.
- Belov, G. A., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., & Ehrenfeld, E. (2010). Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cellular Microbiology*, *12*, 1463–1479.
- Blight, K. J., Mckeating, J. A., & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*, *76*, 13001–13014.
- Carpp, L. N., Rogers, R. S., Moritz, R. L., & Aitchison, J. D. (2014). Quantitative proteomic analysis of host-virus interactions reveals a role for Golgi brefeldin A resistance factor 1 (GBF1) in dengue infection. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*, 2836–2854.
- Dao Thi, V. L., Debing, Y., Wu, X., Rice, C. M., Neyts, J., Moradpour, D., & Gouttenoire, J. (2016). Sofosbuvir inhibits hepatitis E virus replication in vitro and results in an additive effect when combined with ribavirin. *Gastroenterology*, *150*, 82–85.e4.
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J., & Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of Hepatology*, *65*, 200–212.
- Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A., & Pavio, N. (2016). Zoonotic hepatitis E virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes. *Virus*, *8*, 270.
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*, 347–358.
- Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C. L., ... Rouillé, Y. (2013). Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin a-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS One*, *8*, e74491.
- Farhat, R., Séron, K., Ferlin, J., Fénéant, L., Belouzard, S., Goueslain, L., ... Rouillé, Y. (2016). Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cellular Microbiology*, *18*, 1121–1133.
- Gillingham, A. K., & Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*, 579–611.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingard, P., Descamps, V., Duverlie, G., ... Rouillé, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*, *84*, 773–787.
- Holla, R., Ahmad, I., Ahmad, Z., & Jameel, S. (2013). Molecular virology of hepatitis E virus. *Seminars in Liver Disease*, *33*, 003–014.
- Hsu, N.-Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.-H., Takvorian, P. M., ... Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, *141*, 799–811.
- Jackson, C. L., & Bouvet, S. (2014). Arfs at a glance. *Journal of Cell Science*, *127*, 4103–4109.
- Jackson, C. L., & Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: The Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology*, *10*, 60–67.
- Kamar, N., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J., & Dalton, H. R. (2016). Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver International*, *36*, 467–472.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G., & Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin a: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of Cell Biology*, *116*, 1071–1080.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8259–8263.
- Lanke, K. H. W., van der Schaar, H. M., Belov, G. A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C. L., ... van Kuppeveld, F. J. M. (2009). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *Journal of Virology*, 83, 11940–11949.
- Lenggenhager, D., Gouttenoire, J., Malehmir, M., Bawohl, M., Honcharova-Biletska, H., Kreutzer, S., ... Weber, A. (2017). Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *Journal of Hepatology*, 67, 471–479.
- Liang, W., Zheng, M., Bao, C., & Zhang, Y. (2017). CSFV proliferation is associated with GBF1 and Rab2. *Journal of Biosciences*, 42, 43–56.
- van der Linden, L., van der Schaar, H. M., Lanke, K. H. W., Neyts, J., & van Kuppeveld, F. J. M. (2010). Differential effects of the putative GBF1 inhibitors Golgicide A and AG1478 on enterovirus replication. *Journal of Virology*, 84, 7535–7542.
- Montpellier, C., Wychowski, C., Sayed, I. M., Meunier, J.-C., Saliou, J.-M., Ankavay, M., ... Cocquerel, L. (2017). Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology*, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42, 3858–3863.
- Neuvonen, M., Kazlauskas, A., Martikainen, M., Hinkkanen, A., Ahola, T., & Saksela, K. (2011). SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathogens*, 7, e1002383.
- Niu, T.-K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J., & Jackson, C. L. (2005). Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1213–1222.
- Paul, D. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *WJV*, 2, 32.
- Perttilä, J., Spuul, P., & Ahola, T. (2013). Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *Journal of General Virology*, 94, 807–816.
- 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. *Journal of Virology*, 83, 384–395.
- Qin, Y., Lin, L., Chen, Y., Wu, S., Si, X., Wu, H., ... Zhong, Z. (2014). Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4, 284–294.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., ... Bartenschlager, R. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens*, 8, e1003056.
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., ... Dubuisson, J. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 80, 2832–2841.
- Sáenz, J. B., Sun, W. J., Chang, J. W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N. S., & Haslam, D. B. (2009). Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nature Chemical Biology*, 5, 157–165.
- Sayed, I. M., Vercouter, A.-S., Abdelwahab, S. F., Vercauteren, K., & Meuleman, P. (2015). Is hepatitis E virus an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology*, 62, 1883–1892.
- 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.
- Smith, D. B., Simmonds, P., members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., ... Purdy, M. A. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology*, 95, 2223–2232.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., & Reyes, G. R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185, 120–131.
- Tang, W. F., Yang, S. Y., Wu, B. W., Jheng, J. R., Chen, Y. L., Shih, C. H., ... Horng, J. T. (2007). Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5888–5898.
- Verheije, M. H., Raaben, M., Mari, M., Lintelo Te, E. G., Reggiori, F., van Kuppeveld, F. J. M., ... de Haan, C. A. M. (2008). Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathogens*, 4, e1000088.
- Viktorova, E. G., Nchoutmboube, J., Ford-Siltz, L. A., & Belov, G. A. (2015). Cell-specific establishment of poliovirus resistance to an inhibitor targeting a cellular protein. *Journal of Virology*, 89, 4372–4386.
- Wang, J., Du, J., & Jin, Q. (2014). Class I ADP-ribosylation factors are involved in enterovirus 71 replication. *PLoS One*, 9, e99768.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K. H. W., Melchers, W. J. G., Jackson, C. L., & van Kuppeveld, F. J. M. (2007). Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Journal of Virology*, 81, 5238–5245.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K. H. W., van Dooren, S. H. J., Jackson, C. L., Melchers, W. J. G., & van Kuppeveld, F. J. M. (2006). Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *Journal of Virology*, 80, 11852–11860.

How to cite this article: Farhat R, Ankavay M, Lebsir N, et al. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. *Cellular Microbiology*. 2018;20:e12804. <https://doi.org/10.1111/cmi.12804>

BIBLIOGRAPHIE

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

- Arankalle, V.A. et al., 1988. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *The Lancet*, 1(8585), pp.550–554.
- Arankalle, V.A. et al., 1993. Hepatitis E virus infection in pregnant rhesus monkeys. *The Indian journal of medical research*, 97, pp.4–8.
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S. & Chobe, L.P., 1999. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *Journal of hepatology*, 30(2), pp.199–204.
- Baechlein, C. & Becher, P., 2017. No evidence for zoonotic hepatitis E virus infection through dairy milk in Germany. *Hepatology*, 65(1), pp.394–395.
- Bagdassarian, E. et al., 2018. The Amino-Terminal Region of Hepatitis E Virus ORF1 Containing a Methyltransferase (Met) and a Papain-Like Cysteine Protease (PCP) Domain Counteracts Type I Interferon Response. *Viruses*, 10(12), pii: E726.
- Baigent, S.J. & McCauley, J.W., 2001. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus research*, 79(1-2), pp.177–185.
- Balayan, M.S. et al., 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 20(1), pp.23–31.
- Barnaud, E. et al., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), pp.5153–5159.
- Bause, E., 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochemical Journal*, 209(2), pp.331–336.
- Behrendt, P. et al., 2017. Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNF α treatment. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, 84(2), pp.217–219.
- Behrendt, P. et al., 2016. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. *The Journal of infectious diseases*, 214(3), pp.361–368.
- Bhatia, V. et al., 2008. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology*, 48(5), pp.1577–1585.
- Biliotti, E. et al., 2018. Autochthonous acute hepatitis E: treatment with sofosbuvir and ribavirin. *Infection*, 46(5), pp.725–727.
- Block, T.M. et al., 1994. Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxyojirimycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp.2235–2239.
- Blondot, M.-L., Bruss, V. & Kann, M., 2016. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*, 64(1 Suppl), pp.S49–S59.
- Bose, P.D. et al., 2014. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *Journal of General Virology*, 95(Pt 6), pp.1266–1271.

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

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

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

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

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

- Jans, D.A., Martin, A.J. & Wagstaff, K.M., 2019. Inhibitors of nuclear transport. *Current opinion in cell biology*, 58, pp.50–60.
- Jilani, N. et al., 2007. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(5), pp.676–682.
- Jirintai, S. et al., 2012. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus research*, 170(1-2), pp.126–137.
- Jirintai, S. et al., 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus research*, 185, pp.92–102.
- Juillard, F. et al., 2009. Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *Journal of virology*, 83(24), pp.12759–12768.
- Kalia, M. et al., 2009. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *Journal of virology*, 83(24), pp.12714–12724.
- Kamar, N. & Pischke, S., 2018. Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, pii: a031872.
- Kamar, N. et al., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *The New England journal of medicine*, 358(8), pp.811–817.
- Kamar, N. et al., 2010. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *American Journal of Transplantation*, (10), pp. 1321–1324.
- Kamar, N., Bendall, R.P., et al., 2011. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), pp.173–179.
- Kamar, N., Garrouste, C., et al., 2011. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*, 140(5), pp.1481–1489.
- Kanade, G.D., Pingale, K.D. & Karpe, Y.A., 2018. Activities of Thrombin and Factor Xa Are Essential for Replication of Hepatitis E Virus and Are Possibly Implicated in ORF1 Polyprotein Processing. *Journal of virology*, 92(6), pii: e01853-17.
- Kannan, H. et al., 2009. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *Journal of virology*, 83(13), pp.6375–6382.
- Kapur, N. et al., 2012. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Viral Hepatitis*, 19(6), pp.436–448.
- Karayiannis, P., 2017. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology international*, 11(6), pp.500–508.

- Kawai, T. & Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), pp.637–650.
- Kenfak-Foguena, A. et al., 2011. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), pp.1074–1078.
- Kenney, S.P. & Meng, X.-J., 2015. The Lysine Residues within the Human Ribosomal Protein S17 Sequence Naturally Inserted into the Viral Nonstructural Protein of a Unique Strain of Hepatitis E Virus Are Important for Enhanced Virus Replication J. H. J. Ou, ed. *Journal of virology*, 89(7), pp.3793–3803.
- Kenney, S.P. et al., 2015. Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101. *Virology*, 486, pp.198–208.
- Khaskheli, M.-N. et al., 2015. Acute Hepatitis E Viral Infection in Pregnancy and Maternal Morbidity. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan*, 25(10), pp.734–737.
- Khuroo, M.S. & Kamili, S., 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *Journal of Viral Hepatitis*, 10(1), pp.61–69.
- Korber, B. et al., 2001. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British medical bulletin*, 58, pp.19–42.
- Kooning, E. V. et al., 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: Delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (17), pp.8259-8263.
- Krzowska-Firych, J.M. et al., 2018. Hepatitis E - A new era in understanding. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 25(2), pp.250–254.
- Kulkarni, S.P. et al., 2016. Specific memory B cell response and participation of CD4+ central and effector memory T cells in mice immunized with liposome encapsulated recombinant NE protein based Hepatitis E vaccine candidate. *Vaccine*, 34(48), pp.5895–5902.
- Kumar, A. et al., 2014. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine*, 65(1), pp.95–104.
- Kumar, R.M. et al., 2001. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 100(1), pp.9–15.
- Kundra, R. & Kornfeld, S., 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry*, 274(43), pp.31039–31046.
- Lapa, D. et al., 2016. Diagnostic performance of hepatitis E virus antigen assay in hepatitis E virus acute infection. *The new microbiologica*, 40(4), pp.246–250.

- Larkin, A. & Imperiali, B., 2011. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry*, 50(21), pp.4411–4426.
- Lavie, M., Hanouille, X. & Dubuisson, J., 2018. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Frontiers in immunology*, 9 (910), pp.1–9.
- Lee, G.-H. et al., 2016. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150(2), pp.355–7.e3.
- Lei, E.P. & Silver, P.A., 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Developmental cell*, 2(3), pp.261–272.
- Lei, Q. et al., 2016. ORF3 of Hepatitis E Virus Inhibits the Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemotactic Factors in LPS-Stimulated Human PMA-THP1 Cells by Inhibiting NF- κ B Pathway. *Viral immunology*, 29(2), pp.105–111.
- Lenggenhager, D. et al., 2017. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. Accepted Manuscript. *Journal of hepatology*, pp.1–32.
- Lhomme, S. et al., 2016. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 8(8), pii: E212.
- Lhomme, S. et al., 2012. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *Journal of virology*, 86(18), pp.10006–10014.
- Lhomme, S. et al., 2015. Mutation in the Hepatitis E Virus Polymerase and Outcome of Ribavirin Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), pp.1608–1614.
- Lhomme, S. et al., 2018. Virus de l'hépatite E : de l'organisme infecté à la réponse cellulaire. *Virologie*, 22 (5), pp.239-50.
- Li, C. et al., 2016. Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation. *Journal of virology*, 90(19), pp.8478–8486.
- Li, H.-C. et al., 2010. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLOS Pathogens*, 6(10), p.e1001162.
- Li, J. et al., 2015. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. *Viruses*, 7(5), pp.2668–2682.
- Li, S.W. et al., 2005. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*, 23(22), pp.2893–2901.
- Li, T.C. et al., 2015. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology*, 96(Pt 6), pp.1320–1327.
- Li, T.C., Yoshizaki, S., et al., 2016. Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5. *Virus research*, 213, pp.283–288.
- Li, T.C., Zhou, X., et al., 2016. Production of infectious dromedary camel hepatitis E virus by a reverse genetic system: Potential for zoonotic infection. *Journal of hepatology*, 65(6), pp.1104–1111.

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

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

- Nguyen, H.T. et al., 2012. A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *Journal of General Virology*, 93(Pt 3), pp.526–530.
- Nimgaonkar, I. et al., 2018. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(2), pp.96–110.
- Ojha, N.K. & Lole, K.S., 2016. Hepatitis E virus ORF1 encoded macro domain protein interacts with light chain subunit of human ferritin and inhibits its secretion. *Molecular and cellular biochemistry*, 417(1-2), pp.75–85.
- Okamoto, H., 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *Journal of gastroenterology*, 48(2), pp.147–158.
- Oshiro, Y. et al., 2014. Mode of swine hepatitis E virus infection and replication in primary human hepatocytes. *Journal of General Virology*, 95(Pt 12), pp.2677–2682.
- Paliwal, D. et al., 2014. Hepatitis E virus (HEV) protease: a chymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein. *Journal of General Virology*, 95(Pt 8), pp.1689–1700.
- Panda, S.K. et al., 1989. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: recovery of virus-like particles from an epidemic in south Delhi and transmission studies in rhesus monkeys. *Hepatology*, 10(4), pp.466–472.
- Panda, S.K. et al., 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *Journal of virology*, 74(5), pp.2430–2437.
- Park, S.B., 2012. Hepatitis E vaccine debuts. *Nature*, 491(7422), pp.21–22.
- Parvez, M.K., 2017. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “Y-domain”: Effects on RNA replication and virion infectivity. *World journal of gastroenterology*, 23(4), pp.590–602.
- Patra, S. et al., 2007. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Annals of internal medicine*, 147(1), pp.28–33.
- Pavio, N., Merbah, T. & Thébault, A., 2014. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), pp.1925–1927.
- Perwitasari, O. et al., 2016. Antiviral Efficacy of VerdineXor In Vivo in Two Animal Models of Influenza A Virus Infection. *Plos one*, 11(11), p.e0167221.
- Pérez-Gracia, M.T., Suay-García, B. & Mateos-Lindemann, M.L., 2017. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Reviews in medical virology*, 27(3), e1929.
- Péron, J.M. et al., 2007. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(5), pp.298–303.
- Pischke, S. et al., 2017. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *Journal of hepatology*, 66(5), pp.1082–1095.

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

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

- Sayed, I.M., Verhoye, L., et al., 2017. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut*, 66(5), pp.920–929.
- Schlesinger, S., Malfer, C. & Schlesinger, M.J., 1984. The formation of vesicular stomatitis virus (San Juan strain) becomes temperature-sensitive when glucose residues are retained on the oligosaccharides of the glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 259(12), pp.7597–7601.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D. & Rice, C.M., 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*, 32, pp.513–545.
- Scott P Kenney, X.-J.M., 2015. Identification and Fine Mapping of Nuclear and Nucleolar Localization Signals within the Human Ribosomal Protein S17. *Plos one*, 10 (4) pp.1–17.
- Scott, H. & Panin, V.M., 2014. The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology*, 24(5), pp.407–417.
- Seidah, N.G., 2011. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods in molecular biology*, 768, pp.23–57.
- Shimata, K. et al., 2018. A Case Report of Living Donor Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Related to Hepatitis E Virus Infection. *Progress in transplantation*, 28(1), pp.91–92.
- Shrestha, M.P. et al., 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *The New England journal of medicine*, 356(9), pp.895–903.
- Shukla, P. et al., 2011. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), pp.2438–2443.
- Shukla, P. et al., 2012. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol* 86(10), pp.5697–5707.
- Singh, N.K. & Gangappa, M., 2007. Acute immune thrombocytopenia associated with hepatitis E in an adult. *American journal of hematology*, 82(10), pp.942–943.
- Skehel, J.J. & Wiley, D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69, pp.531–569.
- Smith, D.B. & Simmonds, P., 2015. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis--a virus or host-specific pathology? *Liver International*, 35(4), pp.1334–1340.
- Smith, D.B. et al., 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology*, 95(Pt_10), pp.2223–2232.
- Sood, A., Midha, V. & Sood, N., 2000. Guillain-Barré syndrome with acute hepatitis E. *The American journal of gastroenterology*, 95(12), pp.3667–3668.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R. & Ovchinnikov, L.P., 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 72(13), pp.1439–1457.

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

- Takahashi, S. et al., 1993. A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(2), pp.1019–1026.
- Takayama, I. et al., 2012. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424(1), pp.45–55.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews*, 227(1), pp.75–86.
- Tam, A.W. et al., 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology*, 238(1), pp.94–102.
- Tamura, A. et al., 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology research*, 37(2), pp.113–120.
- Tanaka, T. et al., 2009. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp.1906–1910.
- Tanaka, T. et al., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *The Journal of general virology*, 88(Pt 3), pp.903–911.
- Tang, X. et al., 2011. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp.10266–10271.
- Tei, S. et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362(9381), pp.371–373.
- Tian, Y. et al., 2017. Systematic identification of hepatitis E virus ORF2 interactome reveals that TMEM134 engages in ORF2-mediated NF- κ B pathway. *Virus research*, 228, pp.102–108.
- Ticehurst, J. et al., 1992. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 165(5), pp.835–845.
- Todesco, E. et al., 2018. Chronic hepatitis E in a heart transplant patient: sofosbuvir and ribavirin regimen not fully effective. *Antiviral therapy*, 23(5), pp.463–465.
- Todt, D. et al., 2016. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut*, 65(10), pp.1733–1743.
- Todt, D. et al., 2018. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral research*, 157, pp.151–158.
- Tsarev, S.A. et al., 1995. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *The Journal of infectious diseases*, 172(1), pp.31–37.

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

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

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

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