# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE Faculté de Médecine de Lille

École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de : Docteur de l'Université de Lille Spécialité : Virologie fondamentale

Étude de la maturation protéolytique et du trafic intracellulaire de la protéine de capside ORF2 du Virus de l'Hépatite E (HEV)

Sous la supervision de Dr Laurence COCQUEREL (HDR)

Rédigée et soutenue publiquement par

Martin Ferrié

Le 10 Novembre 2023

Devant le jury composé de :

Pr Réjane PAUMELLE-LESTRELIN Dr Nicole PAVIO Pr Emmanuelle BLANCHARD-LAUMONNIER Dr François FOULQUIER Pr Philip MEULEMAN Dr Laurence COCQUEREL Présidente du jury Rapportrice Rapportrice Examinateur Examinateur Directrice de thèse



À ma Maman,

« L'amour de la mère est le seul amour invincible, éternel comme la naissance » André Malraux

# Remerciements

C'est en me penchant sur l'écriture de ces mots que je me rends compte du chemin parcouru depuis mon premier jour au sein au laboratoire, il y a sept ans maintenant. J'ai eu la chance de croiser une multitude de personnes au cours de ces sept années et je tenais en ce sens à m'excuser au préalable si je venais à oublier l'un ou l'une d'entre vous.

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, **Laurence Cocquerel**. Je me souviens du premier jour où tu m'as accueilli au laboratoire comme si c'était hier, avec la bienveillance et la bonne humeur qui te caractérisent. Tu m'as ensuite pris sous ton aile, sous laquelle j'ai pu tant apprendre, autant à la paillasse qu'en dehors. Merci de m'avoir transmis ta rigueur, tes connaissances et de m'avoir autant fait confiance. Grâce à tes nombreuses qualités humaines, tu m'as permis de grandir et m'accomplir en tant que scientifique. Tu m'as également permis de m'affirmer scientifiquement au fur et à mesure de ces années. Ces mots ne suffisent pas pour exprimer la gratitude que j'éprouve à ton égard.

Je souhaite remercier **Jean Dubuisson** de m'avoir accepté à chaque reprise au sein de son laboratoire. Merci pour ta disponibilité, tes questions et tes conseils, qui m'ont permis de faire évoluer mes projets de thèse. Merci également pour ton humour.

J'exprime toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse, **Réjane Paumelle-Lestrelin, Nicole Pavio, François Foulquier, Emmanuelle Blanchard-Laumonnier et Philip Meuleman** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie **Réjane Paumelle-Lestrelin** et **Nicole Pavio**, qui en plus d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse, ont fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour votre bienveillance, votre implication et pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux au cours de ces quatre années. Vos conseils précieux ont permis de faire évoluer significativement mon projet.

Un immense merci également à l'ensemble du groupe HEV, sans votre soutien, vos conseils et votre aide, mes projets de thèse n'auraient pas été ce qu'ils sont aujourd'hui. Ce fût un véritable travail d'équipe ! Merci également pour votre bienveillance tout au long de ces années. Surtout, restez comme vous êtes !

**Claire**, merci pour tout ce que tu as fait pour moi pendant toutes ces années, tant au laboratoire qu'en dehors. La bienveillance et l'altruisme dont tu fais preuve font de toi un binôme idéal. On croise peu de personnes comme toi au cours d'une vie. J'espère que l'on aura à nouveau la chance de travailler ensemble à l'avenir.

**Cécile-Marie**, merci pour ta patience, ta rigueur, ta bienveillance et ta gentillesse. Merci également pour la confiance que tu m'as accordée dans les enseignements de parasitologie.

**Virginie**, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton rire communicatif. Merci également pour ton aide précieuse au laboratoire et ta présence dans les moments plus compliqués, je ne l'oublierai jamais.

**Peggy**, merci pour ta bonne humeur et ton humour. Merci également pour ta contribution dans mes projets.

Merci également aux étudiantes du groupe que j'ai eu la chance d'encadrer pour votre implication respective dans mes projets.

Je souhaite remercier les étudiants en thèse du laboratoire **Esther**, **Dylan**, **Imelda**, **Malak et Orphéas** pour votre soutien et votre aide au cours de ces années. Je suis certain que ces années resteront gravées dans nos mémoires ! Un petit clin d'œil pour Esther et notre séjour américain à l'été 2022.

Je tiens à remercier plus largement les membres du laboratoire pour m'avoir permis de m'intégrer, de m'épanouir et de grandir au sein du laboratoire.

**Yves**, merci pour l'aide que tu m'as apportée dans bon nombre de mes projets et pour la multitude d'anticorps que tu m'as fournis. Merci également pour ton humour, tes blagues et les nombreux bons moments que nous avons passé en dehors du labo. J'espère qu'il y en aura d'autres à l'avenir.

**Adeline**, merci pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir, merci pour les nombreux bons moments que nous avons passé au laboratoire et en dehors.

**Soph**, merci pour tout : ton aide au laboratoire, ton humour et les blagues qui te caractérisent mais également pour ton oreille attentive.

**Nathalie, Karine, Sandrine, Lowiese, Muriel et Anne**, merci pour votre collaboration et votre sympathie au cours de ces nombreuses années au sein du laboratoire.

Je remercie également les anciens du laboratoire, Maliki, Kévin, Cyrine, Karoline, Thibaut, Charline et Lydia. Maliki, tu m'as encadré à de nombreuses reprises lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai beaucoup appris à tes côtés grâce à tes grandes qualités humaines, ton professionnalisme et ton altruisme mais également ta bonne humeur communicative. Tu es rapidement devenu un ami et je suis très content de voir que tu t'épanouis dans ta vie personnelle et professionnelle. Tu resteras toujours un exemple de résilience et de dépassement de soi pour moi. Kévin, ce fut un réel plaisir de partager mes trois premières années de thèse avec toi. Nous avons passé de très bons moments au laboratoire et en dehors, qui resteront dans ma mémoire. **Cyrine**, ma voisine de paillasse, nous aurons passé de nombreux bons moments à la paillasse et en dehors, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Tu es également un exemple de force et de résilience pour moi. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites. Karoline, merci pour ton humour et ces bons moments passés au laboratoire ou en dehors. Thibaut, merci pour ton humour et les coups de gueule qui te caractérisent. Merci à nouveau pour ton aide lors de ma recherche de stage aux USA il y quelques années. Charline, merci pour ton support technique au cours de ces nombreuses années, ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés. Lydia, tu as été une des belles rencontres de ce passage au laboratoire, merci pour ton sourire quotidien et ton altruisme.

Je tiens à remercier toutes les personnes du CIIL avec qui j'ai pu échanger, tant au quotidien que lors des journées hors-site ou des work in progress. Merci à **Audrey, Alexandre et Cécile** de la plateforme PLBS pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Je remercie également mes collègues du laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale de la Faculté de Pharmacie de Lille. Merci à **El-Moukhtar** de m'avoir fait confiance trois années de suite en m'intégrant à l'équipe pédagogique. Merci à **Magali, Christine, Annie, Cécile-Marie et Muriel** pour votre accueil et votre bienveillance. Merci pour vos nombreux conseils ainsi que vos partages de connaissances et d'expériences. Ce fût une expérience riche en enseignements pour moi.

Un immense merci à mes amis de longue date, nous nous sommes rencontrés au début de nos études sur les bancs de l'Université et nous voici quasiment tous titulaires d'un doctorat. Que de chemin parcouru ! Et ce n'est que le début. **Anthony, Nicolas, Alan**, on se sera soutenus et aidés mutuellement au cours de nos thèses. On a aussi passé de très bons moments en dehors du labo dont certains resteront gravés dans nos mémoires, il fallait au moins ça pour compenser notre stress. Vous êtes comme des frères pour moi et j'ai hâte de vivre la vie post-thèse à vos côtés ! **Bernardo**, un grand merci pour tous ces bons moments passés en dehors du labo avec ta petite famille et pour ton soutien. **Jo**, un grand merci pour ta gentillesse et ton humour, on aura passé de très bons moments en dehors du labo et ce n'est que le début. Félicitations (pour la trentième fois environ) pour ta titularisation, tu le méritais tellement ! Merci également à **Laurence, Anthony, Priscilla, Morgan, Valério et Julie** pour tous ces moments qui m'ont permis de décompresser au cours de ma thèse, vous êtes de vrais amis !

Je souhaite terminer ces remerciements par ma famille et celle de ma Alice. Tout d'abord je remercie mes parents, vous avez toujours fait votre maximum pour que je puisse étudier dans les meilleures conditions. Il est difficile pour moi de résumer en quelques mots tout ce que vous avez fait pour moi et les mots me manquent pour vous dire ce que je ressens. Merci pour votre amour et les valeurs que vous m'avez inculquées. Sans vous, rien de tout ça n'aurait été possible. **Papa**, merci pour ton soutien ces dernières années, surtout dans les moments de doute. J'espère t'avoir rendu fier. **Maman**, j'espère aussi que tu es fière du chemin parcouru depuis toutes ces années. Je t'avais promis de faire mon maximum pour réussir la fin de mes études et cette thèse, j'espère avoir tenu parole. Papa, Maman, merci encore, je vous aime ! Je remercie également ma sœur **Charlotte** et mon frère **Lucas** pour leur soutien au cours de ces longues années ! Je tiens à remercier mes grands-parents pour leur soutien permanent, et plus particulièrement ma grandmère qui me demandait toujours si j'avais terminé ma thèse et qui a chaque fois me disait « Oh la la la, c'est long ! ». Ça y est **Mamie**, ma thèse se termine. Malheureusement, tu n'es plus là pour le voir mais j'espère que tu es fière de cet aboutissement.

Je souhaite également remercier la famille d'Alice et notamment ses deux sœurs, **Marie et Laure**, pour leur soutien permanent. Je termine par celle qui partage ma vie, **Alice**. Tu auras toujours été là pour me soutenir dans les moments plus difficiles. Merci d'avoir partagé mes doutes mais aussi mes joies. Merci d'être comme tu es, j'ai vraiment de la chance de t'avoir à mes côtés : je t'aime. Merci également à toute la troupe.

Pour conclure, je remercie l'Institut Pasteur de Lille, la région Hauts-de-France, INSERM Transfert et l'ANRS-Maladies infectieuses émergentes pour le financement de mes travaux de thèse.

# Résumé

L'infection par le virus de l'Hépatite E (HEV) est un problème majeur de santé publique qui toucherait 100 millions de personnes et tuerait 100 000 personnes chaque année dans le monde. Le HEV est la première cause d'hépatite aigüe dans le monde. En France, la séroprévalence s'élève à 22,4%. Ce virus se transmet par voie féco-orale ou par la consommation de viande contaminée mal cuite. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à la protéine de capside ORF2, qui est l'unité structurale des particules virales et un acteur central du cycle infectieux du HEV. La protéine ORF2 est une protéine de 660 acides aminés qui possède un peptide signal N-terminal et trois sites potentiels de N-glycosylation. Au cours de son cycle infectieux, le HEV produit au moins trois formes de sa protéine de capside : (i) la forme ORF2g (pour glycosylée) et (ii) la forme ORF2c (pour clivée), abréviées ORF2g/c, qui sont des formes glycosylées et massivement sécrétées dans les surnageants de culture ou le sérum des patients infectés, et (iii) la forme ORF2i (pour infectieuse), qui n'est pas glycosylée et qui est associée aux particules virales.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai étudié les mécanismes de maturation protéolytique et de trafic intracellulaire de la protéine ORF2. Plus précisément, j'ai d'abord montré que la protéine ORF2 était importée dans le noyau des cellules infectées par le biais d'un mécanisme dépendant de l'Importine- $\alpha$ 1, ceci grâce à un motif riche en résidus arginine situé à l'extrémité N-terminale de l'ORF2 et nommé ARM. La protéine ORF2 est ensuite exportée vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant de l'exportine CRM1, ceci grâce à trois sites d'export nucléaire (NES9, NES10 et NES12) que nous avons identifiés dans la séquence de l'ORF2. J'ai également montré que le trafic nucléocytoplasmique de l'ORF2 régule probablement l'expression de certains gènes de l'immunité antivirale aux temps précoces de l'infection.

Dans un second temps, j'ai participé à l'identification et à la caractérisation des usines virales du HEV. En ce sens, nous avons montré que les protéine virales ORF1, ORF2 et ORF3, ainsi que l'ARN viral sont enrichis dans des structures vésiculaires et tubulaires localisées dans les régions périnucléaires des cellules infectées. Nous avons montré que ces structures sont également enrichies en marqueurs du compartiment endosomal de recyclage (ERC), comme Rab11 et CD71, indiquant que les usines virales du HEV dérivent probablement de l'ERC. En réalisant des expériences d'extinction de Rab11 avec des ARN

interférents, nous avons confirmé l'importance de l'ERC dans la production des particules virales du HEV.

Dans un troisième temps, j'ai démontré que la protéine ORF2i, qui est associée aux membranes de la voie de sécrétion, est adressée aux usines virales par un mécanisme faisant intervenir le complexe adapteur AP-1.

Dans un quatrième temps, j'ai caractérisé les mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c et ORF2i. J'ai montré que la furine, une proproprotéine convertase de la voie de sécrétion, est impliquée dans la maturation protéolytique des glycoprotéines ORF2g/c. J'ai également montré que la préséniline, qui est la sous-unité catalytique du macro-complexe  $\gamma$ -sécrétase, est impliquée dans la maturation protéolytique de la forme infectieuse ORF2i. De manière intéressante, j'ai montré que l'inhibition pharmacologique de la préséniline réduit drastiquement l'infectiosité virale dans des lignées d'hépatocarcinome humain et dans des hépatocytes primaires humains. Ces données suggèrent que l'inhibition pharmacologique de la préséniline représente une stratégie antivirale prometteuse.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse permettent de mieux comprendre les mécanismes d'adressage subcellulaire et de maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2, et ouvrent la voie au développement de nouvelles thérapies pour lutter contre le HEV.

**Mots clés :** Virus de l'hépatite E, Protéine ORF2, Trafic nucléocytoplasmique, Usines virales, Complexe adapteur AP-1, Maturation protéolytique, Furine, Préséniline.

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection is a major public health problem, affecting an estimated 100 million people and killing 100,000 every year worldwide. HEV is the leading cause of acute hepatitis worldwide. In France, seroprevalence is 22.4%. This virus is transmitted via the feco-oral route, or by eating contaminated undercooked meat. During my thesis, I focused on the ORF2 capsid protein, which is the structural unit of viral particles and a central player in the HEV lifecycle. ORF2 is a 660 amino acid protein with an N-terminal signal peptide and three potential N-glycosylation sites. During its lifecycle, HEV produces at least three forms of its capsid protein: (i) the ORF2g (for glycosylated) form and (ii) the ORF2c (for cleaved) form, abbreviated ORF2g/c, which are glycosylated forms and massively secreted in culture supernatants or serum from infected patients, and (iii) the ORF2i (for infectious) form, which is not glycosylated and is associated with viral particles.

As part of my thesis work, I studied the mechanisms of proteolytic maturation and intracellular trafficking of the ORF2 protein. More specifically, I first showed that ORF2 is imported into the nucleus of infected cells via an Importin- $\alpha$ 1-dependent mechanism, thanks to an arginine-rich motif located at the N-terminus of ORF2 and named ARM. The ORF2 protein is then exported to the cytoplasm via a CRM1 exportin-dependent mechanism, thanks to three nuclear export sites (NES9, NES10 and NES12) that we have identified in the ORF2 sequence. I have also shown that nucleocytoplasmic trafficking of ORF2 probably regulates the expression of certain antiviral immunity genes in the early stages of infection.

Secondly, I participated in the identification and characterization of HEV viral factories. We have shown that the viral proteins ORF1, ORF2 and ORF3, as well as viral RNA, are enriched in vesicular and tubular structures located in the perinuclear regions of infected cells. We have shown that these structures are also enriched in markers of the endosomal recycling compartment (ERC), such as Rab11 and CD71, indicating that HEV viral factories probably derive from the ERC. By performing Rab11 silencing experiments with siRNAs, we confirmed the importance of the ERC in the production of HEV viral particles.

Thirdly, I demonstrated that the ORF2i protein, which is associated with the membranes of the secretion pathway, is addressed to viral factories by a mechanism involving the AP-1 adaptor complex.

In a fourth step, I characterized the proteolytic maturation mechanisms of the ORF2g/c and ORF2i forms. I showed that furin, a proproprotein convertase of the secretory pathway, is involved in the proteolytic maturation of ORF2g/c glycoproteins. I have also shown that presenilin, which is the catalytic subunit of the macro-complex  $\gamma$ -secretase, is involved in the proteolytic maturation of the ORF2i form. Interestingly, I have shown that pharmacological inhibition of presenilin drastically reduces viral infectivity in human hepatocarcinoma lines and in primary human hepatocytes. These data suggest that pharmacological inhibition of presenilin represents a promising antiviral strategy.

In conclusion, the results obtained during my thesis provide a better understanding of the mechanisms of subcellular addressing and proteolytic maturation of the ORF2 capsid protein, and pave the way for the development of new therapies to combat HEV.

**Keywords :** Hepatitis E virus, ORF2 protein, Nucleocytoplasmic shuttling, Viral factories, AP-1 adaptor complex, Proteolytic maturation, Furin, Presenilin.

# Table des matières

REMER	RCIEMENTS	3
RESUM	IE	6
ABSTR	ACT	8
INTRO	DUCTION GENERALE	13
n	LE VIRUS DE L'HEPATITE E (HEV)	13
-, a)	) Historique du HEV	14
bl	) Aspects épidémiologiques de l'infection par le HEV	15
,	Répartition géographique des différents génotypes de HEV	15
	Modes de transmission du HEV	16
c)	) Aspects cliniques de l'infection par le HEV	18
	Hépatite aigüe	19
	Hepatite fulminante	19
	Manifestations extra-bénatiques	21
d	) Diagnostic de l'hépatite F	22
u)	Diagnostic indirect	24
	Diagnostic direct	25
e)	) Traitements actuels pour lutter contre le HEV et molécules à activité antivirale	26
	Traitements actuels pour lutter contre le HEV	26
0	Molécules à activité anti-HEV	27
f)	Principes généraux de prévention et vaccination	32
	Principes generaux de prevention	32 22
a	Vaccination	
y)	Classification du HEV	35
	Le génome du HEV	
	Les protéines virales	37
	1) La protéine ORF1	37
	2) La protéine ORF2	40
	3) La proteine ORF3	44
	4) La proteine OKF4	45 46
h	) Modèles d'étude du HEV	49
"'	Modèles cellulaires : cellules transformées, cellules primaires et iPSCs.	
	Organoïdes	52
	Modèles animaux	52
i)	Réponse immunitaire et échappement par le HEV	54
	La réponse immunitaire innée dirigée contre le HEV	54
	<ol> <li>Deroulement de la réponse immunitaire innée dirigée contrele HEV</li> <li>Les stratégies d'échannement de la rénonce immunitaire innée misse en place par la UEV</li> </ol>	54
	Les su allegies d'échappement de la réponse immunitaire innée mises en place par le nEV	
	1) La réponse immunitaire adaptative d'ingée contrele HEV	
	2) La réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire dirigée contrele HEV	59
II)	LE TRAFIC NUCLEOCYTOPLASMIQUE DES PROTEINES	60
a)	) Le trafic nucléocytoplasmique des protéines chez les eucaryotes	60
b)	) Trafic nucléocytoplasmique et infections virales	62
c)	L'inhibition du trafic nucléocytoplasmique : une approche antivirale	64
,	Les inhibiteurs d'import nucléaire comme molécules antivirales	64
	Les inhibiteurs d'export nucléaire comme molécules antivirales	65
III)	LES USINES VIRALES	66
a)	J Definition et caracteristiques des usines virales chez les virus à ARN simple brin de polarité	~~
pc	USIUVE	66
b)	biogenese des usines virales chez les virus à AKIN simple brin de polarite positive	66 
CJ	Facteurs viraux et centilaires impliques aans la biogenese des asines virales	99 הא
	Facteurs cellulaires	

IV)	LES COMPLEXES ADAPTEURS OU ADAPTINES DANS L'ADRESSAGE INTRACELLULAIRE DES PROTEINES	72
a)	Généralités chez les eucaryotes	72
b)	Organisation et structure des complexes adapteurs	73
c)	Biologie des complexes adapteurs	75
	L'adaptine AP-1	75 70
	L'adaptine AP-2	70 76
	L'adaptine AP-4	77
	L'adaptine AP-5	78
d)	Complexes adapteurs et infections virales	80
	Complexes adapteurs et Coronavirus humains (hCoV)	80
	Complexes adapteurs et Virus de l'Hépatite C (HCV)	81
V)	Lomplexes adapteurs et virus de la Dengue (DENV)	۲۵ ۲0
ر ب ( م	Les PROPROTEINES CONVERTASES ET LES PROTEASES INTRAMEMORANAIRES	20 82
h)	Les proprotéines convertases (PCs)	02 83
6)	Généralités chez les eucarvotes	83
	1) Découverte des PCs	83
	2) Activité enzymatique des PCs	83
	3) Mécanismes d'activation des PCs	84
	<ul> <li>4) Profil d'expression tissulaire et localisation subcellulaire des PCs</li> <li>5) Spécificités et fonctions des PCs.</li> </ul>	85 مد
	Pronrotéines convertases et infections virales	80 89
	Inhibiteurs de proprotéines convertases et potentiel antiviral	91
	1) Agents protéiques	91
	2) Agents peptidiques	92
	3) Petites molécules inhibitrices	93
C)	Les proteases intramembranaires	94
	1) Découverte des i-CLIPs	95 95
	<ol> <li>Activité enzymatique</li> </ol>	93 97
	3) Mécanisme d'activation	98
	4) Profil d'expression tissulaire et localisation subcellulaire	99
	5) Spécificités et fonctions	100
	I-CLIPS et infections virales	104 107
ONTE		107
LONIE.	XIE EI OBJECTIFS DE RECHERCHE	. 112
Objec du Hi	TTIF #1 – Annexe 1 : Caracterisation du trafic nucleocytoplasmique de la proteine de capside OI EV	RF2 112
Obje	TTIF #2 – ANNEXE 2 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES USINES VIRALES DU HEV	113
Овјес	TTIF #3 – ANNEXE 3 : ETUDE DU MECANISME D'ADRESSAGE DE LA PROTEINE DE CAPSIDE ORF2I AUX USINES	
VIRAL	ES DU HEV	114
OBJEC PROT	TIF #4 : CARACTERISATION DES MECANISMES DE MATURATION PROTEOLYTIQUE DES DIFFERENTES FORMES D EINE DE CAPSIDE ORF2 DU HEV	e la 116
<b>IATER</b>	IEL ET METHODES	. 118
ESUL	۲ATS	. 128
Objec	CTIF #1 – Annexe 1 : Caracterisation du trafic nucleocytoplasmique de la proteine de capside OI	RF2
du Hi	EV	128
a)	Cinétique de translocation nucléaire de la protéine de capside ORF2	128
b)	Laracterisation du signal d'import nucléaire de la protéine ORF2	130
C)	Role de la translocation nucléaire de la protéine de capside ORF2 sur l'expression génique de âte infacté	105
ľh d)	ote injecte Caractérisation du(des) signal(-aux) d'export nucléaire de la protéine de capside ORF2 du HE	135 EV
ORIE	137 τις #2 – Δηνέχε 2 · Ιδεντιείζατιών ετ σαραστερισατίων δες μοινές γιραί σουμ ΗΕΝ	14.2
UDJEU a)	$R_{11} = r_{11} = r_{12} = r$	142
uj h)	Ma contribution dans le projet	142. 142
OBIE	TIF #3 - ANNEXE 3 : ÉTUDE DU MECANISME D'ADRESSAGE DE LA PROTEINE DE CAPSIDE ORF21 AUX USINES	173
VIRAL	es du HEV	144

a)	Rationnel	144
b)	Résultats obtenus	145
(	Colocalisation et interaction de la protéine de capside ORF2i avec l'adaptine AP-1	.145
]	Inhibition pharmacologique d'AP-1 : Impact sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i et sur	
]	l'infectiosité virale	.148
	Silencing de la sous-unité $\gamma$ 1 du complexe adapteur AP-1 (AP-1 $\gamma$ 1) par ARN interférence : Impact sur la	4 - 4
1	localisation subcellulaire de la proteine ORF21 et sur l'infectiosite virale	.154
	Analyse en hepatocytes primaires humains de l'importance du trafic AP-1-dependant dans la secretion d	e 150
	particules virales infectieuses	.159
OBJECT	TIF #4 : CARACTERISATION DES MECANISMES DE MATURATION PROTEOLYTIQUE DES DIFFERENTES FORMES DE	LA 1(2)
PROTE	INE DE CAPSIDE URFZ DU HEV	162
Car	racterisation des mecanismes de maturation proteolytique des jormes ORF2y/c de la proteine de	100
сар	DSIGE UKFZ QU HEV	162
i	a) Kationnel	162
1	D) Resultats obtenus Mécanisme de translocation rétigulaire des protéines ΩΡΕ2α/cdu HEV	163
	Mecanisme de maturation protéolutique des protéines ORF2g/cdu HEV	164
Car	ractárisation des mácanismes de maturation protéolytique des proteines OKr2g/cuu IIEV	104
Cur	acterisation des mecanismes de mataration proteolytique de la jorme OKr21 de la proteine de	160
cup	o) Detionnol	169
1	dj KdUOIIIIei	170
	Preuve expérimentale de l'implication des i-CLIPs dans la maturation protéolytique de la protéine de	.170
	canside ORF2i du HEV	170
	Identification de l'iCLIP impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2 d	łu
	HEV	.173
	Le composé N, une molécule à activité antivirale : validation en cellules primaires humaines	178
	Mode d'action du composé N : validation de la cible virale	181
	Mode d'action du composé N : validation de la cible cellulaire	.183
DISCUSS	SION ET PERSPECTIVES	185
D A		
I) (	UBJECTIF # 1 – ANNEXE 1 : CARACTERISATION DU TRAFIC NUCLEOCYTOPLASMIQUE DE LA PROTEINE DE CAPSIC	DE 105
ORF2	DU HEV	185
II) (	OBJECTIF #2 – ANNEXE 2 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES USINES VIRALES DU HEV	188
III) (	OBJECTIF #3 – ANNEXE 3 : ETUDE DU MECANISME D'ADRESSAGE DE LA PROTEINE DE CAPSIDE ORF2I AUX USI	NES
VIRALE	S DU HEV	191
IV)	OBJECTIF #4 - CARACTERISATION DES MECANISMES DE MATURATION PROTEOLYTIQUE DES DIFFERENTES FORM	MES
DE LA F	PROTEINE DE CAPSIDE ORF2 DU HEV	194
Car	ractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c de la protéine de	
сар	oside ORF2 du HEV	194
Car	ractérisation des mécanismes de maturation protéolytique de la forme ORF2i du HEV	196
CONCLU	SION GENERALE	201
ANNFXF	۲ <b>۵</b>	203
ANNLAL		203
Annex	KE $1$ – "An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecy (	CLE
AND IN	TERACTIONS WITH THE HOST CELL"	203
ANNEX	XE 2 – "THE ENDOCYTIC RECYCLING COMPARTMENT SERVES AS A VIRAL FACTORY FOR HEPATITIS E VIRUS"	230
ANNEX	KE 3 – "THE $ m AP-1$ adaptor complex drives intracellular trafficking and assembly of the infectio	US
ORF2	CAPSID PROTEIN OF HEPATITIS E VIRUS"	256
BIBLIOG	RAPHIE	300
2120100		500

# Introduction générale

## I) Le virus de l'Hépatite E (HEV)

Le virus de l'hépatite E (HEV) est l'agent responsable de l'hépatite E, une maladie inflammatoire du foie. L'infection par le HEV est la première cause d'hépatite aiguë à travers le monde. Chaque année, 100 millions de personnes seraient infectées par le virus causant près de 14 millions d'hépatites aiguës. Cette infection causerait également 100 000 décès chaque année, dont 5 200 enfants mort-nés (WHO, 2022). De façon plus globale, l'infection par le HEV conduit au décès dans 1% des cas dans la population générale et ce taux de mortalité s'élève à 30% des cas chez les femmes enceintes. L'infection par le HEV est majoritairement spontanément résolutive mais elle peut dans certains cas, conduire à des hépatites aiguës voire fulminantes et des hépatites chroniques. L'infection par le HEV est également associée à des cas de cirrhose hépatique en cas d'infection chronique, mais également à de rares cas d'hépatocarcinomes. De plus, des atteintes extra-hépatiques d'ordre neurologique, rénal ou articulaire ont été documentées et mises en relation avec l'infection par le HEV.

Pendant de nombreuses années, l'hépatite E a été considérée comme une infection ne touchant que les pays en voie de développement. Or, le nombre de personnes infectées par le HEV dans les pays industrialisés ne cesse de croître depuis plus d'une décennie, montrant le caractère émergent de cette infection et le problème majeur de santé publique que représente le HEV. Jusqu'à maintenant, 8 génotypes (gt) de HEV issus d'un même sérotype ont été décrits, mais seuls quatre d'entre eux peuvent infecter l'humain (HEV-1, -2, -3 et -4). Les HEV-1 et -2 touchent les pays en voie de développement comme l'Asie du Sud ou l'Afrique Sub-Saharienne et se transmettent par consommation d'eau de boisson ou d'aliments souillés par des matières fécales. Les HEV-3 et -4 sont présents dans les pays industrialisés et se transmettent dans la majorité des cas par la consommation de viande de porc peu ou mal cuite mais également par le biais de transfusion sanguine ou de transplantation d'organes. Dans les pays en voie de développement, les personnes masculines âgées de 15 à 30 ans sont les plus touchées et les femmes enceintes représentent la population la plus vulnérable. Dans les pays industrialisés, les personnes âgées de plus de 55 ans sont les susceptibles de développer l'hépatite E.

#### a) Historique du HEV

Dès le milieu du 20<sup>e</sup> siècle, des cas d'hépatites dites « non-A non-B » (HNANB) transmises par voie entérale ont provoqué un important nombre de décès, notamment à Delhi en Inde où la première épidémie a été décrite en 1955 suite à une contamination des eaux de la ville par des matières fécales (Khuroo et al., 2011). Plusieurs dizaines de milliers de personnes ont été touchées lors de cette épidémie. Suite à ce premier épisode épidémique, d'autres ont été enregistrées par la suite entre 1955 et 1990, que ce soit en Asie du Sud-Est (Indonésie), en Asie centrale, en Afrique (Algérie, Cote d'Ivoire, Tchad, Soudan et Somalie) ou en Amérique du Sud (Mexique notamment). A nouveau, la contamination de l'eau de boisson était la source d'infection lors de ces épidémies. C'est au début des années 1980 que l'étiologie virale des HNANB a été confirmée par le Dr Balayan à l'aide d'observations en microscopie électronique d'échantillons de selles humaines (Figure 1). L'étude a permis de mettre en évidence des particules virales d'un diamètre de 27nm dans les selles d'un patient ayant volontairement ingéré un filtrat de selles infectées par le HEV. Ce patient n'est autre que le Dr Balayan lui-même ! En 1990, le nom de virus de l'hépatite E (HEV avec E pour entérique/épidémique) a été donné à cette souche virale qui fut également clonée pour la première fois cette même année. Le génome du HEV fut séquencé pour la première fois en 1991.



<u>Figure 1 :</u> Observation originale de particules virales du HEV issues d'un échantillon de selle humain en microscopie électronique. Tiré de Balayan et al., 1983.

Dans les pays industrialisés, les premiers cas d'hépatite E confirmés ont été identifiés aux Etats-Unis en 1997. Dans ce contexte, 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, montrant une possible transmission zoonotique. Par la suite, des cas d'hépatite E ont été diagnostiqués en 2003 et 2010 au Japon et en France, respectivement. Systématiquement, les patients avaient consommé de la viande de porc ou de gibier, peu ou mal cuite, mettant en évidence pour la première fois le caractère majoritairement zoonotique de l'infection par le HEV dans les pays industrialisés.

# b) Aspects épidémiologiques de l'infection par le HEV

Les quatre génotypes de HEV infectant l'Homme sont les HEV-1, -2, -3 et -4 et présentent des profils épidémiologiques caractéristiques. Les HEV-1 et -2 sont restreints à l'Homme alors que les HEV-3 et -4 sont zoonotiques (Nimgaonkar et al., 2018). Néanmoins, certains génotypes animaux ont montré leur capacité à franchir la barrière d'espèce. Par exemple, le HEV-7 touchant les camélidés a été identifié chez un patient infecté chronique ayant pour habitude de consommer de la viande ou du lait de dromadaire (Lee et al., 2016).

# Répartition géographique des différents génotypes de HEV

Les HEV-1 et -2 sont principalement retrouvés en Afrique, en Asie et au Mexique **(Figure 2)**. Quant au HEV-3, il présente une distribution géographique beaucoup plus étendue puisqu'il est retrouvé sur tous les continents **(Figure 2)**. Le HEV-4 est retrouvé majoritairement en Asie **(Figure. 2)**. Il est important de préciser que le HEV-3 est le génotype le plus répandu à travers le monde.



**Figure 2 : Répartition géographique des génotypes de HEV touchant l'Homme.** Tiré de Kamar et al., 2017.

Parmi les cas sporadiques de transmission de HEV animaux à l'Homme, le HEV-3ra (« ra » pour rabbit ou lapin en français) a été identifié chez des patients en France et en Suisse (Izopet et al., 2012 ; Abravanel et al. 2017 ; Sahli et al., 2019). Le HEV-7, présent chez les camélidés a été identifié pour la première fois aux Émirats Arabes Unis chez une patiente somalienne de 50 ans présentant une hépatite E chronique (Lee et al., 2016). Ce génotype a également été à l'origine d'autres cas au Pakistan ou en Afrique sub-saharienne (Rasche et al., 2016).

## Modes de transmission du HEV

Les différents génotypes de HEV présentent des modes de contamination bien distincts. L'eau potable constitue la source majoritaire de contamination et de transmission interhumaine des HEV-1 et -2 **(Figure 3)**. En effet, ces génotypes sont transmis par voie féco-orale par le biais d'eau et d'aliments contaminés par des fèces de personnes infectées. En ce sens, ces génotypes sont retrouvés dans les pays en développement où les conditions d'hygiène et les infrastructures de traitement de l'eau sont de mauvaise qualité. Ils sont à l'origines d'épidémies en Afrique ou en Asie et touchent particulièrement les femmes enceintes dont le taux de mortalité s'élevé à 30% (Nimgaonkar et al., 2018).



Les HEV-3 et -4, qui sont zoonotiques, concernent quant à eux les pays industrialisés. En effet, des cas de transmission depuis des réservoirs animaux (Porcs,

sangliers, cerfs, lapins, ...) vers l'Homme ont été mis en évidence. Ces génotypes sont transmis par consommation de la viande de ces animaux, peu ou mal cuite (Treagus et al., 2021). La viande de porc et de gibier est très souvent impliquée dans la transmission des HEV-3 et -4. Des travaux ont montré qu'en France, 30% à 60% des élevages porcins présentent au moins un animal positif au HEV (Rose et al., 2011 ; Feurer et al., 2018). En Allemagne, ce taux s'élève à 50%, en Italie à 45% et aux Etats-Unis à 22% (Baechlein et al., 2010 ; Mughini-Gras et al., 2017 ; Owolodun et al., 2013). Par là même, 30% des figatelles ou saucisses de foie de porcs sont positives au HEV en France (Doceul et al., 2016). En Allemagne, ce sont 20% des saucisses de foie de porcs qui sont positives au HEV (Szabo et al., 2015).

A ce jour, l'ensemble des voies de transmission alimentaire possibles des HEV-3 et -4 ne sont vraisemblablement pas connues. En réalité, l'impact des eaux usées dans ce processus est pour l'heure peu documenté mais il est possible que celles-ci jouent un rôle, et notamment dans la contamination de l'eau de boissons ou des coquillages à activité filtrante (moules, huitres, coquilles Saint-Jacques) **(Figure 4).** En ce sens l'utilisation des eaux usées pour l'irrigation des cultures destinées à la consommation humaine ainsi que l'abreuvage du bétail pourrait être une source de contamination pour l'Homme **(Figure 4).** De manière intéressante, des cas localisés d'infection par le HEV-3 suite à la consommation d'eau de boisson ont été déclarés récemment dans le sud de la France (Lhomme et al., 2023). Également, l'élimination des reflux d'élevage ou d'irrigation dans le circuit d'eaux usées pourrait à nouveau favoriser la transmission des HEV-3 et -4 dans les pays industrialisés (Treagus et al., 2021). Des études environnementales et notamment vis à vis des circuits d'eau pourrait permettre d'identifier de façon formelle de nouvelles voies de transmission du HEV.

Le HEV est également transmis par voie sanguine au cours de dons de sang dans les pays industrialisés. La mise en évidence de cette voie de transmission du HEV a été réalisée grâce au travail des banques de sang. En France, la séroprévalence du HEV chez les donneurs de sang s'élève à 22,4% à l'échelle nationale et peut atteindre 52,2% dans le sud du pays (Ankavay et al., 2018). A titre comparatif, aux USA, la séroprévalence du HEV est estimée seulement à 0,002% chez les donneurs de sang (Nimgaonkar et al., 2018). Le HEV peut également être transmis par le biais de transplantations ou de greffes d'organes (Protzer et al., 2015). Une analyse à grande échelle a permis d'établir une prévalence du HEV de 20% chez les patients transplantés (Hansrivijit et al., 2021). Par ailleurs, les patients transplantés positifs au HEV sont susceptibles de développer une hépatite E chronique, notamment s'ils sont infectés par du génotype 3 (Behrendt et al., 2014).



**Figure 4 : Voies de transmission confirmées et théoriques du HEV.** Les voies de transmission théoriques incluent les infections contractées à partir de la consommation de fruits de mer, de veau et de bœuf. Les cultures et l'eau de boisson pourraient également être des sources d'infection. Sauf depuis l'eau de boisson, aucune infection à partir de ces sources potentielles n'ont été documentées à ce jour. Tiré de Treagus et al., 2021.

La transmission materno-fœtale (ou verticale) du HEV par voie transplacentaire est bien décrite dans le contexte d'une infection par le HEV-1 et conduit à une mortalité infantile importante dans les pays en développement. Également, l'infection par le HEV peut causer le décès dans 26% des cas ou provoquer des complications comme des naissances prématurées (50% des cas) ou des hémorragies post-partum (16% à 30% des cas). Dans les régions endémiques, il est estimé que 75% des hépatites fulminantes de la femme enceinte sont causées par l'infection par le HEV (Chilaka & Konje, 2021). Un cas de transmission du HEV d'une mère à son enfant par le biais du lait maternel a été mis en évidence au Brésil chez une femme atteinte d'une hépatite E aigüe, qui allaitait son enfant de 18 mois. Ceci indique que le lait maternel pourrait être une voie de transmission additionnelle du HEV (Rivero-Juarez et al., 2016).

## c) Aspects cliniques de l'infection par le HEV

Bien que le HEV présente un tropisme hépatique, des manifestations extrahépatiques notamment neurologiques, pancréatiques et rénales ont été décrites. Le HEV infecte ses hôtes par voie gastro-intestinale majoritairement. Chez l'Homme, la période d'incubation varie entre 2 et 10 semaines. Pendant cette période d'incubation, le virus traverse la paroi intestinale pour atteindre le foie par le biais de la veine porte hépatique (Aggarwal & Goel, 2018). Des travaux sur des primates non humains ont montré que la réplication hépatocytaire du HEV débuterait environ 7 jours après inoculation parentérale d'une suspension virale (Ticehurst et al., 1992).

La réplication hépatocytaire du HEV induit des lésions qui sont à l'origine des manifestations cliniques observées. Da façon additionnelle, la réponse immunitaire induite par l'infection déterminerait l'évolution des signes cliniques : infection spontanément résolutive, hépatite aigüe, fulminante ou chronique (Debing et al., 2016).

## Hépatite aigüe

Dans la majorité des cas, l'hépatite E aigüe est asymptomatique. Néanmoins, certains patients peuvent développer des symptômes similaires à ceux retrouvés dans le contexte d'autres hépatites virales : anorexie, fièvre, nausées, fatigue, myalgie, jaunisse notamment (Donnelly et al., 2017a). L'hépatite E aigüe se développe en moyenne chez 20% des patients infectés par le HEV-1 et -2 alors qu'elle reste plutôt asymptomatique chez les patients infectés par les HEV-3 et -4 (Rein et al., 2012 ; Haffar et al., 2018). Lors d'une hépatite E aigüe, les examens biologiques réalisés en laboratoire montrent des taux de transaminases sériques (ALT et AST) et bilirubine élevés (Aggarwal & Goel, 2018). Dans certains cas, l'évolution des hépatites E aigües peut être très sévère et conduire à des formes fulminantes.

#### Hépatite fulminante

Dans la population générale, les patients souffrant d'une hépatite aigüe sont amenés à développer une hépatite E fulminante dans environ 1% des cas. L'hépatite E fulminante débute très souvent comme une hépatite aigüe classique puis l'état de santé des patients se dégrade rapidement. En effet, les patients développent une insuffisance hépatique sévère due à une nécrose massive du parenchyme hépatique, empêchant le foie d'assurer ses fonctions. Des troubles de la coagulation sanguine, des signes neurologiques (œdèmes cérébraux, augmentation de la pression intracrânienne et coma) ou rénaux (insuffisance rénale) peuvent être associés à l'hépatite E fulminante (Smith & Simmonds, 2015). Sur le plan biologique, des niveaux de transaminases hépatiques et de prothrombines élevés sont caractéristiques de la fulminance (Jeblaoui et al., 2013). L'hépatite E fulminante constitue une urgence médicale nécessitant une greffe, associée à un taux de mortalité d'environ 50% (Bhatia et al., 2008). L'origine de l'évolution vers l'hépatite E fulminante est pour l'heure peu documentée et sujette à controverse. En effet, il a longtemps été considéré que la survenue des hépatites E fulminantes serait liée à l'infection par le HEV-1 (Smith & Simmonds, 2015). En ce sens, des mutations favorisant la réplication virale ont été retrouvées dans des souches de HEV-1 ayant provoqué des hépatites E fulminantes chez les patients (Mishra et al., 2013 ; Wang et al., 2022). Néanmoins, des données dans la littérature montrent que les HEV-2, -3 et -4 sont également capables d'induire des hépatites fulminantes (Maila et al., 2004 ; Shimata et al., 2018 ; Miyashita et al., 2012). D'autres études suggèrent que la réponse immunitaire induite par le HEV serait associée à la fulminance puisque des taux comparativement plus élevés d'IgG anti-HEV, d'IFN- $\gamma$ , de TNF $\alpha$ , d'IL-2 ou d'IL-10 ont été détectés chez des patients souffrant d'hépatite E fulminante par rapport à des patients ayant guérit spontanément (Srivastava et al., 2011). Egalement, des facteurs spécifiques de l'hôte tels que la grossesse ou des défaillances hépatiques préexistantes pourraient être la cause de ces hépatites fulminantes (Smith & Simmonds, 2015).

Chez la femme enceinte, l'infection par le HEV est à l'origine de formes sévères d'hépatite fulminante, associées à une décompensation hépatique, à une rupture de la membrane placentaire, des avortements spontanés, la naissance d'enfants mort-nés et un taux de mortalité proche de 30% et pouvant atteindre 56% lorsqu'une évolution vers la fulminance est mise en évidence au cours du 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse (Pérez-Gracia et al., 2017 ; Wu et al., 2020). Des études chez le macaque et chez l'Homme ont montré un taux de transmission du HEV de la mère au nouveau-né approchant les 100% (Yu et al., 2020 ; Perez-Gracia et al., 2017). En termes de symptomatologie, l'hépatite E développée par la femme enceinte ressemble à celle de la population générale avec une hépatite aigüe qui va ensuite progresser très rapidement vers la fulminance qui se manifeste par une coagulation intravasculaire, une encéphalopathie et un œdème cérébral dans la majorité des cas.

La sévérité de l'hépatite E chez la femme enceinte peut être expliquée par la modulation de l'immunité maternelle qui apparaît au cours de la grossesse. En effet, le système immunitaire maternel doit à la fois être réactif pour protéger la mère et le fœtus des infections mais également tolérer la présence d'antigènes paternels afin de maintenir l'intégrité fœtale. Au cours de la grossesse, il semblerait que l'immunité innée soit hautement réactive, là où l'immunité adaptative est diminuée : le nombre et l'activité des

lymphocytes natural killer (NK) et T diminue alors que le nombre de monocytes, granulocytes et cellules dendritiques est augmenté (Kraus et al., 2012 ; Kourtis et al., 2014 ; Terrault et al., 2021). De la même façon, un certain nombre d'hormones voient leur taux augmenter considérablement comme la progestérone, l'œstrogène ou l'hormone chorionique gonadotrope (HCG) (Navaneethan et al., 2008; Robinson & Klein, 2012). Des études ont d'ailleurs montré que l'augmentation de ces hormones favorisait la réplication virale (Bi et al., 2015; Yang et al., 2018; Sooryanarain et al., 2021). D'autres facteurs, tels que l'état nutritionnel de la femme enceinte (carences notamment) ou les facteurs viraux (hétérogénéité dans la population virale, protéines virales) peuvent influencer la pathologie provoquée par l'infection par le HEV (Wu et al., 2020). Sur le plan clinique, l'infection par les HEV-1 et -2 semble être à l'origine de la sévérité de la pathologie associée et il a été montré que, comparativement au HEV-3, le HEV-1 possède une plus grande capacité réplicative et à causer des lésions dans les cellules placentaires ou endométriales notamment (Wu et al., 2020 ; Gouilly et al., 2018). Néanmoins, il a été montré plus récemment que le HEV-4 était également capable de se répliquer dans le placenta, d'y induire des dommages tissulaires importants et d'être transmis au fœtus (Qian et al., 2023).

### Hépatite chronique

L'Hépatite E aiguë peut persister et devenir chronique chez les personnes immunodéprimées, positives au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), sous traitement immunomodulateur suite à une transplantation ou sous chimiothérapie (Wu et al., 2020). Elle est définie comme une persistance de la réplication virale et des signes d'inflammation hépatique associés (taux élevé de transaminases sériques) pendant plus de 3 mois (Kamar et al., 2017). Les HEV-3 et -4 sont très souvent associés à la chronicité alors que les HEV-1 et -2 ne semblent pas être associés au développement d'une hépatite E chronique (Donnelly et al., 2017 ; Kamar et Pischke, 2019). L'hépatite E chronique peut rapidement évoluer en fibrose ou en cirrhose hépatique, provoquant une insuffisance hépatique sévère aboutissant à la mort du patient infecté. Plus rarement, l'hépatite E chronique conduit à l'apparition d'hépatocarcinomes (Lhomme et al., 2020 ; Colson et Decoster., 2019).

Les patients sujets à développer une hépatite E chronique sont la majorité du temps sous traitement immunomodulateur (Ex : Tacrolimus) et ce sont précisément ces traitements

qui rendent les patients vulnérables aux agents infectieux comme le HEV. Ces traitements visent à réduire la réponse immunitaire à médiation cellulaire et notamment la numération de lymphocytes T CD4. Le fait que les patients traités avec cette classe de molécules sont à risque de développer une hépatite E chronique montre l'importance de l'immunité à médiation cellulaire dans la clairance du HEV (Khuroo et al., 2016).

## Manifestations extra-hépatiques

Le HEV présente un tropisme majoritairement hépatique mais des manifestations extra-hépatiques sont également décrites. Elles peuvent être neurologiques, rénales ou pancréatiques, notamment.

## • Les manifestations neurologiques :

Les manifestations neurologiques constituent la manifestation extra-hépatique associée à l'infection par le HEV la plus décrite dans la littérature. Les syndromes de Parsonage-Turner (SPT ou névralgie amyotrophiante de l'épaule ; 56% des manifestations neurologiques) et de Guillain-Barré (SGB ; 20% des manifestations neurologiques) sont les principales manifestations neurologiques associées à l'infection par le HEV (McLean et al., 2017 ; Rawla et al., 2020 ; Lhomme et al., 2021). D'autres manifestations neurologiques sont associées à l'hépatite E, mais de façon beaucoup moins fréquente, comme la myathénie gravis ou la polyneuromyopathie (Rawla et al., 2020). Le SPT se caractérise par une inflammation du plexus brachial qui conduit à l'apparition de violentes douleurs au niveau de l'épaule, pouvant être suivie d'une paralysie et d'une amyotrophie. Une étude européenne a mis en évidence qu'un patient sur dix atteint de SPT souffrait d'hépatite E aigüe (Eijk et al., 2017). Quant au SBG, il se caractérise par une atteinte des nerfs périphériques aboutissant à une faiblesse musculaire et à un déficit sensoriel progressif. Dans les deux cas, la pathogenèse au cours d'une infection par le HEV n'est pas connue. Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer l'association SPT/SGB et HEV : (i) Au cours d'une infection par le HEV, des quasi-espèces virales capables d'infecter le tissu nerveux seraient présentes. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'ARN viral détecté dans le liquide céphalo-rachidien des patients diffère de celui retrouvé dans le sérum de ces mêmes patients, à un temps donné (McLean et al, 2017 ; Dalton et al., 2016 ; Abravanel et al., 2021). (ii) Également, le virus pourrait acquérir des séquences d'ARN de l'hôte par recombinaison, le rendant capable d'infecter

de multiples types cellulaires y compris ceux du système nerveux (Dalton et al., 2016). (iii) Enfin, certaines souches de HEV pourraient produire des antigènes capables d'induire des polyneuropathies inflammatoires auto-immunes par le biais de mimétisme moléculaire (McLean et al., 2017 ; Dalton et al., 2016).

## • Les manifestations rénales et pancréatiques :

Des troubles rénaux ont également été associés à l'hépatite E aigüe et chronique, mais de façon beaucoup moins fréquente que les manifestations neurologiques. Ils sont caractérisés par une plus faible filtration glomérulaire, une glomérulonéphrite et une cryoglobulinémie aboutissant à une altération de la fonction rénale (Kamar et Pischke, 2019 ; Fousekis et al., 2020 ; El-Mokhtar et al., 2023). A nouveau, la pathogenèse de ces affections rénales associées à l'infection par le HEV est peu connue. Il semblerait que des dépôts de complexes immuns composés d'antigènes viraux et d'anticorps dirigés contre ceux-ci, de façon semblable à ce qui est retrouvé dans le cas de l'hépatite C, soient à l'origine de ces affections (Lhomme et al., 2020 ; Cheema et al., 2023). En effet, pour l'heure, il n'existe aucune preuve que le HEV soit directement néphrotoxique ni qu'il puisse se répliquer dans les cellules rénales bien que de l'ARN viral et des antigènes viraux aient été retrouvés dans les tissus rénaux d'animaux expérimentalement infectés par le HEV (singes et lapins notamment ; Geng et al., 2016 ; Han et al., 2014) ou dans l'urine des patients ou de souris/lapins infectés par le HEV (Marion et al., 2019 ; Ying et al., 2022). Ces affections rénales sont majoritairement associées à une infection par le HEV-3 (Lhomme et al., 2020).

Des troubles pancréatiques ont également été associés à l'infection par le HEV de façon rare. En effet, la prévalence de ces affections chez les patients infectés par le HEV est inférieure à 2% (Lhomme et al., 2020). L'infection par le HEV-1, notamment, peut conduire à une pancréatique aigüe nécrosante, comme cela a pu être observé chez des cochons nains infectés expérimentalement ou chez des patients HEV-positifs, mettant en jeu le pronostic vital de l'individu concerné (Jung et al., 2020 ; Lhomme et al., 2020). Plus récemment, une étude a mis en évidence un lien entre le HEV-4 et le développement d'une pancréatite aiguë dans une cohorte de patients (Wu et al., 2023). La pathogenèse associée à ces affections pancréatiques lors de l'infection par le HEV reste pour l'heure inconnue.

#### d) Diagnostic de l'hépatite E

Le diagnostic en laboratoire de l'hépatite E peut se faire de façon indirecte ou directe. Le choix de la technique utilisée repose sur la cinétique d'excrétion du virus et le moment de la prise en charge du patient ainsi que l'accessibilité des outils diagnostiques (Gupta et al., 2020).

### Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de l'hépatite E repose sur la détection des anticorps dirigés contre le HEV présents dans le sérum des patients infectés. Plusieurs tests sont disponibles sur le marché pour détecter les anticorps IgG et IgM anti-HEV mais aucun n'est pour l'heure validé par un organisme agrée (Aslan & Balaban, 2020). Chez l'Homme, la période d'incubation du HEV est comprise entre deux et six semaines. Au bout de quatre semaines environ des IgM anti-HEV sont détectables dans le sérum des patients infectés pendant une courte période (3-4 mois) et sont des marqueurs d'une infection aigüe (Kamar et al., 2017). Les tests (majoritairement des tests ELISA) permettant de doser les IgM anti-HEV présentent une sensibilité supérieure à 97% chez les patients immunocompétents et une sensibilité comprise entre 80 et 85% chez les patients immunodéprimés. En revanche, leur spécificité est supérieure à 99,5% (Legrand-Abravanel et al., 2009 ; Abravanel et al., 2013). Les IgG anti-HEV sont détectables au bout de sept ou huit semaines d'infection et peuvent persister plusieurs années (Kamar et al., 2017 ; Aslan & Balaban, 2020). Seule la détection d'IgG anti-HEV est un marqueur d'infection antérieure. Les tests (majoritairement des tests ELISA) permettant de doser les IgG anti-HEV présentent un seuil de détection compris entre 0,25 et 2,5 unités de l'OMS par mL. Le dosage de ces IgG est un outil intéressant également pour évaluer le risque de ré-infection après une infection naturelle ou une vaccination. En ce sens, une étude a montré que des patients immunodéprimés présentant une faible concentration d'IgG anti-HEV (<7 unités de l'OMS par mL) peuvent subir une ré-infection avec un risque considérable d'évoluer vers la chronicité (Abravanel et al., 2013 ; Kamar et al., 2017).

Néanmoins, une étude a montré qu'un test diagnostique basé sur la recherche d'IgM anti-HEV donnait des faux positifs à cause d'une réactivité croisée vis à vis des anticorps anti-EBV et anti-CMV (Hyams et al., 2014). Les tests diagnostiques directs tels que la détection du génome viral ou d'une des protéines virales demeurent les tests les plus fiables et les plus utilisés à ce jour dans le monde.

## **Diagnostic direct**

Parmi les méthodes de diagnostic direct de l'infection par le HEV, la détection génome viral par PCR en temps réel reste l'approche la plus utilisée dans le monde.

La détection et la quantification de l'ARN viral dans le sang, les selles et d'autres fluides corporels représentent la meilleure méthode diagnostique de l'infection par le HEV. L'ARN viral est détectable dans le sang des patients infectés dix à quinze jours après infection, soit bien plus tôt que les IgG/IgM (Aslan & Balaban, 2020). Dans cette approche, des oligonucléotides à ADN permettant de détecter l'ARN du HEV sont utilisés : ceux-ci ciblent une région conservée chez les différents génotypes de HEV, notamment une région chevauchante de l'ORF2/ORF3 (Jothikumar et al., 2016 ; Kamar et al., 2017). Ces tests ont été optimisés afin d'être automatisés et applicables à haut débit.

La détection de la protéine de capside ORF2 du HEV est une autre méthode de diagnostic de l'infection par le HEV. Le test le plus utilisé en clinique est le test ELISA-Wantaï (Wantaï HEV-antigen ELISA<sup>Plus</sup>). Ce test présenterait une spécificité de 100% et une sensibilité équivalente vis à vis des patients immunocompétents ou immunodéprimés (88% et 94%, respectivement) (Trémeaux et al., 2016). Néanmoins, les résultats obtenus par cette méthode doivent être interprétés avec prudence car des études ont montré que ce test donnait des résultats positifs là où la recherche du génome viral était négative par RT-qPCR (Lapa et al., 2016 ; Behrendt et al., 2016). Des travaux menés au sein du laboratoire ont montré que le HEV sécrète des formes non associées au génome viral de sa protéine de capside ORF2 et que ces formes massivement présentes dans le sérum des patients infectés sont préférentiellement reconnues par le test ELISA-Wantaï (Montpellier et al., 2018). De ce fait, la détection de protéines ORF2 en l'absence d'ARN viral s'expliquerait par le fait que ces formes de protéines ORF2 non associées au génome viral persistent dans le sérum des patients, même après clairance des particules virales, faussant les tests antigéniques réalisés. Ce test antigénique mériterait d'être optimisé en utilisant par exemple des anticorps reconnaissant la protéine ORF2 associée au génome viral mais représente une alternative aux méthodes moléculaires dans les régions du globe où les laboratoires ne disposent pas des infrastructures permettant de réaliser ce type de tests.

#### e) Traitements actuels pour lutter contre le HEV et molécules à activité antivirale

Pour l'heure, aucun traitement spécifique n'est disponible pour lutter contre le HEV. Cependant, des molécules antivirales à large spectre ont montré une activité antivirale contre le HEV (Anang et al., 2018). Bien que l'infection par le HEV soit spontanément résolutive en quatre à six semaines dans la majorité des cas, les hépatites E aigües sévères et chroniques nécessitent une prise en charge thérapeutique.

#### Traitements actuels pour lutter contre le HEV

Les hépatites E aigües sévères ou chroniques peuvent être guéries en réduisant les doses d'immunosuppresseurs chez les patients immunodéprimés, conduisant à une clairance virale dans 30% des cas (Horvatits et al., 2019). En cas d'inefficacité ou chez les patients immunocompétents, la ribavirine et l'Interféron pégylé-alpha (IFN-PEG- $\alpha$ ), en monothérapie ou en combinaison peuvent être utilisés (Nimgaonkar et al., 2018). La ribavirine, un analogue nucléosidique, agit en inhibant l'inosine monophosphate déshydrogénase, déplétant ainsi le taux de GTP cellulaire et qui inhibe la réplication du HEV (Debing et al., 2014). Egalement, il a été décrit que la ribavirine pouvait avoir un rôle immunomodulateur sur l'activité des cellules Natural Killer (NK), en favorisant la production d'Interferon-y, probablement en agissant sur la voie de signalisation associée au récepteur à l'Interleukine 12 (IL-12R), par le biais de TYK-2 (Kamar et al., 2014 ; Kupke et al., 2023). Le taux de guérison varie alors entre 80% et 100% (Aslan & Balaban, 2020). Néanmoins, des cas de résistance à la ribavirine ont été rapportés : c'est le cas des mutations Y1320H et G1634R dans la réplicase virale qui sont associées à un échec à la thérapie par ribavirine et qui conduisent à une meilleure réplication virale in vitro (Debing et al., 2014; Debing et al., 2016; Wang et al., 2023). Des mutations induites par la ribavirine ont également été retrouvées dans la protéine de capside ORF2 (P79S) (Meister et al., 2022). Cette mutation induirait la production de particules virales défectives (non infectieuses) capables d'agir comme des leurres immunologiques.

De plus, la ribavirine ne peut pas être utilisée chez la femme enceinte à cause de ses effets tératogènes (Aslan & Balaban, 2020). De plus, la ribavirine est à l'origine de plusieurs effets secondaires indésirables tels que des anémies hémolytiques, des insomnies ou des dyspnées (Wawrzynowicz-Syczewska, 2002 ; Horvatits et al., 2019). Également, le

traitement par la ribavine est un traitement long dont la durée varie entre 3 et 6 mois. L'ensemble de ces éléments peut conduire à une mauvaise observance ou à un arrêt du traitement. L'IFN-PEG- $\alpha$  peut représenter une alternative mais son efficacité n'a que trop peu été étudiée et est contre-indiqué chez les patients transplantés car cela pourrait favoriser le rejet de greffe (Aslan & Balaban, 2020).

Un autre analogue de nucléoside a également montré son intérêt pour le traitement de l'infection causée par le HEV : le sofosbuvir. Le sofosbuvir est une prodrogue : elle nécessite donc d'être métabolisée pour être active. Cet analogue nucléosidique de l'uridine initialement développé pour lutter contre l'infection par le virus de l'hépatite C a également montré sa capacité à inhiber la réplication du HEV-3 in vitro et à inhiber plus largement le HEV en clinique (Dao Thi et al., 2016 ; Drinane et al., 2019 ; Biliotti et al., 2018 ; Aslan & Balaban, 2020). Néanmoins, d'autres études cliniques ont mis en évidence des cas d'échecs thérapeutiques suite à l'utilisation du sofosbuvir, en monothérapie ou en combinaison à la ribavirine (Todesco et al., 2018, Aslan & Balaban, 2020 ; Lampejo, 2022). L'utilisation du sofosbuvir est aujourd'hui sujette à controverse et en ce sens, une étude clinique de phase 2 est en cours afin d'évaluer l'efficacité du sofosbuvir dans le traitement de l'hépatite E (Aslan & Balaban, 2020). En ce sens, les premières données émanant de cet essai clinique semble montrer une diminution précoce et significative de la charge virale des patients traités, sans toutefois atteindre une réponse complète, suggérant l'apparition de mutations de résistance : en effet, l'analyse de la population virale présente chez les patients par le biais du séquençage de la région ARN polymérase ARN-dépendante de l'ORF1 a montré au cours du temps l'apparition de mutations de résistance, telle que la mutation A1343V (Gömer et al., 2023).

Pour l'heure, il n'existe donc pas de stratégie thérapeutique permettant de lutter efficacement contre le HEV et il apparaît urgent de développer de nouvelles molécules antivirales, ciblant le HEV ou la cellule hôte, afin de lutter contre le HEV.

### Molécules à activité anti-HEV

Depuis plusieurs années, un effort international est réalisé concernant l'identification de molécules à activité anti-HEV afin de proposer des alternatives à l'utilisation des molécules à large spectre que sont la ribavirine, l'IFN-PEG- $\alpha$  ou le sofosbuvir, notamment pour traiter les formes chroniques d'hépatite E.

Pour l'heure il n'existe pas de molécules à activité anti-HEV en phase de développement clinique. Les seules molécules répertoriées ont démontré leur potentiel antiviral lors d'études précliniques, *in vitro* ou *in vivo*. Certaines de ces molécules sont listées en **Figure 5**. La majorité de ces molécules ciblent la cellule hôte et ont montré par le passé leur innocuité chez l'Homme dans le cadre d'autres pathologies.

Le NVP-HSP90 et l'Isocotoïne, qui ciblent la protéine chaperonne cellulaire HSP90, ont montré une efficacité contre les HEV-3 et HEV-4 dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Gerbille de Mongolie) (Zhang et al., 2023 ; Nimgaonkar et al., 2021). Le mécanisme d'action de ces molécules repose sur l'inhibition de l'interaction entre la réplicase virale ORF1 et HSP90. Cette inhibition conduit à la dégradation de la réplicase virale par le protéasome et donc inhibe la réplication virale. De plus, le NVP-HSP90 a montré son innocuité *in vivo* ainsi que sa capacité à réduire les dommages tissulaires induits par l'infection par le HEV. Ces molécules représentent donc une piste intéressante à développer dans les années à venir pour lutter contre le HEV (Zhang et al., 2023).

Le Ritonavir, le Brequinar et le Niclosamide sont des molécules qui ont montré leur potentiel antiviral, en ciblant des protéines cellulaires, vis à vis d'un certain nombre de familles de virus dans le cadre de repositionnements thérapeutiques. Le Ritonavir cible le cytochrome P4503A4 (CYP3A4) qui est impliqué dans le métabolisme des médicaments, le Brequinar cible la Dihydroorotate déshydrogénase (DODH) qui est impliquée dans la synthèse des pyrimidines et le Niclosamide qui cible la protéine STAT3. Ces trois molécules ont montré un effet anti-HEV *in vitro* (Ritonavir, Brequinar et Niclosamide) et dans un modèle d'organoïde de foie (Brequinar et Niclosamide) (Primadharsini et al., 2022 ; Primadharsini et al., 2022 ; Li et al., 2022 ; Li et al., 2022). Le Ritonavir cible l'entrée virale alors que le Brequinar et le Niclosamide ciblent la réplication virale. De plus, l'innocuité chez l'Homme de ces molécules a été démontrée par le passé et des analyses supplémentaires, notamment *in vivo*, méritent d'être menées afin de renforcer le potentiel anti-HEV de ces molécules.

Un autre inhibiteur de la protéine cellulaire STAT3, utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes, l'Homoharringtonine, a montré son potentiel anti-HEV *in vitro* et dans un modèle d'organoïde de foie, en ciblant la réplication virale (Li et al., 2022).

L'Acide 3-(4-Hydroxyphenyl)propionique (ou HPPA), ciblant la méthyl transférase virale, a montré son effet anti-HEV dans des modèles cellulaires (Hooda et al., 2022). Cette molécule a été identifiée par le biais d'un criblage *in silico* et de docking moléculaire. De façon intéressante, cette molécule est la seule répertoriée ici qui cible directement une protéine virale, on parle alors d'antiviral à action directe (ou direct-acting antiviral en anglais). Des analyses complémentaires, *in vivo* notamment, restent à être menées afin de renforcer l'intérêt pour cette molécule.

Une classe de molécules appelées Rocaglates ainsi qu'une molécule naturelle, le Silvestrol, ciblant le facteur d'initiation de la traduction eIF4A, ont démontré ces dix dernières années un effet antiviral contre un certain nombre de virus à ARN. L'équipe du Pr Eike Steinmann en Allemagne a testé la capacité de dérivés de la famille des Rocaglates et du Silvestrol à inhiber la réplication des HEV-1 et HEV-3 dans un système de réplicon et dans des hépatocytes primaires (Praditya et al., 2022 ; Todt et al., 2018). Trois dérivés de Rocaglates actifs à moins de 10nM ont été sélectionnés : CMLD012073, CMLD012118 et CMLD012612. De manière intéressante, ces molécules ont montré un effet synergique avec la Ribavirine ou l'Interferon pégylé. Néanmoins, l'analyse *in vivo* de l'effet de ces molécules reste nécessaire pour poursuivre leur développement.

La Deptropine et l'Azithromycine ont également montré leur potentiel anti-HEV vis-à-vis de la réplication virale dans des modèles *in vitro* de HEV-1 et HEV-3 (Qu et al., 2019 ; Miao et al., 2021). La Deptropine cible la voie de signalisation associée à la calcineurine et au récepteur H1, et l'Azithromycine inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B notamment. Les molécules étant toutes les deux largement utilisées en clinique contre les bronchites chroniques ou asthmatiques et pour lutter contre les infections bactériennes, respectivement, leur innocuité chez l'Homme est établie. Néanmoins, des analyses *in vivo* devront également être réalisés pour renforcer les données dans le contexte d'une infection par le HEV.

Enfin, la Gemcitabine, un analogue de cytidine, largement utilisé en clinique comme anti-cancéreux a montré sa capacité à inhiber la réplication du HEV-1 et du HEV-3 dans un modèle *in vitro* (Li et al., 2020). Bien que l'innocuité de cette molécule soit démontrée chez l'Homme, des analyses *in vivo* restent nécessaires pour démontrer

l'efficacité de cette molécule. A long terme, cette molécule pourrait être exploité de façon bivalente, afin de traiter les patients immunodéprimés atteints de cancer et positifs au HEV, par exemple.

Depuis quelques années, les limites des traitements de première intention énoncés précédemment, et l'augmentation du nombre de cas d'hépatite E dans le monde ont poussé la communauté scientifique à initier des travaux visant à identifier de nouvelles stratégies antivirales pour lutter contre le HEV. Pour parer à cette urgence, le repositionnement thérapeutique est la solution qui a été privilégiée comme l'illustrent les molécules présentées ci-dessus, qui disposaient déjà d'autorisation de mise sur le marché ou qui étaient déjà en développement clinique. Cette approche doit être poursuivie afin de pouvoir proposer aux patients des molécules efficaces, sures et administrables aux patients immunodéprimés et aux femmes enceintes.

Nom de(s) la/les molécule(s)	Origine : Criblage ? Chimie ? Autre ?	Cible : Virale / Cellulaire	Génotype et souche de VHE	Modèle d'étude	Etape du cible viral affectée	Référence
NVP-HSP990	Criblage	HSP90	- Gt3-p6 - Gt4-TW	- In vitro - In vivo (Gerbille)	Réplication	Zhang et al., 2023
Ritonavir	Criblage	Cytochrome P4503A4 (CYP3A4)	- Gt3-JE03- 1760F - Gt4-HE- JF5/15F	In vitro	Entrée/intern -alisation	- Primadharsini et al., 2022 - Primadharsini et al., 2022
НРРА	Criblage in silico + docking	Méthyltrans -férase virale	- Gt1-pSK-VHE-2 - Gt3-pSVHE-3	In vitro	Réplication	Hooda et al., 2022
Rocaglates : CMLD012073 CMLD012118 CMLD012612	Chimie médicinale	eIF4a	- Gt1-Sar55 - Gt3-83-2 - Gt3-p6	In vitro	Réplication	Praditya et al., 2022
Brequinar	Criblage	DHODH	- Gt-1 Sar55 - Gt3-p6 - Gt4/Gt5/Gt7	- In vitro - Organoïdes de foie	Réplication	Li et al., 2022
Homoharringtonine	Criblage	STAT3	- Gt-1 Sar55 - Gt3-p6 - Gt4/Gt5/Gt7	- <i>In vitro</i> - Organoïdes de foie	Réplication	Li et al., 2022
Niclosamide	Criblage	STAT3	- Gt-1 Sar55 - Gt-3 p6	- <i>In vitro</i> - Organoïdes de foie	Réplication	Li et al., 2022
Deptropine	Criblage	NF-ĸB	- Gt-3 p6	In vitro	Réplication	Qu et al., 2019
Azithromycine	Criblage	Voie calcineurine	- Gt-1 Sar55 - Gt-3 p6	In vitro	Réplication	Miao et al., 2021
Isocotoïne	Criblage	HSP90	- Gt-1 Sar55 - Gt-2 Mexico-14 - Gt-3 p6	In vitro	Réplication	Nimgaonkar et al., 2021
Gemcitabine	Criblage	STAT1	Gt-3 p6	In vitro	/	Li et al., 2020
Silvestrol	Criblage	eIF4a	- Gt-1 Sar55 - Gt-3 SHEV3 - Gt-3 p6 - Gt-4 TW76196E	- <i>In vitro</i> - Cellules primaires	Réplication	Todt et al., 2018

<u>Figure 5 :</u> Tableau présentant les différentes molécules à activité anti-HEV identifiées *in vitro* et/ou *in vivo* ces dernières années.

#### f) Principes généraux de prévention et vaccination

De façon complémentaire aux traitements médicamenteux, des méthodes simples de prévention générale ainsi que la vaccination, qui a déjà fait ses preuves dans la lutte contre les agents infectieux, sont également importantes pour lutter contre le HEV.

## Principes généraux de prévention

Le HEV est transmis par deux voies majoritaires : la consommation d'eau de boisson souillée par des matières fécales provenant d'individus ou d'animaux infectés (pays en développement) ainsi que par la consommation de viande de porcs ou de gibiers peu ou mal cuite (pays développés).

Concernant l'eau souillée, le développement des infrastructures de traitement et de distribution de l'eau de boisson permettrait de réduire le nombre d'infection dans les pays en développement. De plus, une meilleure hygiène individuelle ainsi que l'amélioration des conditions sanitaires plus généralement iraient également en ce sens.

Dans le même sens, une réduction de la consommation de viande de porc ou de gibier crue ou peu cuite constituerait une mesure efficace dans les pays développés. De façon complémentaire, une cuisson pendant au moins 20 minutes à une température supérieure à 70°C à cœur est nécessaire pour inactiver le virus (Emerson et al., 2005).

## Vaccination

La vaccination est une méthode utilisée depuis la fin du XVIIIe siècle afin de lutter contre les agents infectieux, qui a permis d'éviter ou d'endiguer certaines épidémies et d'aboutir à la disparition de certaines maladies, comme la variole en 1980.

Dans le contexte du HEV, trois vaccins expérimentaux ont pour l'heure suivi des essais cliniques. Il s'agit des vaccins HEV 239 (ou Hecolin <sup>74</sup>), HEV p179 et rHEV [56kDa]. Ces trois vaccins utilisent la protéine de capside ORF2 du HEV comme immunogène mais cet immunogène a été produit en Baculovirus pour le rHEV [56kDa] alors que les deux autres ont été produits en système bactérien *E. Coli*. Les vaccins rHEV [56kDa] et HEV 239 sont basés sur l'ORF2 de génotype 1 alors que le vaccin p179 est basé sur l'ORF2 de génotype 4 **(Figure 6)** (Peron et al., 2023).



**Figure 6 : Caractéristiques des différents vaccins dirigés contre le HEV.** Les vaccins suivant un développement clinique avancé ciblent différentes régions de la protéine ORF2 du HEV-1 ou du HEV-4. Tiré de Peron et al., 2023.

Pour l'heure, il existe un seul vaccin sur le marché, dont la distribution est limitée à la Chine, le vaccin HEV 239 (Nom commercial : Hecolin®) qui est commercialisé par l'entreprise chinoise Xiamen Innovax Biotech et qui a été approuvé par la *Chinese Food and Drug Administration* en 2011 (Peron et al., 2023). Ce vaccin est indiqué pour les individus adultes sains âgés de plus de 16 ans, incluant les fermiers, les étudiants, les militaires, les femmes en âge de procréer ainsi que pour les personnes voyageant dans des régions endémiques (Li et al., 2015). Ce vaccin est basé sur une forme recombinante de la protéine de capside ORF2 du HEV produite en bactérie *E. Coli* (Figure 6). Cette forme recombinante comporte les résidus d'acides aminés 368 à 606 de la protéine de capside ORF2 du HEV-1 mais des analyses ont montré qu'elle pouvait protéger de façon pan génotypique (Zhang et al., 2012 ; Zhao et al., 2015 ; Wen et al., 2020).

Le développement clinique de ce vaccin a permis de mettre en évidence au cours d'une phase II sa capacité à induire une importante réponse IgG anti-HEV (Zhang et al., 2009), synonyme d'une efficacité protectrice élevée. Au cours de cette phase, la séroconversion des patients était observée dès le 7<sup>e</sup> mois, et la réponse immunitaire associée augmentait de façon dose-dépendante avec le dosage d'antigène (de 10µg à 40µg). De plus, il a été observé que le schéma vaccinal comportant 3 injections par an était plus efficace que celui n'en comportant que deux. Un essai clinique de phase III, randomisé, en double aveugle et contrôlé incluant plus de 110 000 participants âgés de 16 à 65 ans, dans la province du Jiangsu en Chine, a été réalisée (Zhu et al., 2010). Les participants sélectionnés ont reçu 30µg du HEV 239 ou un vaccin approuvé dirigé contre l'hépatite B à 0, 1 mois et 6 mois. Les résultats ont confirmé le potentiel immunogène du vaccin, son efficacité et sa bonne tolérabilité puisqu'aucun effet secondaire notoire n'a été rapporté. En ce sens, il a été estimé que le vaccin restait efficace à 93% après quatre à cinq années après avoir reçu la dernière injection. Dans cet essai clinique, le taux d'effets secondaires observés chez des femmes enceintes vaccinées de façon inadvertante était similaire à celui observé chez les femmes non-enceintes. Néanmoins, le peu de participantes (37 dans le groupe HEV 239 et 31 dans le groupe contrôle) ne permet pas d'obtenir la preuve que le vaccin est bien toléré par les femmes enceintes, qui font partie des populations à risque de développer des formes graves d'hépatite E. Plus tard, un essai clinique de phase IV a été réalisé sur plus de 600 patients, incluant plus de 400 personnes âgées de plus de 65 ans (Yu et al., 2019). Les résultats ont montré que 96,7% des patients présentaient une séroconversion un mois après avoir reçu leur dernière dose. Cet essai a permis de confirmer la bonne tolérabilité et l'immunogénicité de ce vaccin chez les personnes âgées, qui sont aussi à risque de développer des formes graves d'hépatite E. Aujourd'hui, aucune donnée n'est disponible sur la vaccination d'enfants, de patients présentant une pathologie hépatique préexistante ou de patients immunodéprimés, limitant la distribution de ce vaccin en dehors de la Chine. Des essais cliniques vont devoir s'intéresser à ces populations afin de renforcer les données disponibles sur ce vaccin et permettre sa distribution dans d'autres pays. De plus, des études en Chine se sont intéressées à comparer la rentabilité de la vaccination anti-HEV chez les populations à risque (femmes enceintes en région épidémique, femme en âge de procréer, personnes âgées) en comparant deux méthodes : la vaccination universelle et la stratégie du diagnostic-vaccination (Zhao et al., 2016 ; Xia et al., 2019 ; Cheng et al., 2017). Les résultats ont montré que la seconde stratégie était la plus rentable chez ces populations. Cette stratégie permettrait à terme d'endiguer ou d'éviter de nouvelles épidémies dans les pays en développement. Celle-ci a d'ailleurs été employée récemment au Sud-Soudan et semble pour l'heure démontrer toute son efficacité (Ciglenecki et al., 2022).

Les deux autres vaccins, rHEV [56kDa] et p179 suivent un développement clinique qui est beaucoup moins avancé que pour le vaccin HEV 239 (phase II et phase Ib, respectivement) mais pourraient à terme permettre une meilleure lutte contre l'infection par le HEV dans les pays en développement.

#### g) Caractéristiques virologiques

## **Classification du HEV**

Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae*, qui comprend des virus quasienveloppés ou non-enveloppés à ARN simple brin de polarité positive, transmis par voie entérique. Cette famille est composée de deux sous-familles : la sous-famille des *Orthohepevirinae* qui comprend des virus infectant les mammifères et les oiseaux, auquel appartient le HEV, et la sous-famille des *Parahepevirinae* qui comprend des virus infectant les poissons (**Figure 7**) (Purdy et al., 2022).

Dans la sous-famille des *Orthohepevirinae*, on distingue quatre genres : le genre *Avihepevirus*, le genre *Chirohepevirus*, le genre *Paslahepevirus* auquel appartient le HEV et le genre *Rocahepevirinae* (Figure 7).

Le genre *Avihepevirus* comprend des souches de HEV aviaires détectés majoritairement chez le poulet (Haqshenas et al., 2001 ; Huang et al., 2002). Le genre *Chirohepevirus* est phylogénétiquement différent des autres virus de la sous-famille et comprend des virus retrouvés majoritairement chez la chauve-souris (Drexler et al., 2012). Le genre *Paslahepevirus* est phylogénétiquement différent des autres virus de la sous-famille et les virus de ce genre (comprenant les espèces *Paslahepevirus balayani* composées de huit génotypes de HEV : HEV-1 à HEV-8) sont capables d'infecter l'Homme et un certain nombre d'animaux domestiques et sauvages (porcs, sangliers, vaches, cerfs, lapins et chameaux notamment) (Smith et al., 2020). Les HEV-1 à HEV-4 représentent les agents pathogènes pour l'Homme les plus notoires. Les membres du genre *Rocahepevirus* sont phylogénétiquement distincts des autres virus de la sous-famille et sont capables d'infecter un certain nombre de rongeurs et de carnivores. On retrouve notamment dans le genre le HEV-C1 qui infecte majoritairement le rat et qui est pathogène pour l'Homme (Andonov et al., 2019 ; Rivero-Juarez et al., 2022).

Dans la sous-famille des *Parahepevirinae*, on ne retrouve qu'un seul genre, les *Piscihepevirus* retrouvés uniquement chez la truite fardée (Smith et al., 2014).



Figure 7 : Arbre phylogénique de la sous-famille des *Orthohepeviridae*. Cet arbre a été réalisé en comparant les séquences connues des domaines méthyltransférase des différents membres de chaque genre. Tiré de Oechslin et al., 2023.

## Le génome du HEV

Le HEV possède un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7,2 kb. Ce génome est coiffé au niveau de son extrémité 5' et poly-adénylé au niveau de son extrémité 3'. On retrouve également des séquences non traduites (NCR) au niveau des extrémités 5' et 3' du génome du HEV **(Figure 8)**.

Le génome du HEV possède trois cadres ouverts de lecture qui sont traduits en trois protéines appelées protéines ORF1, ORF2 et ORF3 **(Figure 8)**. Un quatrième cadre ouvert de lecture codant la protéine ORF4 a été décrit chez le HEV-1 suite à un stress réticulaire (Nair et al., 2016). Il est important de noter que les protéines ORF2 et ORF3 sont produites à partir d'un ARN sous-génomique bicistronique d'environ 2,2 kb grâce à la présence d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site en anglais) (Graff et al., 2016).


**Figure 8 : Organisation du génome et des protéines du HEV.** Le génome du HEV code trois protéines virales appelées protéines ORF1, ORF2 et ORF3. La protéine ORF1, présentée avec ses différents domaines, est produite à partir de l'ARN génomique alors que les protéines ORF2 et ORF3 sont produites à partir de l'ARN sous-génomique bicistronique grâce à un IRES (Internal Ribosome Entry Site en anglais). Les fonctions connues de ces trois protéines virales sont présentées sur la partie basse de la figure. La protéine ORF4, décrite chez le HEV-1 uniquement n'est pas présentée sur cette figure. N : Extrémité Nt ; C : Extrémité Ct ; m<sup>7</sup>G : coiffe ; A(n) : Queue poly-adénylée. Tiré de Ankavay et al., 2018.

## Les protéines virales

1) La protéine ORF1

# Organisation des différents domaines de la protéine ORF1:

La protéine ORF1 est une polyprotéine non-structurale de 1693 acides aminés (aa) impliquée dans la réplication du génome viral. Elle est composée de six domaines distincts : le domaine Méthyltransférase (ou MetY : aa 1-506), le domaine Fatty Acid Binding Domain-like (ou FABD-like : 515-707), le domaine hypervariable riche en proline (PRR), le macrodomaine X (aa 850-998), le domaine Helicase (HEL/NTPase : aa 1002-1279) et le domaine RdRp (aa 1298-1765) **(Figure 9)** (Fieulaine et al., 2023).

	<b>MetY</b> (1-506)	FABD-like (515-707)	PRR (H)	<b>X</b> (850-998)	HEL/NTPase (1002-1279)	<b>RdRp</b> (1298-1765)				
<b>Figure 9 : Organisation des différents domaines de la protéine ORF1 du HEV.</b> La protéine ORF1 est composée de 1765 acides aminés et de 6 domaines distincts : le domaine Méthyltransférase (MetY) en violet, le domaine FABD-like en jaune, le domaine hypervariable riche en Proline (PRR) en gris, le domaine Helicase (HEL/NTPase) en orange et le domaine ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) en vert. Adapté de Fieulaine et al., 2023.										
Coodor	nainac nutatifa ant ái	-á idontifi	ác h	istoria	iomontnon	una annua sha hia				

Ces domaines putatifs ont été identifiés historiquement par une approche bioinformatique en comparant la séquence de la protéine ORF1 avec celle d'Alphavirus ou d'autres Alphavirus-like comme le virus de la rubéole (Kooning et al., 1992). Plus récemment, des analyses cristallographiques ainsi que l'implémentation d'une nouvelle version d'AlphaFold, AlphaFold2, un logiciel puissant de modélisation structurale des protéines a permis d'affiner l'architecture de la polyprotéine du HEV (Proudfoot et al., 2019 ; Fieulaine et al., 2023 ; Goulet et al., 2023).

## • Fonctions des différents domaines de la protéine ORF1 :

Le domaine MetY catalyse la coiffe en 5' de l'ARN génomique et de l'ARN sousgénomique grâce à son activité méthyltransférase et guanylyltransférase (Magden et al., 2001 ; Ledesma et al., 2019). Des études ont montré que les patients souffrant d'hépatite aigüe étaient infectés par des virus présentant notamment des mutations dans le domaine MetY. Une étude a mis en évidence la présence des mutations D29N et V27A qui étaient associées à une augmentation de la charge virale, et de la mutation H105R qui était associée à une diminution de la charge virale (Borkakoti et al., 2017). De plus, l'activité du domaine MetY est essentielle au cycle infectieux du HEV puisque la transfection intrahépatique d'un ARN non coiffé chez le chimpanzé ne permet pas d'induire une infection (Emerson et al., 2001).

Le domaine FABD-like (Fatty Acid Binding Domain-like) a été identifié sur la base de données structurales (Proudfoot et al., 2019). Pour l'heure, la fonction de ce domaine dans le cycle infectieux du HEV n'a pas été caractérisé. Initialement ce domaine était annoté comme un domaine à activité protéase à cystéine papaïne-like (ou PCP) mais cette activité n'a jamais été démontrée *in vitro* et les données structurales recueillies ne concordaient pas avec ce type d'activité enzymatique, mais plutôt avec celles d'un domaine de liaison aux acides gras (Fieulaine et al., 2023).

Le domaine hypervariable riche en proline (PRR) est encadré par deux régions conservées : TLYTRTWS au niveau Nt et RRLLXTYPDG au niveau Ct. Néanmoins, la séquence se trouvant entre ces deux régions conservées est celle présentant la plus grande divergence au sein du génome des différents génotypes de HEV, d'où sa dénomination de région hypervariable (Purdy et al., 2012). Cette région présente également la caractéristique d'être riche en résidus Proline (Smith et al., 2012). Également, ce domaine est sujet à la présence d'insertions et de délétions, pouvant expliquer les différences de taille entre les génomes des différents génotypes de HEV (Ledesma et al., 2019). Ce domaine joue un rôle structural de charnière flexible entre les domaines adjacents (Koonin et al., 1992). Ceci est renforcé par le fait que ce domaine chevauche une région intrinsèquement désordonnée (ou IDR) qui ne possède de structure tridimensionnelle fixe (Purdy et al., 2012). Par là même, ce domaine pourrait alors être impliqué dans la modulation de la conformation de la protéine ORF1 et donc affecter les interactions protéine-protéine impliquant la protéine ORF1 (Purdy et al., 2012). Il existe aussi des preuves suggérant que ce domaine pourrait affecter le tropisme du HEV : la séquence du domaine PRR des HEV-3 et HEV-4 diffère de façon deux fois plus importante que celle du HEV-1. De ce fait, l'hétérogénéité de séquence du domaine PRR pourrait être corrélé au nombre d'hôte que peuvent infecter les différents génotypes de HEV (Purdy et al., 2012).

Le macrodomaine (ou domaine X) possède une activité enzymatique capable de retirer les groupements ADP-ribose présents sur les protéines (Alhammad and Fehr, 2020). Ce type d'activité enzymatique est retrouvé chez un certain nombre de virus à ARN et est impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire antivirale. En effet, certains facteurs d'ADP-ribosylation sont induits par la réponse Interferon (Fehr et al., 2020). L'activité enzymatique de ce domaine est également importante pour la réplication du HEV (Parvez et al., 2015). Ce domaine est également impliqué dans l'interaction avec le domaine MetY et la protéine ORF3 du HEV (Ledesma et al., 2019).

Le domaine Hélicase (ou Hel/NTPase) possède une activité enzymatique de type Hélicase, capable de séparer deux brins d'acides nucléiques tout en déroulant leur structure secondaire. L'Hélicase du HEV appartient à la superfamille I des Hélicases où l'on retrouve les Hélicases d'Alphavirus, de Coronavirus et de Rubivirus notamment (Ahmad et al., 2011) caractérisées par la présence de motifs Walker-A (impliqué dans la liaison aux NTP) et Walker-B (impliqué dans la chélation de Mg<sup>2+</sup> du complexe Mg-NTP). Il a été montré que ce domaine exerçait son activité dans le sens 5'-3' et que cette activité était nécessaire pour catalyser la première étape de la synthèse de la coiffe 5' de l'ARN génomique du HEV (Karpe et Lole, 2010).

Le domaine RdRp est impliqué dans la synthèse de brins complémentaires d'ARN viral transcrits en utilisant l'ARN viral de polarité positive comme matrice (Ledesma et al., 2019). La RdRp du HEV se fixe sur l'extrémité 3'-UTR de l'ARN viral sens pour produire un brin complémentaire antisens comme intermédiaire avant de se fixer sur l'extrémité 5'-UTR de ce brin antisens pour produire l'ARN viral sens, qui sera ensuite encapsidé pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Ce domaine va également être capable de produire les ARN sous-génomiques, à l'origine de la production des protéines ORF2 et ORF3, du fait de la présence de structures secondaires complexes. Le domaine RdRp est également impliqué dans de nombreuses interactions avec des facteurs cellulaires. Il interagit par exemple avec la protéine IFIT1 afin d'inhiber son activité anti-traduction (Pingale et al., 2019). De manière intéressante, ce domaine contient également un certain nombre d'épitope ciblés par les lymphocytes B, montrant l'implication de ce domaine dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre le HEV (Kaur et al., 1992).

A ce jour, il n'a jamais été montré expérimentalement que la protéine ORF1 était clivée en plusieurs sous-unités fonctionnelles comme c'est le cas chez bon nombre de virus à ARN simple brin de polarité positive (Ledesma et al., 2019). Beaucoup d'études ont conclu que la protéine ORF1 était clivée et tout autant ont montré que la protéine ORF1 ne l'était pas (Ansari et al., 2000 ; Ropp et al., 2000 ; Panda et al., 2000 ; Suppiah et al., 2011 ; Perttilä et al., 2013 ; Parvez, 2013 ; Paliwal et al., 2014 ; Szkolnicka et al., 2019 ; Ju et al., 2020 ; Metzger et al., 2022 ; Pierce et al., 2023). Dans les études montrant un clivage de la protéine ORF1, ce clivage était minoritaire : la forme entière de la protéine ORF1 était la forme détectée majoritairement. Ces observations confortent la nouvelle annotation de la protéine ORF1 (Fieulaine et al., 2023).

## 2) La protéine ORF2

### • Organisation générale de la protéine ORF2 :

La protéine ORF2 est la protéine du HEV la plus étudiée. Elle constitue la protéine de capside virale. C'est une glycoprotéine virale de 660 aa, possédant un peptide signal de 23 aa au niveau de son extrémité Nt. Elle possède également trois sites potentiels de N-glycosylation situés au niveau des résidus Asparagine 137 (Site N1), 310 (Site N2) et 562 (Site N3) mais seuls les sites N1 et N3 sont N-glycosylés **(Figure 10)** (Ankavay et al., 2019). La N-Glycosylation de la protéine ORF2 semble ne pas être impliquée dans la réplication, l'assemblage et l'infectiosité des particules virales (Ankavay et al., 2019; Ralfs et al., 2023). Néanmoins, elle semble être impliquée dans l'inhibition de la réponse immunitaire médiée par les anticorps (Yin et al., 2018). Une étude récente, menée *in vivo* chez des primates non humains, semble indiquer que la N-Glycosylation de la protéine

ORF2 influencerait la réplication et serait nécessaire pour l'établissement d'une réponse immunitaire médiée par les anticorps à long terme afin de protéger contre une réexposition au HEV (Ralfs et al., 2023). Le rôle de la N-glycosylation de la protéine ORF2 dans le cycle infectieux du HEV reste donc à élucider.





Grâce à des analyses structurales de pseudo-particules virales basées sur l'expression de formes tronquées de la protéine ORF2 (aa 112-608) en cellules d'insectes, trois domaines distincts ont pu être identifiés sur la protéine ORF2 : un domaine Shell (ou S, aa 129-319), un domaine Middle (ou M, aa 320-455) et un domaine Protruding (P, aa 456-606) **(Figure 11)** (Yamashita et al., 2009).

Le domaine S forme une structure interne de la particule virale et est composé de huit feuillets- $\beta$  antiparallèles disposés en sandwich et de quatre hélices  $\alpha$ . Ce domaine aurait une fonction protectrice de l'ARN viral (Cancela et al., 2022).

Le domaine M forme une structure torsadée constituée de six feuillets  $\beta$  et de quatre hélices  $\alpha$ . Ce domaine serait exposé à la surface de la particule virale et est associé au domaine S (Yamashita et al., 2009).

Le domaine P est lié au domaine M par une région riche en proline. Il est constitué de feuillets  $\beta$  torsadés. Ce domaine serait également exposé à la surface des particules virales. Il pourrait former des *spikes* à la surface de la particule virale au niveau des aa 482-490, 550-566 et 583-593. Ce domaine possède également plusieurs sites antigéniques utilisés dans le développement de vaccins dirigés contre le HEV (Yamashita et al., 2009).



**Figure 11 : Structure cristallographique de la protéine ORF2.** Les domaines S, M et P sont respectivement représentés en rose, vert et bleu. (A) VLP de HEV constituée de 16 protéines ORF2 formant une sous-unité icosahédrique de 2, 3 et 5 axes indiquant une symétrie T=1. (B) La structure tridimensionnelle de la protéine ORF2 met en évidence les domaines S, M et P. Les régions désordonnées sont représentées en pointillés et les feuillets antiparallèles du domaine S sont représentés par les lettres B, C, D, E, F, G, H et I. Adapté de Yamashita et al., 2009.

• Les différentes formes de la protéine ORF2 :

Des travaux menés au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence qu'au cours de son cycle infectieux, le HEV produisait au moins trois formes de sa protéine ORF2 **(Figure 12)** (Montpellier et al., 2018) :

- La forme ORF2i, qui est la forme associée aux particules virales. Cette protéine d'environ 80 kDa n'est pas N- ou O-glycosylée. Sa séquence précise a été identifiée : elle débute au résidu 14 et termine au niveau du résidu 660.
- Les formes ORF2g et ORF2c (abrégées ORF2g/c) sont des protéines qui sont N-glycosylées, O-Glycosylées et sialylées. Ces formes sont massivement sécrétées sous forme de dimère et ne sont pas associées à du matériel infectieux (Montpellier et al., 2018 ; Yin et al., 2018). Elles font respectivement 90 kDa et 75 kDa. Leur séquence précise a également été déterminée et leur extrémité Nter identifiée : ce sont le résidu Ser34 pour l'ORF2g et le résidu Ser102 pour l'ORF2c. De plus, la forme ORF2c constitue probablement un produit de clivage de la forme ORF2g (Ankavay et al., 2019 ; Hervouet et al., 2022).



**Figure 12 : Représentation schématique des différentes formes de la protéine ORF2 produites au cours du cycle infectieux du HEV.** Au cours de son cycle infectieux, le HEV sécrète de façon massive les formes glycosylées ORF2g/c dans les surnageant de culture de cellules infectées mais également dans le sérum des patients infectés. Ces deux formes ne forment pas de matériel particulaire. La forme ORF2i, qui n'est pas glycosylée, est associée aux particules virales. Le SP est présenté en bleu clair, la courte séquence rouge correspond à l'ARM et les sites de glycosylation N1, N2 et N3 sont mis en évidence en vert. Adapté de Hervouet et al., 2022.

Les mécanismes par lesquels ces différentes formes sont produites n'avaient pas été identifiés mais sont l'objet d'une partie de ce travail de thèse (voir « Résultats » > « Mécanismes de maturation de la protéine de capside ORF2 du HEV).

La forme ORF2i, associée aux particules virales s'assemble en particules icosaédriques pour encapsider le génome viral. Il a été montré que les particules virales présentent une capside icosaédrique de type T=3. Les monomères s'assembleraient pour former des décamères (pentamères de dimères) (Xing et al., 2010).

Comme le virus de l'hépatite A (ou VHA), le HEV est un virus quasi-enveloppé (Feng et al., 2014). En effet, les particules virales retrouvées dans les selles des patients sont nues tandis que celles retrouvées dans le sérum des patients ou dans les surnageants de culture cellulaire sont recouvertes d'une membrane lipidique dans laquelle la protéine ORF3 est enchâssée **(Figure 13)**. L'absence de lipides sur les particules virales retrouvées dans les selles de patients infectés suggère que ces particules voient leur enveloppe lipidique être digérée par les sels biliaires présents au niveau du tractus digestif. Les particules nues seraient d'ailleurs environ dix fois plus infectieuses que les particules enveloppées (Himmelsbach et al., 2018).

En microscopie électronique, les particules virales nues obtenues en culture cellulaire ont un diamètre moyen d'environ 28nm tandis que les particules enveloppées possèdent un diamètre d'environ 50nm. Cependant, la taille des particules virales enveloppées retrouvées chez les patients peut atteindre 120nm. Cette différence de taille pourrait être expliquée par le statut lipidique des patients (Montpellier et al., 2018).



**Figure 13 : Particules virales du HEV.** (A) Représentation schématique d'une particule de HEV nue mettant en évidence la capside et le génome viral. (B) Représentation schématique d'une particule de HEV enveloppée mettant en évidence la quasi-enveloppe lipidique dans laquelle la protéine ORF3 estenchâssée.

## 3) La protéine ORF3

La protéine ORF3 est une petite protéine multifonctionnelle d'environ 113 aa (13 kDa) aussi appelée « vp13 » (Yang et al., 2021). Sa taille varie sensiblement en fonction des génotypes. La protéine ORF3 serait enchâssée dans la couche lipidique qui recouvre les particules virales enveloppées présentes dans la circulation sanguine ou dans les surnageants de culture cellulaire (Yang et al., 2021). Elle possède deux domaines hydrophobes en position Nt : D1 (aa 7-23) et D2 (aa 28-53) importants pour son association aux microtubules (Kannan et al., 2009). Elle possède également deux domaines riches en Proline au niveau Ct : P1 (aa 66-77) et P2 (aa95-111) (Holla et al., 2013). Également, le site P1 contient un site de phosphorylation, la Ser71, ciblé par la mitogen-activated protein kinase (ou MAPK) (Zafrullah et al., 1997). Deux sites presenilinassociated protein (ou PSAP) conservés au sein des différents génotypes ont été mis en évidence au niveau de la protéine ORF3, au niveau des aa 86-89 et 95-98 (Nagashima et al., 2011). Ces sites sont impliqués dans l'interaction avec la protéine cellulaire Tsg101, membre du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), essentiel pour le bourgeonnement et la sécrétion des particules virales (Nagashima et al., 2011 ; Glitscher et Hildt, 2021). En ce sens, il a été mis en évidence plus récemment que la protéine ORF3 pourrait fonctionner comme un canal ionique qui partage des points communs en termes de structure avec les viroporines de classe I, impliquées dans la sécrétion des virions pendant une infection virale (Ding et al., 2017).

De plus, il a été mis en évidence que la protéine possède huit Cystéine qui sont des sites de palmitoylation fonctionnels. Cette modification permettrait à la protéine ORF3 d'être associée aux membranes des compartiments cellulaires. Elle resterait néanmoins orientée du côté cytosolique des membranes. Les mutations de ces résidus induit une inhibition de la sécrétion des particules virales, montrant l'importance de ces modifications et de l'ancrage membranaire de la protéine ORF3 dans le cycle infectieux du HEV (Gouttenoire et al., 2018).

La protéine ORF3 serait également impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte et dans le tropisme d'hôte (Yang et al., 2021).

## 4) La protéine ORF4

L'ORF4 a été identifiée chez le HEV-1 de façon chevauchante avec la séquence codante de l'ORF1 (au niveau des aa 2835-3311) (Nair et al., 2016). Cet ORF4 code la protéine ORF4 qui est produite uniquement dans des conditions de stress au niveau du réticulum endoplasmique. L'expression de cette protéine dépend de la coiffe de l'ARN viral et est médiée par une initiation interne au niveau d'un IRES-like (Nair et al., 2016). Dans cette même étude il a été montré que la protéine ORF4 formait un complexe de réplication virale comprenant les domaines RdRp, Hel et X de l'ORF1et que cette protéine pouvait favoriser la réplication virale en interagissant avec des protéines cellulaires comme l'eEF1 $\alpha$ 1, un facteur d'élongation, et la tubuline- $\beta$ . Les auteurs ont également montré que l'établissement de ce complexe était indispensable pour la réplication du HEV-1. Par là même une étude a montré que l'expression ectopique de la protéine ORF4 du HEV-1 dans des cellules infectées par le HEV-3, permettait d'obtenir une meilleure réplication du HEV-3 (Yadav et al., 2021). Une étude plus récente a montré que la protéine ORF4 n'était pas nécessaire à la réplication virale et n'influençait pas l'infectiosité virale, in vitro et in vivo dans un modèle de Gerbille de Mongolie (Bai et al., 2023).

De ce fait, le rôle exact de la protéine ORF4 dans le cycle infectieux du HEV-1 reste inconnu. Des études supplémentaires *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour mieux caractériser cette protéine et son rôle dans le cycle infectieux du HEV.

45

### *Le cycle infectieux du HEV*

Jusqu'à récemment, l'étude des différentes étapes du cycle infectieux du HEV était limitée du fait de l'absence de système de culture cellulaire efficace.

La première étape est l'attachement et l'entrée des particules virales dans la cellule hôte. Le HEV existant à la fois sous la forme enveloppée (eHEV) et non-enveloppé/nu (neHEV), des voies d'entrée distinctes et spécifiques de chaque type de particule virale co-existeraient (Yin et Feng, 2019).

Concernant les neHEV, aucun récepteur spécifique n'est connu à ce jour. Néanmoins, un certain nombre de facteurs cellulaires seraient impliqués dans les phases d'attachement et/ou d'entrée des neHEV. Par exemple, les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs), présents à la surface de nombreux types cellulaires, sont impliqués dans l'étape d'attachement d'un certain nombre de virus enveloppés ou non enveloppés. Les HSPGS, et plus particulièrement les syndecans, sont impliqués dans la phase d'attachement de VLPs du HEV aux cellules d'hépatome humain (Kalia et al., 2009). Le traitement avec des héparinases a montré une réduction drastique de l'attachement des VLPs, confirmant leur importance dans cette phase du cycle infectieux. Néanmoins, les HSPGs ne sont pas impliqués dans l'attachement et l'infection des eHEV (Yin et al., 2016). La protéine GRP78 (Glucose-Related Protein 78), présente majoritairement dans le réticulum endoplasmique mais aussi à la surface cellulaire, est importante pour la phase d'attachement d'un certain nombre de familles virales ainsi que dans la liaison aux VLPs p239 du HEV (Yu et al., 2011). Le récepteur aux asialoglycoprotéines a également montré sa capacité à se lier à la protéine ORF2 du HEV et son expression ectopique dans des cellules HeLa induit une augmentation de l'attachement des neHEV. A l'inverse, sa déplétion induit une réduction de l'attachement des neHEV (Zhang et al., 2016). L'ATP5B, sous unité de l'ATP synthase, majoritairement mitochondriale mais également présente à la surface cellulaire, a également été identifiée comme facteur d'attachement des neHEV par le bais d'expériences réalisées à partir de VLPs p239 du HEV. Son importance a été confirmée par une approche siRNA et à partir de particules issues de selles de patients (Ahmed et al., 2016). Enfin, l'intégrine  $\alpha$ 3 a été identifiée comme facteur d'attachement pour les neHEV en comparant les profils d'expression de sous-clones de cellules d'hépatome humain permissifs ou non à l'infection. Le rôle de ce facteur a été confirmé en

le surexprimant dans des clones non permissifs : ces clones devenaient alors permissifs à l'infection (Shiota et al., 2019).

Les particules eHEV entreraient quant à elles dans la cellule hôte par endocytose dépendante de la clathrine, de Rab5, de Rab7, de la dynamine-2 et du cholestérol. Leur entrée dans la cellule hôte serait bien plus lente et moins efficace que celle des neHEV (Yin et Feng, 2019). Ensuite, la dégradation de l'enveloppe lipidique aurait lieu lors du passage dans les lysosomes.

Récemment, une étude allemande a montré le rôle de l'EGFR et de la signalisation associée dans l'étape d'entrée des eHEV et des neHEV (Schrader et al., 2023). Les résultats suggèrent que cette protéine aurait probablement un rôle de co-facteur dans la phase d'entrée, comme décrit dans le cadre de l'infection par le virus de l'hépatite C (Lupberger et al., 2011).

Après l'étape de libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte, la protéine ORF1 serait directement traduite par la machinerie cellulaire. La réplicase du HEV transcrit ensuite l'ARN viral simple brin de polarité positive en ARN simple brin de polarité négative. Ces ARN servent ensuite de matrice pour la synthèse des ARN génomiques et sous-génomiques, c'est l'étape de réplication. Un certain nombre de facteurs viraux et cellulaires importants pour la réplication du HEV ont été identifiés. Par exemple, les protéines du type HNRNPs (Heterogenous Nuclear RiboNucleoProteins) comme hnRNPA2B1, hnRNPK, hnRNPH, PCBP1 et PCBP2, sont nécessaires à la réplication virale en se fixant la région promotrice de l'ARN génomique (Pingale et al., 2020 ; Wang et al., 2022). Une étude menée au sein du laboratoire a permis de mettre en évidence l'importance de GBF1 (Golgi Brefeldin A resistance Factor 1), un facteur d'échange nucléotidique, dans la réplication du HEV (Farhat et al., 2018). De manière intéressante, des microARN (miRNA) sont également importants pour la réplication du HEV, c'est le cas notamment des miRNA miR-214 et miR-122 qui interagissent directement avec l'ARN génomique pour promouvoir la réplication virale (Patil et Karpe, 2020 ; Haldipur et al., 2018).

Les protéines ORF2 et ORF3 sont ensuite traduites à partir des ARN sousgénomiques de polarité positive. Une fraction de la protéine ORF2 possédant un peptide signal fonctionnel serait transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique pour être massivement sécrétée dans le milieu extracellulaire. Une autre fraction de cette protéine qui possède un PS non fonctionnel resterait du côté cytosolique des membranes cellulaires et servirait à encapsider l'ARN génomique (Ankavay et al., 2018).

Après encapsidation du génome viral, les virions sont recouverts d'une enveloppe lipidique dans laquelle la protéine ORF3 est enchâssée. La protéine ORF3 interagirait avec la voie ESCRT et plus particulièrement avec la protéine Tsg101 pour assurer le bourgeonnement des virions. La protéine ORF3 exercerait sa fonction de viroporine afin de libérer les virions hors de la cellule hôte, probablement par la voie des MVB (MultiVesicular Bodies), également empruntée par les microvésicules cellulaires dont les exosomes (Nimgaonkar et al., 2018).



**Figure 14 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle infectieux du HEV. 1.** Le HEV initie son cycle infectieux en interagissant de manière peu spécifique avec la surface de la cellule cible avant d'interagir avec un ou plusieurs récepteurs encore non identifiés. **2.** Les particules virales seraient ensuite internalisées dans la cellule hôte par endocytose. **3.** Le génome viral est ensuite libéré dans le cytoplasme par dissociation de la capside virale. **4.** La protéine ORF1, comprenant 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 simple brin 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 forme s'assemble avec l'ARN (+) pour former des virions et ces virions **(10)** présents au niveau des MVB seraient ensuite recouverts d'une enveloppe lipidique **(11)** dans laquelle la protéine ORF3. **13.** Dans la voie non productive, la grande majorité de la protéine ORF2 est transloquée dans la lumière RE afin d'emprunter la voie classique de sécrétion des protéines. Cette voie n'aboutit pas à la formation de matériel particulaire. Adapté de Ankavay et al., 2018.

### h) Modèles d'étude du HEV

Un certain nombre d'études a montré que le HEV pouvait être étudié *in vitro* dans des modèles cellulaires transformés, primaires ou de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs). Ce virus peut également être étudié dans des organoïdes et également *in vivo* chez des modèles animaux.

## Modèles cellulaires : cellules transformées, cellules primaires et iPSCs.

Pendant de nombreuses années le HEV a été difficilement amplifiable en culture cellulaire. Depuis sa découverte, plusieurs laboratoires ont tenté de propager et de produire le virus dans un certain nombre de modèles cellulaires transformés **(Figure 15)**, hépatiques ou non.

En 1987, les selles d'un patient souffrant d'une hépatite non-A non-B transmise par voie entérale ont été utilisées pour infecter les cellules d'hépatome humain PLC/PRF/5 in vitro (Pillot et al., 1987). Au début des années 90, l'identification des souches SAR-55 (HEV-1) chez un patient au Pakistan, MEX-14 (HEV-2) au Mexique et de la souche 87A a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) pour étudier le HEV au niveau moléculaire (Meister al., 2019). En 2007, une équipe japonaise a mis au point un système de culture faisant intervenir les cellules PLC/PRF/5 et la souche japonaise JE03-1760F (HEV-3) (Tanaka et al., 2007). Dans ces études, le niveau de réplication du génome viral était assez faible, rendant difficile l'étude du cycle infectieux du HEV (Meister et al., 2019). Ces faibles niveaux de réplication n'étaient en réalité pas attribuables aux lignées cellulaires mais aux souches virales utilisées qui n'étaient pas adaptées à la culture cellulaire. En 2011, la souche Kernow-C1 de HEV-3 a été isolée chez un patient atteint d'une hépatite E chronique et co-infecté par le VIH. Cette souche possédait la particularité de de pouvoir infecter plusieurs hôtes (Homme, porc, cerf notamment) après 6 passages en culture cellulaire : cette souche sélectionnée a été nommée Kernow-C1/p6 et constitue une souche de référence pour le HEV-3 qui est largement utilisée dans le monde à ce jour (Meister et al., 2019). Il a été montré que cette souche possédait une insertion de 58 aa de la protéine ribosomale S17 dans la région hypervariable de la protéine ORF1. Cette insertion confère un avantage réplicatif significatif à cette souche (Shukla et al., 2011). Une étude comparant 21 lignées cellulaires a montré que les lignées de carcinome pulmonaire A549 et d'hépatome PLC/PRF/5 et HepG2 étaient permissives au HEV-3 et

HEV-4 (Okamoto et al., 2011). Une autre étude a également montré que le HEV-1 était capable de se répliquer dans ces lignées (Takahashi et al., 2010).

Au laboratoire, un système de culture efficace du HEV a été mis en place. Celui-ci fait intervenir la souche Kernow-C1/p6 de HEV-3 et un sous clone de la lignée PLC/PRF/5 appelé PLC3 : ce système a été nommé PLC3/HEV-p6 (Montpellier et al., 2018). La caractérisation de ce système a permis à la fois une détection précoce des protéines virales et de virions. La purification des particules virales, produites dans les surnageants de culture, sur gradient ou coussin d'iodixanol a permis de produire des titres viraux importants, de l'ordre de 10<sup>6</sup> FFU/mL (Focus Forming Units/mL). De plus, les particules virales produites dans ce système sont morphologiquement similaires aux particules virales retrouvées dans le sérum des patients et sont infectieuses *in vivo* (Montpellier et al, 2018).

De nombreuses études ont également montré que la lignée cellulaire d'hépatome humain Huh-7 et certains de ses sous-clones (Huh-7.5 notamment) était également susceptibles à l'infection par le HEV. En ce sens, les cellules Huh-7.5 sont maintenant largement utilisées comme modèle afin d'étudier l'infection par le HEV. (Meister et al., Fu et al., 2019).

Une lignée de cellules non différenciées, appelées HepaRG, est susceptible à l'infection par la souche Kernow-C1/p6 et par des souches de HEV-3 d'origine porcine (Xu et al., 2016 ; Rogée et al., 2013). Cette lignée présente de nombreuses caractéristiques communes avec les hépatocytes primaires humains comme la morphologie, l'expression des enzymes du métabolisme des médicaments notamment, contrairement aux lignées présentées précédemment. Cette lignée présente l'avantage d'être plus proche de ce qu'il se passe *in vivo*, par rapport aux lignées transformées. De plus, ces lignées peuvent être différenciées en cellules hépatocytaires-like et en cellules biliaires capables de reformer des structures bidimensionnelles ressemblant aux canalicules biliaires (Tascher et al., 2018).

Un nombre suffisant de cellules transformées est disponible pour étudier le HEV. Bien qu'elles soient faciles à cultiver à manipuler génétiquement, leur aspect transformé limite la relevance des résultats obtenus dans ces cellules. Le système de culture le plus authentique reste les cellules primaires **(Figure 15)**. Elles possèdent un génome intact et présentent un profil d'expression génique extrêmement proche de l'organe dont elles proviennent. Les cellules primaires les plus utilisées pour étudier le HEV sont les hépatocytes primaires (PPHs ou Primary Human Hépatocytes en anglais). Néanmoins, ces cellules peuvent induire une variabilité expérimentale importante, suivant l'état de santé du donneur, le protocole d'isolation ou les conditions de culture de celles-ci. Bien que les PHHs soient des cellules primaires particulièrement rares, elles restent le modèle cellulaire d'étude du HEV le plus relevant, notamment pour l'analyse de la réponse immunitaire ou l'évaluation de l'effet de molécules antivirales ciblant le HEV (Fu et al., 2019).

Les cellules dites « Hépatocyte-like » (HLCs pour Hepatocyte-like cells en anglais) différenciées à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hiPSCs pour Human-Induced Pluripotent Stem Cells, en anglais) ou de cellules souches embryonnaires humaines (hESCs pour Human Embryonic stem cells, en anglais) représentent une alternative intéressante aux PHHs puisqu'elles permettent de s'affranchir des limites de ceux-ci **(Figure 15)** (Szkolnicka et al., 2013 ; Fu et al., 2019). En effet, les lignées de cellules souches établies sont disponibles en permanence et permettent d'obtenir des résultats plus reproductibles qu'en PHHs. Les HLCs peuvent être cultivées sur de longues périodes, contrairement aux PHHs, rendant l'analyse d'infection chronique possible. Néanmoins, ce modèle nécessite de vérifier régulièrement l'expression des marqueurs hépatocytaires afin d'éviter toute dérive phénotypique. Ces cellules transformées ne sont par exemple pas susceptibles à l'infection par le HEV-2 (Helsen et al., 2015 ; Dao Thi et al., 2018 ; Wu et al., 2017).

	Cellules transformées	Cellules dérivées de cellules souches	Cellules primaires
		(ILC)	
Disponibilité	+++	++	-
Reproductibilité	+++	++	-
Modification génétique	+++	++	-
Relevance	-	++	+++
physiologique			
Susceptibilité pan-	-	++	+++
génotypique			
Polarité cellulaire	+	++	++

**<u>Figure 15 :</u>** Comparaison des systèmes de culture cellulaire du HEV. HLC : Hepatocyte-like cells. Adapté de Fu et al., 2019.

## Organoïdes

En 2020, une équipe néerlandaise a mis au point un système d'organoïdes de foie humain et plus précisément d'organoïdes de cholangiocytes intrahépatiques (ICOs pour Intrahepatic Cholangiocytes Organoids, en anglais). Les cholangiocytes sont les cellules qui constituent l'épithélium du tractus biliaire aussi présent au niveau du foie. Les cholangiocytes sont également susceptibles à l'infection par le HEV (Beer et al., 2019). Ce système a été généré à partir du compartiment biliaire intra-hépatique humain adulte et fœtal (Li et al., 2022). La caractérisation de ce système a montré qu'il était capable de supporter le cycle infectieux du HEV et qu'il constitue un modèle intéressant pour étudier la réponse immunitaire induite par l'infection par le HEV ainsi que pour confirmer le potentiel antiviral de molécules (Li et al., 2022 ; Li et al., 2022).

### Modèles animaux

Afin de mieux comprendre le cycle infectieux du HEV, sa physiopathologie, de caractériser l'effet de molécules antivirales et de vaccins, les modèles animaux ou *in vivo* constituent les modèles d'étude les plus complets et les plus relevants. Néanmoins, leur utilisation doit être limitée aux études pour lesquelles une alternative n'est pas disponible, réduite au minimum notamment au niveau du nombre d'animaux. Enfin, l'utilisation d'animaux doit être faite de façon éthique, en favorisant tout au long du protocole expérimental le bien-être animal.

Historiquement, les premiers modèles animaux utilisés pour étudier le HEV ont été les primates non-humains que sont le chimpanzé, le singe cynomolgus, et le macaque rhésus (Corneillie et al., 2019). Des études ont montré que les chimpanzés et les macaques rhésus étaient susceptibles à l'infection expérimentale par les HEV-1, -2, -3, -4, -5 et -8 ainsi que par une souche de lapin (Yugo et al., 2014 ; Liu et al., 2013 ; Li et al., 2019 ; Wang et al., 2019). Ces modèles *in vivo* sont d'excellents modèles pour étudier l'infection chronique et l'efficacité de vaccins notamment. Néanmoins, ce modèle n'étant pas un hôte naturel du HEV, les manifestations cliniques de l'infection restent limitées. De plus, l'utilisation de ces modèles sera de plus en plus limitée à l'avenir pour des considérations éthiques justifiées. Le porc, un hôte naturel des HEV-3 et HEV-4 est un modèle animal relevant. Ce modèle a largement été utilisé pour caractériser la biologie des protéines du HEV et pour analyser l'efficacité de vaccins (Corneillie et al., 2019). Plus récemment, un modèle de porc immunodéprimé a été mis au point afin d'étudier l'infection chronique et sera utile à l'avenir pour étudier la pathogénèse du HEV, la réponse immunitaire induite par le virus dans un contexte chronique ainsi que pour le développement ou la validation de molécules à potentiel antiviral (Cao et al., 2017). Néanmoins, ce modèle n'est pas susceptible à l'infection par les HEV-1 et HEV-2 qui constituent la majorité des cas cliniques en nombre.

Le lapin est un modèle d'étude du HEV intéressant par la similarité de séquence entre le HEV de lapin et le HEV-3 qui infecte l'Homme (Xia et al., 2015). Le lapin peut également être infecté expérimentalement par le HEV-4. La lapine gestante, malgré les limitations éthiques inhérentes à ce modèle, présente des caractéristiques et une évolution clinique similaire à la femme enceinte, notamment en termes de mortalité (Kenney et Meng, 2019). De plus, l'interface fœto-maternelle chez le lapin présente des similitudes avec celle de la femme enceinte rendant ce modèle intéressant pour comprendre les déterminants responsables de la gravité de la pathologie chez la femme enceinte. Le lapin est également un modèle intéressant pour étudier les manifestations extra-hépatiques ainsi que pour étudier l'efficacité de vaccins anti-HEV (Corneillie et al., 2019). Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'étudier l'infections par les HEV-1 et HEV-2 (Cheng et al., 2012).

Le rat est un modèle intéressant pour étudier l'infection par les souches de HEV de rat, comme la souche LA-B350, qui représentent une source de contamination sousestimée pour l'Homme à ce jour. L'inconvénient de ce modèle est que son infection dépend de son immunosuppression, ce qui rend impossible l'analyse de la réponse immunitaire adaptative dans ce système. Ce modèle est également résistant à l'infection par les HEV-1, HEV-3 et HEV-4 (Corneillie et al., 2019). Très récemment, un modèle de transmission féco-orale standardisée de la souche LA-B350 a été mis au point chez des rats nude athymiques et représente un modèle intéressant pour évaluer l'activité de molécules antivirales (Zhang et al., 2023).

La souris, est un modèle qui a été largement utilisé dans l'étude du HEV, bien qu'elle ne soit pas un hôte naturel du HEV (Schlosser et al., 2018). Pour rendre la souris susceptible à l'infection par le HEV, des souris chimériques au foie humanisé ont été générées. Cette « humanisation » peut être générée par deux méthodes distinctes. La première, faisant intervenir des souris SCID exprimant l'urokinase-type plasminogen activator (uPa) placée sous le contrôle du promoteur fort de l'albumine (uPa-SCID). L'expression massive de ce transgène induit de sévères dommages au niveau du tissu hépatique qui sera ensuite repeuplé par des hépatocytes primaires humains (Rhim et al., 1994). La seconde option est d'utiliser des souris dépourvues du gène de la fumarylacetoacétate hydrolase (FAH-/-). L'édition de cette enzyme impliquée dans le catabolisme de la tyrosine induit une accumulation des métabolites de la tyrosine, responsable de sévères dommages hépatiques. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris RAG2-/- (Recombination activating gene 2) et IL-2R $\gamma$ /- (IL-2 receptor  $\gamma$ -chain). Suite à cela, ces souris portent le nom de souris FRG (Azuma et al., 2007 ; Corneillie et al., 2019). Ce modèle a fait ses preuves pour étudier la cinétique d'infection ainsi que pour tester des molécules à potentiel antiviral (Corneillie et al., 2019).

## i) Réponse immunitaire et échappement par le HEV

Au cours d'une infection virale, le système immunitaire des cellules infectées va mettre en place un certain nombre de stratégies afin d'éviter la dissémination de l'agent infectieux et à termes de l'éliminer. La reconnaissance des facteurs viraux dans les cellules infectées est médiée par des senseurs de l'immunité innée qui sont spécifiques ou non, afin de produire des effecteurs antiviraux tels que les Interféron de type I et III (IFN-I et IFN-III) ainsi que le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), dans le but d'activer la réponse cellulaire spécifique. Celle-ci va aboutir à la génération de lymphocytes T spécifiques du virus et de lymphocytes B produisant des anticorps spécifiques d'antigènes viraux.

## La réponse immunitaire innée dirigée contre le HEV

## 1) Déroulement de la réponse immunitaire innée dirigée contre le HEV

Tout d'abord, les ARN viraux sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR ou Pattern Recognition Receptor, en anglais) spécifiques des virus à ARN comme les récepteurs de type RIG-I (RLR) et les Toll-like receptor (TLR) (Figure 16). Les RLR, comme les protéines RIG-I (Retinoic acid-inducible Gene I) et MDA5 (Melanoma Differentiation Associated gene 5) sont impliqués dans la reconnaissance des ARN double brin du HEV, qui constituent des intermédiaires de réplication, dans le cytoplasme des cellules infectées (Lhomme et al., 2020). Les TLR3 et TLR7, qui présentent une localisation endosomale, sont également impliqués dans la reconnaissance des ARN double brins et simple brin du HEV, respectivement (Kawai et Akira, 2011). Il a également été montré que les TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la reconnaissance de la protéine ORF2 du HEV à la surface cellulaire (Devhare et al., 2013).

La signalisation associée aux TLR2/TLR4 et aux TLR3/TLR7 font respectivement intervenir les protéines adaptatrices MyD88 et TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor-Inducing IFN). Les voies associées à RIG-I et MDA5, après reconnaissance de l'ARN viral double brin, vont quant à elles recruter la protéine MAVS (Mitochondriaassociated antiviral protein). L'ensemble de ces voies concoure à l'activation de la protéine IRF3 (Interferon regulating factor 3) par phosphorylation et du facteur de transcription NF-*x*B. Ces deux protéines vont ensuite être transloquées dans le noyau des cellules infectées et aller se fixer sur l'ADN afin de permettre la production d'Interferon de type I et de type III ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ (**Figure 16**) (Lhomme et al., 2020).



**Figure 16 :** Mécanismes de reconnaissance de l'ARN viral et de production d'Interféron au cours de la réponse immunitaire innée ciblant le HEV. Lors de l'infection, le HEV est principalement reconnu par les récepteur RIG-I, MDA5, TLR3 et TLR7, qui vont induire l'activation les voies de signalisation impliquant IRF3 et NF-κB, entrainant la production et la sécrétion d'Interféron de type I et III ainsi que de cytokines pro-inflammatoires. Adapté de Devhare et al., 2021.

Après production et sécrétion, les Interférons se fixent sur des récepteurs spécifiques situés au niveau de la membrane plasmique **(Figure 17)**. Les récepteurs à l'Interféron de type I (IFNARs), présents à la surface d'un grand nombre de types cellulaires, sont composés de deux sous unités, IFNAR1 et IFNAR2. Les récepteurs à l'Interféron de type III (IFNLR), exprimés préférentiellement à la surface des cellules épithéliales, sont eux composés de deux sous-unités, IFNLR1 et IL-10R $\alpha$  (sous-unité partagée avec le récepteur à l'IL-10) **(Figure 17)**. La fixation des Interférons sur leur récepteur, induit l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription). Suite à cette activation, les protéines STAT1 et STAT2 sont phosphorylées et s'associent à l'IRF9. Ce complexe tripartite nommé ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) est ensuite transloqué dans le noyau pour se fixer sur le promoteur ISRE (Interferon-stimulated Response Element) afin d'induire l'expression de centaines d'ISGs (Interferon-stimulated genes) comme l'ISG15, IFIT1, IRF1 ou encore OAS2 **(Figure 17)** (Devhare et al., 2021). Les ISG sont impliqués dans l'inhibition de la réplication et de la dissémination virale notamment (Mesev et al., 2019).



<u>Figure 17 :</u> Voie de signalisation induite par l'Interféron lors de l'infection par le HEV. La liaison des Interféron à leur récepteur à la surface des cellules active la voie JAK/STAT qui conduit à l'activation des protéines STAT1 et STAT2 par phosphorylation. Ces protéines phosphorylées vont se lier à IRF9 pour former le complexe ISGF3 qui va être transloqué dans le noyau, puis qui va se fixer sur le promoteur ISRE afin d'induire la transcription de centaines d'ISGs. Adapté de Devhare et al., 2021.

Le HEV a développé des stratégies afin de contourner la réponse immunitaire innée de l'hôte pour promouvoir la survie virale et maintenir l'infection.

# Les stratégies d'échappement de la réponse immunitaire innée mises en place par le HEV

Un certain nombre d'études ont montré l'implication des protéines virales ORF1, ORF2 et ORF3 dans l'interférence du HEV avec la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Plusieurs domaines de la protéine ORF1 sont capable d'interférer avec la réponse immunitaire innée. Les domaines X et FABD-like (historiquement PCP) ont été identifiés comme des antagonistes de la réponse Interféron. Le domaine X inhiberait la phosphorylation d'IRF3 médiée par le poly I:C (Nan et al., 2014). Le domaine FABD-like inhiberait la cascade de signalisation associée aux PRR par un processus de déubiquitination des protéines RIG-I et TBK-1 (Nan et al., 2014). Également, les domaines Nt de la protéine ORF1, MetY-FABD-like, seraient capables d'inhiber l'expression d'ISGs induits par l'Interféron de type I en interférant avec la phosphorylation de STAT1, réduisant drastiquement sa translocation nucléaire (Bagdassarian et al., 2018). Une étude a montré que les domaines FABD-like et MetY seraient tous les deux capables inhiber la réponse Interféron en inhibant les senseurs cytosoliques MDA5 et RIG-I (Kim et Myong, 2018 ; Kang et al., 2018 ; Myoung et al., 2016). Enfin, une étude plus récente a mis en évidence la capacité du domaine Pol à séquestrer la protéine IFIT1, impliquée dans l'inhibition de la traduction des ARN sur lesquels elles se fixent (Pingale et al., 2019).

La protéine ORF2 est capable d'interférer avec la signalisation apoptotique afin de promouvoir la réplication virale (John et al., 2011). Une étude a également montré que la protéine ORF2 est capable de se lier à la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  afin de la stabiliser et par conséquent inhiber la voie de signalisation associée à NF- $\kappa$ B (Surjit et al., 2012). La protéine ORF2 régule négativement la voie associée à NF- $\kappa$ B en interagissant également avec la protéine cellulaire TMEM134 (Tian et al., 2017). Enfin, une étude plus récente a mis en évidence que la protéine ORF2 interagit également avec le complexe MAVS-TBK1-IRF3 pour inhiber la phosphorylation d'IRF3 et sa libération du complexe, grâce au motif riche en arginine (ARM) situé au niveau de son extrémité Nt. Cette interaction conduit à une diminution de la translocation nucléaire d'IRF3 et une diminution de la production d'Interféron (Li et al., 2019).

La protéine ORF3 du HEV-4 induit l'expression de la protéine SIRP- $\alpha$  (Signal Regulator Protein  $\alpha$ ), qui empêche la phosphorylation d'IRF3, inhibant ainsi la production d'Interféron (Huang et al., 2016). La protéine ORF3, dans le contexte d'une infection par le HEV-1, est également capable d'inhiber la phosphorylation de la protéine STAT1, ce qui induit une diminution de sa localisation nucléaire et de ce fait une altération de la production d'ISGs (Dong et al., 2012). La protéine ORF3 du HEV-1 interfère également avec la signalisation associée à NF- $\kappa$ B induite par les TLR3 et TLR4, altérant significativement la production d'Interféron et de cytokines pro-inflammatoires (He et al., 2016 ; Lei et al., 2016). De façon contradictoire, des études ont également montré que l'expression de la protéine ORF3 stimulait la production d'Interféron de type I et d'ISGs, comme l'ISG15 (Wang et al., 2018). Ces observations contradictoires, ainsi que le caractère génotype-spécifique de certains résultats, suggèrent que des études plus approfondies devraient être conduites afin de mieux comprendre l'interaction entre la protéine ORF3 et l'immunité innée dirigée contre le HEV.

### La réponse immunitaire adaptative dirigée contre le HEV

La réponse immunitaire adaptative dirigée contre le HEV est activée par les effecteurs de l'immunité innée, comme les cytokines et se distingue par deux volets : une réponse adaptative aboutissant à la production d'anticorps par les lymphocytes B (réponse à médiation humorale) et une réponse adaptative aboutissant à la production de lymphocytes T spécifiques (réponse à médiation cellulaire).

## 1) La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale dirigée contre le HEV

La réponse immunitaire humorale induite par le HEV est généralement détectable après que les premiers symptômes se soient déclarés. Des IgM dirigés contre le HEV sont détectables dans la phase précoce de la maladie et peuvent persister dans l'organisme quelques mois. Une réponse IgG est mise en place rapidement après l'initiation de la réponse IgM et peut persister dans l'organisme quelques années **(Figure 18)** (Lhomme et al., 2016).

Bien que plusieurs génotypes de HEV existent, un seul sérotype a été identifié, suggérant une protection croisée potentielle des anticorps. La protéine virale ORF2

contient de nombreux épitopes ciblés par la réponse à médiation humorale (Tang et al., 2011). Le potentiel immunogène de la protéine ORF1 n'est pour l'heure pas clairement établi (El-Ayoubi et al., 2018 ; Brown et al., 2016).



**Figure 18 : Réponse immunitaire adaptative à médiation humorale au cours d'une infection aigue par le HEV.** La réponse IgM apparaît aux environs de la troisième semaine d'infection et atteint un pic à environ 6 semaines puis chute drastiquement à environ 8 semaines post-infection. Le pic de d'Alanine transférase (ALT) est superposable avec celui des IgM mais décroit rapidement. La réponse IgG apparaît une semaine environ après l'initiation de la réponse IgM et atteint un pic 2 mois post-infection. L'ARN viral est quant à lui détectable dans le sérum et les selles des patients environ 2 semaines post-infection et persiste 4 semaines dans le sérum et 6 semaines dans les selles. Tiré de Lhomme et al., 2016. Stool = Selles ; Serum = Sérum.

Des études chez l'Homme et les primates suggèrent que la réponse IgG est protectrice vis-à-vis d'une réinfection potentielle (Arankalle et al., 1999 ; Zhang et al., 2014). Cependant, la concentration minimale nécessaire à cette protection n'a pas été déterminée.

# 2) La réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire dirigée contre le HEV

Un certain nombre d'études a montré que des lymphocytes T (LT) effecteurs était activés dans le cadre d'une hépatite E aigüe, et que le taux de LT CD8<sup>+</sup> était plus important chez les individus positifs au HEV que chez les individus sains (Husain et al., 2011). De façon complémentaire, une étude sur des biopsies de foie de patients infectés par le HEV a permis de mettre en évidence un infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> activés dans le foie, suggérant un rôle de ces cellules dans l'élimination du HEV (Prabhu et al., 2011). En ce sens, une autre étude a montré un infiltrat important de LT CD4<sup>+</sup> et de LT CD8<sup>+</sup> dans le foie de patients infectés par le HEV souffrant d'une insuffisance hépatique aigüe ou décédés suite à une hépatite fulminante (Naik et al., 2015). Néanmoins, une étude récente chez des primates non-humains a montré que les LT CD8<sup>+</sup> n'étaient pas nécessaires à l'élimination du HEV chez les individus infectés (Bremer et al., 2021).

Le rôle des différentes lignées de cellules immunitaires, incluant les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup>, dans le contrôle de l'infection par le HEV reste à être approfondi.

# II) Le trafic nucléocytoplasmique des protéines

## a) Le trafic nucléocytoplasmique des protéines chez les eucaryotes

Dans les cellules eucaryotes, le noyau contient l'information génétique et est séparé du cytoplasme par l'enveloppe nucléaire. L'enveloppe nucléaire est une double membrane dans laquelle des pores protéiques ainsi que d'autres familles de protéines sont enchâssées. Le transport bidirectionnel des protéines entre le cytoplasme et le noyau se fait à travers les pores nucléaires (NPC pour Nuclear Pore Complex en anglais) qui sont situés au niveau de l'enveloppe nucléaire. Ces NPC sont constitués d'environ 30 protéines différentes appelées nucléoporines (Nup) **(Figure 19)**. Le transport de petites molécules, telles que les ions, se fait de manière passive à travers les NPC, alors que le transport de molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 30kDa est dit « sélectif » puisqu'il fait intervenir des molécules de transport appelées karyophérines (Wente et Rout, 2010).



**Figure 19 : Structure schématique d'un pore nucléaire.** Les NPC sont des structures cylindriques comprenant huit rayons (ou spoke) entourant un canal central qui va connecter le nucléoplasme et le cytoplasme. Les membranes internes et externes de l'enveloppe nucléaire (INM et ONM, respectivement) vont se rejoindre pour former un anneau dans lequel est inséré le NPC. Les Nup viennent tapisser l'intérieur du canal central formant les NPC. D'autres protéines périphériques constituent les NPC. Elles sont impliquées dans la stabilisation du complexe ainsi que dans l'interaction avec les karyophérines. Tiré de Strambio-De-Castillia et al., 2010.

(Biportines) des macro-protéines. Les membres les plus caractérisés de cette famille sont l'importine  $\beta$  (IMP $\beta$ ) et l'exportine CRM1 (Wing et al., 2022).

L'importine  $\beta$ , impliquée dans l'import nucléaire, nécessite un adaptateur, l'importine  $\alpha$  qui reconnaît le NLS (Signal de Localisation Nucléaire ou Nuclear Localization Signal, en anglais) de la protéine à transporter. L'importine  $\beta$  se fixe alors sur l'importine  $\alpha$  et le complexe importine  $\alpha/\beta$ -cargo est transporté dans le noyau de façon Ran-GTP-dépendante (Figure 20) (Wing et al., 2022). Chez l'Homme, une vingtaine d'importines  $\beta$  et six importines  $\alpha$  ont été identifiées à ce jour. L'importine  $\beta$  impliquée dans le transport des protéines possédant un NLS classique et nécessitant l'importine  $\alpha$ comme adapteur est l'adaptine  $\beta$ 1. Les NLS sont des séquences composées de résidus chargés positivement comme l'arginine ou la lysine. Il existe deux types de NLS classiques :

- Les NLS monopartites qui présentent la séquence consensus K-R/K-X-R/K (Wing et al., 2022).
- Les NLS bipartites qui présentent la séquence consensus K/R-K/R-(10-12 aa)-3K/R (Wing et al., 2022).

L'exportine CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) est impliquée dans l'export nucléaire des protéines possédant un signal d'export nucléaire, de façon Ran-GTP-dépendante (ou NES pour Nuclear Export Signal) **(Figure 20)** (Wing et al., 2022). Les NES sont des séquences riches en résidus hydrophobes (leucine, phénylalanine, méthionine et isoleucine), souvent longues de 8 à 15 résidus et contenant 4 ou 5 résidus hydrophobes (Wing et al., 2022). Ces NES constituent généralement une hélice simple qui forme des liaisons hydrogènes avec une lysine conservée au niveau de CRM1. Généralement, un site NES actif nécessite de présenter cette caractéristique structurale uniquement au niveau de trois ou quatre résidus, les autres pouvant être structurés différemment (Wing et al., 2022).



**Figure 20 :** Mécanisme d'import et d'export nucléaire des protéines, Ran-GTP-dépendant médié par les karyophérines. Les karyophérines et la protéine Ran associée au GTP (Ran-GTP) contrôlent le trafic nucléocytoplasmique des protéines à travers le pore nucléaire. Import nucléaire : L'importine  $\alpha$  reconnait et se fixe sur le NLS des protéines à transporter. L'importine  $\beta$  se lie ensuite à l'importine  $\alpha$ , le complexe importine  $\alpha/\beta$ -cargo interagit avec les nucléoporines et est transloqué dans le nucléoplasme. Après translocation, le cargo est libéré dans le nucléoplasme et le Ran-GTP se lie au complexe Importine  $\alpha/\beta$  afin de le rétro-transloquer dans le cytoplasme. L'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP libère l'importine  $\alpha/\beta$ , la rendant disponible pour un nouveau cycle d'import nucléaire. Export nucléaire : Les exportines reconnaissent les NES sur les protéines, et se lient au Ran-GTP. Ce complexe est ensuite exporté du nucléoplasme vers le cytoplasme à travers les pores nucléaires. Dans le cytoplasme, l'hydrolyse du GTP permet la dissociation du complexe et l'exportine transloquée dans le noyau pour assurer un nouveau cycle d'export nucléaire. Le trafic bidirectionnel des protéines médié par les biportines est un mélange du trafic médié par les importines et les exportines, mais n'a pas été décrit ici. Tiré de Wing et al., 2022.

# b) Trafic nucléocytoplasmique et infections virales

Le trafic nucléocytoplasmique des protéines est important dans la régulation des facteurs de transcription et de l'expression génique. Certains virus détournent ce processus afin de promouvoir l'infection virale et/ou interférer avec l'expression de gènes cellulaires clés impliqués dans l'immunité, la régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire, notamment.

Le virus de l'hépatite C (ou HCV) est un virus à ARN simple brin de polarité positive qui appartient à la famille des *Flaviviridae*. Il a été décrit que la protéine de capside du HCV, la protéine Core, présentait une localisation nucléaire précoce au cours du cycle infectieux. La protéine Core possède quatre NLS fonctionnels reconnus par l'Importine  $\alpha$ 1 afin d'être transloquée dans le noyau des cellules infectées. Également, cette protéine possède un NES fonctionnel, reconnu par l'Exportine CRM1, permettant sa rétrotranslocation dans le cytoplasme des cellules infectées afin de rejoindre le site d'assemblage cytoplasmique du HCV (Bonamassa et al., 2015). Le traitement de cellules infectées par le HCV avec un inhibiteur pharmacologique d'export nucléaire, inhibe significativement la production virale (Cerutti et al., 2011). Le rôle du trafic nucléocytoplasmique de la protéine Core du HCV est pour l'heure peu caractérisé.

Le virus de la rougeole (MV pour Measles Virus) est un virus à ARN simple brin de polarité négative appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*. Sa nucléocapside (NP) possède un NLS ainsi qu'un NES fonctionnels (Sato et al., 2006). De plus, cette protéine va inhiber la voie Interféron de l'hôte infecté en inhibant la translocation nucléaire de la protéine STAT1 phosphorylée (Takayama et al., 2012).

Le virus de la rage (RABV pour Rabies Virus) est un virus à ARN simple brin de polarité négative non segmenté appartenant à la famille des *Rhabdoviridae*. La protéine P du RABV est une composante importante du complexe de réplication virale avec la protéine L (Large Protein ou polymérase virale) et la nucléoprotéine (NP). Cette protéine possède plusieurs sites NLS et NES au niveau Ct lui permettant d'interagir avec les importines  $\alpha 1$  et  $\beta 2$  ainsi qu'avec l'exportine CRM1 afin d'interférer avec la signalisation STAT impliquée dans l'immunité innée antivirale (Pasdeloup et al., 2005 ; Rowe et al., 2016).

Le virus Ebola (EBOV pour Ebola Virus) est un virus à ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des *Filoviridae*, responsable de fièvres hémorragiques chez l'Homme. La protéine VP24 du EBOV, qui ne possède pas de NLS ou NES connus, interfère avec la translocation nucléaire de la protéine STAT1 phosphorylée afin d'inhiber la réponse Interféron en se fixant sur l'Importine  $\alpha$ 1. Cette interaction inhibe également l'import nucléaire des protéines hnRNP C1/C2 afin de stabiliser l'ARN viral dans le cytoplasme afin de promouvoir la réplication virale (Yarbrough et al., 2013).

Dans le contexte du HEV, l'équipe a montré que la protéine virale ORF2 présentait une localisation nucléaire *in vitro*, confirmant les résultats d'une équipe suisse qui montraient ce processus dans des coupes de foie de patients infectés (Ankavay et al., 2019 ; Lenggenhager et al., 2017). Les mécanismes de trafic nucléocytoplasmique de la protéine ORF2 du HEV n'étaient pas connus jusqu'à ce jour mais font l'objet d'une partie de ce projet de thèse (voir « Résultats » > « Caractérisation du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 du HEV »).

### c) L'inhibition du trafic nucléocytoplasmique : une approche antivirale

Les exemples présentés ci-dessus illustrent l'importance du trafic nucléocytoplasmique dans le cycle infectieux de différents virus. En ce sens, des molécules capables d'inhiber l'import nucléaire ou l'export nucléaire ont été développées et ont montré un potentiel antiviral intéressant. Plusieurs de ces inhibiteurs ont été inclus dans des études cliniques dans le cadre de certains cancers et d'infections virales notamment (Jans et al., 2009).

## Les inhibiteurs d'import nucléaire comme molécules antivirales

Peu d'inhibiteurs d'import nucléaire ont été caractérisés jusqu'à ce jour. Parmi les inhibiteurs d'import nucléaire ciblant les importines, l'ivermectine est le mieux caractérisé. Cette molécule qui cible l'importine  $\alpha$  a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration = Agence de sécurité des médicaments américaine) pour lutter contre certaines infections parasitaires chez l'Homme mais est surtout utilisée dans un contexte vétérinaire. Cette molécule a montré un bon potentiel antiviral vis-à-vis des infections par le SV40, le VIH, le virus de la grippe et la Dengue, notamment (Jans et al., 2019). De manière intéressante, une étude a montré que l'ivermectine était capable d'inhiber l'infection par le HEV, probablement en inhibant la réplication virale (Li et al., 2021). Le mécanisme d'action de cette molécule dans le cadre de l'infection par le HEV reste néanmoins à être élucidé.

Un autre inhibiteur de l'importine  $\alpha$ , le gossypol, a montré un potentiel antiviral, vis-à-vis des infections par le virus du Nil occidental (WNV ou West Nile Virus) et par le virus Hendra (Lopez-Denman et al., 2018 ; Atkinson et al., 2018).

D'autres inhibiteurs d'import nucléaire ciblant l'importine  $\beta$  ont été identifiés, comme l'importazole et la karyostatine 1A mais ces molécules n'ont pas montré de potentiel antiviral à ce jour (Jans et al., 2019).

L'inconvénient de l'utilisation des inhibiteurs d'import nucléaire ciblant l'importine  $\alpha/\beta$  en clinique est qu'ils inhibent l'import nucléaire d'une protéine d'intérêt mais également d'autres protéines cellulaires, rendant ces molécules toxiques pour une utilisation à long terme.

### Les inhibiteurs d'export nucléaire comme molécules antivirales

Plusieurs inhibiteurs d'export nucléaire ont montré un potentiel antiviral. Ils se fixent tous de façon covalente à l'exportine CRM1 de manière réversible ou irréversible (Jans et al., 2019).

Parmi les inhibiteurs irréversibles, la molécule la plus caractérisée est d'origine bactérienne, la leptomycine B. Elle cible la cystéine 528 de l'exportine CRM1 inhibant de ce fait son interaction avec les NES des protéines. Cette molécule, de par son caractère irréversible, présente une cytotoxicité importante *in vivo* et son utilisation reste limitée aux systèmes *in vitro*.

Les inhibiteurs réversibles, appelés KPT-SINE (SINE pour Selective Inhibitors of Nuclear Export) ont été développés plus tardivement par l'entreprise Karyopharm Pharmaceuticals (KPT). Ce sont des molécules à visée thérapeutique pour lutter contre certains cancers solides et du sang (Jans et al., 2019). Parmi ces composés, ceux présentant le développement clinique le plus avancé sont le Selinexor (KPT-330) et le Verdinexor (KPT-335). Ces deux molécules se fixent également sur la Cystéine 528 de l'exportine CRM1 (Mathew et Ghildyal, 2017). Le Selinexor est impliqué dans un certain nombre d'essais cliniques et est approuvé par la FDA pour le traitement du myélome multiple (Vogl et al., 2018). De manière intéressante, une étude a mis en évidence le potentiel antiviral du Selinexor dans le cadre de l'infection par le SARS-CoV-2, l'agent de la COVID-19, *in vitro* et *in vivo* (Kashyap et al., 2021). Le Verdinexor a également montré une activité antivirale vis-à-vis du virus de la grippe et présente une faible cytotoxicité *in vivo* (Perwitasari et al., 2016 ; Mathew et Ghildyal, 2017).

En ce sens, les inhibiteurs d'import et d'export nucléaires représentent des molécules à potentiel antiviral intéressantes. D'autres études sont nécessaires pour montrer leur potentiel antiviral vis-à-vis d'autres infections virales.

## III) Les usines virales

# a) Définition et caractéristiques des usines virales chez les virus à ARN simple brin de polarité positive

Les virus à ARN simple brin de polarité positive se réplique dans le cytoplasme de la cellule hôte. C'est un compartiment où l'on retrouve un certain nombre de protéases, de nucléases et de senseurs de l'immunité. En ce sens, les virus ont mis en place des mécanismes et des structures visant à se protéger de ces facteurs et permettre la réplication du génome viral. Ces structures sont appelées usines virales ou remaniements membranaires. Elles abritent une ou plusieurs étapes du cycle viral et sont caractérisées par la présence des protéines virales ainsi que de l'ARN viral. La nature et la localisation de ces usines virales dépendent du génome viral ainsi que de sa stratégie de réplication (Nikolic et Blondel, 2017). Ainsi, ces structures peuvent dériver de plusieurs organites cellulaires tel que le réticulum endoplasmique (*Coronavirus, Flavivirus, Hepacivirus, Arterivirus*), l'appareil de Golgi (*Enterovirus*), les mitochondries (*Nodavirus*) ou les lysosomes (*Alphavirus*) (Romero-Brey et Bartenschlager, 2014). Chez les virus à ARN simple brin de polarité positive, les usines virales peuvent être constituées de vésicules à simples membranes (SMV) ou de vésicules à doubles membranes (DMV) (Romero-Brey et Bartenschlager, 2014).

### b) Biogenèse des usines virales chez les virus à ARN simple brin de polarité positive

La biogénèse des usines virales est multiparamétrique, elle fait intervenir notamment l'oligomérisation de protéines cellulaires, l'incorporation de lipides, l'interaction des membranes avec le cytosquelette afin d'induire des courbures membranaires (Figure 21A) (Bakhache et al., 2019). Ces courbures membranaires peuvent être de deux types : positives ou négatives (Paul et Bartenschlager, 2013). Les courbures membranaires négatives correspondent à des projections membranaires préexistantes vers la lumière d'un organite ou vers le milieu extracellulaire (Figure 21B). Quant à elles, les courbures membranaires positives sont définies par la projection des membranes d'un organite vers le cytoplasme (Figure 21B) (Paul et Bartenschlager, 2013 ; Bakhache et al., 2019).

Les usines virales résultant d'une courbure négative des membranes, à l'origine des SMV, sont délimitées par la continuité des membranes cellulaires et sont reliées au

cytoplasme par un pore d'environ 8-11nm de diamètre. Ce pore est impliqué dans l'import des métabolites et des cofacteurs nécessaires à la réplication virale mais également dans l'export des molécules d'ARN viral nouvellement synthétisées **(Figure 21B.I)** (Bakhache et al., 2019).

Les DMV possèdent une structure et une biogenèse plus complexe que les SMV. Les deux membranes sont souvent scellées, rendant les échanges avec le cytoplasme plus difficiles (Paul et Bartenschlager, 2013). A ce jour, deux voies conduisant à la mise en place des DMV sont proposées **(Figure 21 B.II)**.

La première voie concerne majoritairement les *Enterovirus* et les *Picornavirus* (Figure 21C, « Path 1 »). Après courbure membranaire positive et fission, des tubules (vésicules allongées à simple membrane) apparaissent depuis l'organite donneur. Grâce à un mécanisme d'appariement membranaire, ces structures qui forment des citernes s'incurve positivement et négativement, pour les membranes externes et internes, respectivement. Puis ces structures se referment pour former une vésicule à double membrane close (Wolff et al., 2020).

La seconde voie concerne majoritairement les Nidovirus **(Figure 21C, « Path 2 »)**. Ici, les membranes du réticulum endoplasmique vont s'apparier pour former des citernes qui sont s'incurver positivement ou négativement et subir un ou plusieurs phénomènes de fission. Ceci va conduire à la formation de vésicules à double membrane qui seront libres dans le cytoplasme ou seront connectées afin de former un réseau (Wolff et al., 2020).

Dans le contexte de l'infection par le HEV, les usines virales n'ont pas été décrites. En ce sens, l'origine et la nature des remaniements membranaires ainsi que les protéines impliquées dans ce processus ne sont pas connus. L'identification des usines virales du HEV constitue un des projets annexes auquel j'ai participé au cours de ma thèse (voir « Résultats » > « Identification et caractérisation des usines virales du HEV").



С



<u>Figure 21 :</u> Formation et topologie des courbures membranaires impliquées dans la biogenèse des usines virales. A. Représentation schématique des différents mécanismes de courbure membranaire et molécules impliquées dans ce processus. B. Représentation schématique de la topologie des vésicules à simple membrane et à double membrane. Dans chaque cas, les virus induisant ce type de structures sont indiqués. C. Voies de biogenèse des vésicules à double membrane (DMV) et représentation tridimensionnelle. Adapté de Bakhache et al., 2019 ; Paul et Bartenschlager, 2013 ; Wolff et al., 2020.

## c) Facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la biogenèse des usines virales

#### **Facteurs viraux**

Les protéines non structurales virales possèdent une spécificité vis-à-vis des membranes intracellulaires et permettent de ce fait de cibler spécifiquement les organites intracellulaires (Romero-Brey et Bartenschlager, 2014). En revanche, les ARN viraux semblent avoir un rôle moindre dans ce processus (Salonen et al., 2005). Ces protéines possèdent souvent des domaines hydrophobes impliqués dans l'ancrage et le réarrangement membranaire. Néanmoins, le mécanisme précis aboutissant à la formation de ces structures complexes n'est pas connu.

Par exemple, la formation des usines virales (SMVs) du DENV est induite par l'expression de la protéine non-structurale NS4A (Miller et al., 2007). En effet, la protéine NS4A du DENV contiendrait quatre régions hydrophobes au niveau Ct, responsable de son ancrage membranaire au niveau du réticulum endoplasmique (Miller et al., 2007). Néanmoins, l'expression de la protéine NS4A seule n'est pas suffisante pour observer les invaginations du réticulum endoplasmique caractéristiques des usines virales du DENV. Le clivage du fragment 2K Ct de la protéine est nécessaire pour induire ces réarrangements membranaires (Miller et al., 2007).

Également, dans le contexte de l'infection par le HCV (DMVs), c'est l'action concertée des protéines NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B qui est responsable des réarrangements membranaires caractéristiques de l'infection appelés *Membranous Web*. Toutes ces protéines sont capables d'induire des courbures membranaires mais la protéine NS5A semble présenter le meilleur potentiel à cet égard (Romero-Brey et al., 2012). De plus, la protéine NS4B semble jouer un rôle important dans l'induction des DMVs (Egger et al., 2002). La protéine NS4B est une protéine membranaire intégrale qui contient deux hélices amphipathiques au niveau Nt, un domaine central hydrophobe constitué de quatre domaines transmembranaires potentiels et un domaine Ct hautement conservé composé de deux hélices  $\alpha$  (Gouttenoire et al., 2010). Une étude a montré que la protéine NS4B s'oligomérise au niveau de la région Ct et que cette oligomérisation est nécessaire pour l'induction des usines virales du HCV (Paul et al., 2011).

### **Facteurs cellulaires**

Plusieurs familles de facteurs cellulaires ont montré leur implication dans la biogenèse des usines virales, comme le cytosquelette, les régulateurs du trafic vésiculaire ou les lipides membranaires (Bakhache et al., 2019).

## • Le cytosquelette :

Le cytosquelette est impliqué dans le transport intracellulaire et dans la dynamique des membranes cellulaires. Un certain nombre d'études ont localisé les usines virales de virus à ARN simple brin de polarité positive à proximité directe des réseaux de microfilaments d'actine, des microtubules ou des filaments intermédiaires riches en vimentine (Frolova et al., 2006 ; Spuul et al., 2010).

Dans le cas de l'infection par le DENV, le remaniement du cytosquelette fait intervenir l'interaction directe des protéines virales NS5A et NS4A avec les filaments intermédiaires riches en vimentine. Cette interaction concentre la vimentine vers les sites de réplication virale où elle interagit avec la protéine NS1 (Teo et Chu, 2014 ; Le Breton et al., 2011 ; Kanlaya et al., 2010). Néanmoins, son rôle et celui des filaments intermédiaires dans la formation et/ou le maintien des usines virales du DENV ou d'autres *Flavivirus* reste peu caractérisé.

Dans le cas de l'infection par le virus Zika (ZIKV), la formation des usines virales est sensible aux molécules ciblant le cytosquelette, en le stabilisant ou le déstabilisant, montrant l'importance de la dynamique du cytosquelette dans ce processus. Plus précisément, le ZIKV induit un remodelage important du cytosquelette caractérisé par la présence des microtubules et des filaments intermédiaires riches en vimentine autour de ses usines virales, formant des « cages » (Cortese et al., 2017 ; Neufeldt et al., 2018). Plus récemment, une étude a montré que les filaments intermédiaires riches en vimentine avaient un rôle primordial dans l'établissement des usines virales ainsi que dans la réplication du ZIKV en concentrant tous les facteurs nécessaires à la réplication virale (Zhang et al., 2022).

### • Les régulateurs du trafic vésiculaire :

Les régulateurs du trafic vésiculaire jouent un rôle important dans les remaniements membranaires et dans le trafic vésiculaire, en utilisant le cytosquelette comme support. Les composants de la voie de sécrétion COP I (Coat protein complex I) et du complexe ESCRT sont des régulateurs du trafic vésiculaire impliqués dans la biogenèse des usines virales des virus à ARN simple brin de polarité positive (Bakhache et al., 2019).

Parmi les composants de la voie COP I, la GTPase Arf1 (ADP Ribosylation Factor 1) et son facteur d'échange nucléotidique GBF1 (Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor I), qui sont impliqués dans le bourgeonnement des vésicules de sécrétion au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, sont par exemple recrutés par les protéines non-structurales 3A et 3CD du poliovirus. Ces facteurs sont relocalisés à proximité des usines virales. De façon complémentaire, il a été montré que la réplication du poliovirus était sensible à la Brefeldine A, un inhibiteur de GBF1, confirmant l'importance de ces composants dans la biogenèse des usines virales du poliovirus (Belov et al., 2008). Ces composants sont également importants pour d'autres virus comme l'Enterovirus CBV3 (Coxsackie B Virus 3) ou le Coronavirus MHV (Murine Hepatitis Virus ou Virus de l'hépatite murine en français) (Lanke et al., 2009 ; Verheije et al., 2008).

L'implication de la voie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for transport) dans la biogenèse des usines virales a été bien caractérisé chez un virus de plante, le virus du rabougrissement buissonneux de la tomate ou TBSV (Barajas et al., 2009 ; Kovalev et al., 2016). L'homologue de la protéine Tsg101 des mammifères, la protéine Vps23p, faisant partie du complexe ESCRT-I, est recrutée par la protéine virale p33 ubiquitinylée au niveau des membranes peroxysomales où elle induit les déformations membranaires nécessaires à l'établissement des usines virales du TBSV (Kovalev et al., 2016).

## • Les lipides membranaires :

La création des usines virales repose majoritairement sur une expansion des membranes cellulaires, suggérant ainsi une activation des voies régulant la lipogenèse. En ce sens, des analyses lipidomiques sur des cellules infectées par des virus à ARN simple brin de polarité positive, comme le HCV ou le DENV, a montré le potentiel de ces virus à réguler le métabolisme lipidique de l'hôte. Cela est caractérisé par une augmentation de la synthèse de phospholipides, de sphingolipides et de stérols notamment (Diamond et al., 2010 ; Perera et al., 2012). Pour cela, les virus peuvent par exemple favoriser la captation de lipides extracellulaires et les adresser vers les usines virales par des transporteurs spécifiques tels que l'oxysterol-binding protein (OSBP) qui est responsable de l'enrichissement en cholestérol des usines virales des Enterovirus (Ilnytska et al., 2013). Les virus peuvent également stimuler et détourner des enzymes clés du métabolisme lipidique. Dans le cadre de l'infection par le WNV, la 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR), une enzyme clé de la synthèse du cholestérol, est surexprimée et relocalisée au niveau des usines virales qui dérivent du réticulum endoplasmique (Mackenzie et al., 2007). De façon plus générale, le détournement du métabolisme lipidique par les virus à ARN simple brin de polarité positive permet d'augmenter la surface de membrane disponible pour générer les usines virales ainsi que de créer un environnement dont la composition va favoriser la réplication virale.

# IV) Les complexes adapteurs ou adaptines dans l'adressage intracellulaire des protéines

### a) Généralités chez les eucaryotes

Les complexes adaptateurs ou adaptines (AP) sont des complexes hétérotétramériques impliqués dans l'adressage de protéines par le biais de vésicules au niveau du système endosomal et dans la voie de sécrétion post-Golgi (Boehm et Bonifacio, 2001). Les adaptines sont exprimées de façon ubiquitaire et sont conservées chez les eucaryotes. Le trafic vésiculaire post-Golgi fait intervenir cinq APs, des protéines membranaires, des protéines accessoires et la clathrine (Shin et al., 2021). Les trois APs les plus abondantes (AP-1, AP-2 et AP-3) et deux sous-unités du complexe COP I partagent un ancêtre commun et ont été identifiés chez un certain nombre d'organismes tels que la drosophile (*D. melanogaster*), la levure (*S. cerevisiae* et *S. pombe*), l'Homme (*H. sapiens*) et la souris (*M. musculus*) (Shin et al., 2021). Peu après leur identification, une quatrième AP a été identifiée, AP-4, que l'on retrouve chez l'Homme et la souris mais pas chez la drosophile ou la levure (Hirst et al., 1999 ; Robinson et Bonifacio, 2001). Enfin, une cinquième et dernière AP, AP-5, a été identifiée chez l'Homme uniquement (Hirst et al., 2011).
#### b) Organisation et structure des complexes adapteurs

Les cinq complexes possèdent deux grandes sous-unités (une sous-unité commune  $\beta$  et une sous-unité  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  ou  $\zeta$ ), une sous-unité moyenne ( $\mu$ ) et une petite sous-unité ( $\sigma$ ) (Shin et al., 2021). Ces sous-unités possèdent une homologie de séquence comprise entre 20% et 80% et possèdent des domaines communs qui ont été utiles pour leur identification.

Pour tous les complexes AP, le tronc Nt des grandes sous-unités et la totalité des sous-unités  $\mu$  et  $\sigma$  forment un domaine dit « Core » (ou « cœur » en français) (Figure 21A). Ce domaine possède plusieurs fonctions : la reconnaissance des séquences consensus YXX Ø et [DE]XXXL[LI] présentes sur les cargos et le recrutement membranaire des complexes adapteurs. Les régions Ct des deux grandes sous-unités constituent le domaine « appendage » ou « ear » (ou appendice en français) (Figure 21A), impliqué dans l'interaction avec les protéines régulatrices et les protéines accessoires. Entre les domaines « Core » et « Ear », se trouve le domaine « Hinge » (pour « charnière » en français) (Figure 21A) qui est responsable pour les complexes AP-1, AP-2 et AP-3, de la liaison aux chaines lourdes de clathrine afin de former des vésicules recouvertes de clathrine (Park et Guo, 2014).

Au niveau structural, les complexes adapteurs adoptent deux conformations : une conformation fermée et une conformation ouverte **(Figure 21B)**. L'exemple le plus documenté est celui de l'adaptine AP-1. En conformation fermée (« Locked state »), les deux sites de reconnaissance des cargos sont masqués par les grandes sous-unités  $\beta$ 1 et  $\gamma$ . Après fixation de la petite protéine G Arf1 au niveau de la sous-unité  $\beta$ 1, le complexe subit une transition conformationnelle vers un état ouvert (« Open state, Arf1 recruited ») où les sites de fixation des cargos (sites de reconnaissance des séquences YXX $\emptyset$  et [DE]XXXL[LI]) sont exposés et capables de se lier au cargo correspondant (Ren et al., 2013 ; Park and Guo, 2014).



**Figure 21 :** Représentation schématique générique des complexes adapteurs et états conformationnels du domaine « Core » du complexe AP-1. (A) Structure générique des complexes adapteurs. N et C indiquent les extrémités Nt et Ct, respectivement. Le domaine « Trunk » correspond au domaine « Core ». MHD : µ-homology domain. (B) États conformationnels fermés (à gauche) et ouverts (à droite) du domaine Core du complexe AP-1. A l'état « fermé », les sites de liaison des cargos sont masqués par les deux grandes sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$ 1. Lorsque que la petite protéine G Arf1 se fixe sur le complexe au niveau de la grande sous-unité  $\beta$ 1, une transition conformationnelle vers un état ouvert a lieu, permettant de démasquer les sites de liaisons des cargos (mis en évidence par les cercles jaunes). Tiré de Boehm et Bonifacio, 2001 et de Park et Guo, 2014.

### c) Biologie des complexes adapteurs

#### L'adaptine AP-1

L'adaptine AP-1 est composée des grandes sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$ 1, de la sous-unité moyenne  $\mu$  et de la petite sous-unité  $\sigma$ 1 (Figure 22A). Chez l'Homme, il existe deux isoformes de la sous-unité  $\gamma$  AP-1G1 et AP-1G2, identiques à 60% et deux isoformes de la sous-unité μ, AP-1M1 et AP-1M2 (Shin et al., 2021). Une étude a montré que ces deux sousunités sont capables de recruter des protéines accessoires différentes, tout en étant toutes les deux indispensables pour le développement embryonnaire de la souris (Lewin et al., 1998 ; Zizioli et al., 2017). De manière intéressante, le knock-out d'une sous-unité du complexe inhibe l'activité du complexe (Meyer et al., 2000 ; Shin et al., 2021). Le complexe AP-1 est impliqué dans le transport vésiculaire clathrine-dépendant entre le réseau transgolgien (TGN ou Trans Golgi Network) et les endosomes tardifs (Park et Guo, 2014). Dans les cellules épithéliales, il est impliqué dans le transport basolatéral du cargo (Figure 22B). Un des partenaires d'interaction d'AP-1 le plus connu est la forme cationindépendante du récepteur au mannose-6-phosphate (Doray et al., 2002 ; Ghosh et Kornfeld, 2004). La localisation subcellulaire d'AP-1 dépend de son interaction avec la petite protéine G Arf1 (ADP Ribosylation Factor 1) et du phosphatidylinositol-4phosphate (PI4P) (Shin et al., 2021). L'adaptine AP-1 est recrutée depuis le cytosol par le cargo qu'elle doit transporter, permettant sa liaison à la clathrine et la formation de vésicules de transport (Wang et al., 2003 ; Baust et al., 2006 ; Ren et al., 2013). AP-1 reconnait des signaux d'adressage spécifiques sur les cargos transmembranaires à transporter. Les plus caractérisés sont les motifs riches en Tyrosine (ou Tyrosine-based motifs, en anglais) YXXØ et les motifs dileucines (ou Dileucine-based motif, en anglais) [DE]XXXL[LI] avec X correspondant à n'importe quel résidu d'acide aminé et  $\emptyset$ correspondant à une Leucine, une Isoleucine, une Methionine, une Valine ou à une Phénylalanine. Les motifs riches en Tyrosine sont majoritairement reconnus par la sousunité  $\mu 1$  et les motifs dileucines sont majoritairement reconnus par la sous-unité  $\sigma 1$  (Park et Guo, 2014 ; Beacham et al., 2019). Plus précisément, des données expérimentales suggèrent que l'hémicomplexe  $\gamma 1$ - $\sigma 1$  est nécessaire pour l'interaction avec les motifs dileucines (Mattera et al., 2010).

### L'adaptine AP-2

L'adaptine AP-2 est composée des grandes sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ 1, d'une sous-unité moyenne  $\mu$ 2 et d'une petite sous-unité  $\sigma$ 2 (Figure 22A). Ce complexe est impliqué dans l'endocytose des cargos depuis la membrane plasmique vers les endosomes de recyclage et les endosomes précoces notamment, de façon clathrine dépendante (Figure 22B) (Park et Guo, 2014). En ce sens, le complexe AP-2, par le biais de sa région Core, est impliqué dans l'internalisation de nombreux récepteurs cellulaires comme le récepteur aux LDL (LDLR pour Low Density Lipoprotein Receptor) (Boucrot et al., 2010). Comme pour le complexe AP-1, sa déplétion est létale pour le développement embryonnaire de la souris (Mitsunari et al., 2005). Les sous-unités du complexe AP-2 possèdent moins d'isoformes que les sous-unités du complexe AP-1, avec seulement deux isoformes de la grande sous-unité  $\alpha$  (AP-2A1 et AP-2A2), les autres sous-unités étant uniques. Le complexe AP-2 est retrouvé majoritairement au niveau de la membrane plasmique et sa localisation subcellulaire est dépendante de sa liaison au phosphatidylinositol-4,5biphosphate (PIP<sub>2</sub>) et à la petite protéine G Arf6 (ADP Ribosylation Factor 6). Le complexe AP-2 reconnait les mêmes motifs que l'adaptine AP-1 : les motifs dileucines et les motifs riches en Tyrosine (Park et Guo, 2014).

### L'adaptine AP-3

L'adaptine AP-3 est composée des grandes sous-unités  $\delta$  et  $\beta$ 3, d'une sous-unité moyenne  $\mu$ 3 et d'une petite sous-unité  $\sigma$ 3 (Figure 22A). Les sous-unités  $\beta$ 3 et  $\mu$ 3 sont présentes chez l'Homme sous la forme de deux isoformes A et B. Pour ces deux sousunités, l'isoforme A est ubiquitaire alors que l'isoforme B est uniquement retrouvée au niveau du système nerveux (Newell-Litwa et al., 2006). En ce sens, AP-3 via son domaine  $\delta$ 3 est impliqué dans le trafic de la protéine VAMP7 (Vesicle Associated Membrane Protein 7), une protéine appartenant à la famille des SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitivefactor Attachment protein REceptor ou Récepteur soluble d'attachement sensible au Nethylmaleimide, en français), qui est impliquée dans la fusion des compartiments endosomaux tardifs avec les autres membranes cellulaires (Kent et al., 2012). Le complexe AP-3 ubiquitaire est impliqué dans le transport vésiculaire clathrine-dépendant entre les endosomes précoces et les lysosomes, les organelles assimilés aux lysosomes (LRO pour Lysosome-related organelles, en anglais) et les vésicules synaptiques **(Figure 22B)** (Dell'Angelica et al., 1998 ; Shin et al., 2021). Au niveau du système nerveux, le complexe AP-3 est impliqué dans la biogenèse des vésicules de sécrétion depuis les endosomes et, au niveau des neurones, dans le transport des cargos de l'appareil de Golgi vers les axones (Zlatic et al., 2013 ; Li et al., 2016). AP-3 se localise au niveau du TGN et colocalise avec les compartiments endosomaux (Simpson et al., 1997). Sa localisation subcellulaire est dépendante majoritairement de la petite protéine G Arf1 dont l'activité, spécifiquement vis-à-vis d'AP-3, dépend de la protéine AGAP-1 qui appartient à la famille des ArfGAPs (Arf GTPase activating proteins ou protéines activatrices des GTPases de type Arf). Également, sa localisation dépend des phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (ou PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>)) et des phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (ou PtdIns(3,4,5) *P*<sub>3</sub>)) (Newell-Litwa et al., 2006). Le complexe AP-3 reconnait les mêmes motifs que les adaptines AP-1 et AP-2 : les motifs dileucines et les motifs riches en Tyrosine (Park et Guo, 2014).

### L'adaptine AP-4

L'adaptine AP-4 est composée de deux grandes sous-unités  $\varepsilon$  et  $\beta$ 3, d'une sousunité moyenne  $\mu$ 4 et d'une petite sous-unité  $\sigma$ 4 (Figure 22A). L'adaptine AP-4 est préférentiellement localisée au niveau du TGN et est impliquée dans le transport vers les endosomes précoces et vers le pôle basolatéral des cellules épithéliales (Figure 22B) (Dell'Angelica et al., 1999 ; Simmen et al., 2002). Les substrats du complexe AP-4 les mieux caractérisés sont les protéines AGT9A et Tepsine (Davies et al., 2018 ; Borner et al., 2014). La protéine AGT9A a un rôle de régulation de l'autophagie (Broadbent et al., 2023). Sa localisation subcellulaire est dépendante majoritairement de la petite protéine G Arf1. Ici, aucun phosphoinositide n'a montré son implication dans la localisation subcellulaire d'AP-4 (Shin et al., 2021). Contrairement aux complexes AP-1/-3, l'action d'AP-4 est indépendante de la clathrine et la protéine de manteau impliquée dans le trafic des vésicules contenant AP-4 n'est pas connue à ce jour (Shin et al., 2021). Pour l'heure un seul type de motif reconnu par l'adaptine AP-4 a été mis en évidence, il s'agit des motifs riches en Tyrosine (Park et Guo, 2014). En effet, une étude a montré que l'adaptine AP-4 et son domaine  $\mu$ 4 étaient capable de se fixer au niveau de la séquence YKFFE (qui présente des similarités avec la séquence consensus riche en Tyrosine YXX *(*) sur le précurseur amyloïde APP dans le système nerveux (Burgos et al., 2010).

## L'adaptine AP-5

L'adaptine AP-5 est composée de deux grandes sous-unités  $\varepsilon$  et  $\beta$ 5, d'une sousunité moyenne  $\mu$ 5 et d'une petite sous-unité  $\sigma$ 5 (Figure 22A). Malgré le fait qu'AP-5 possède les mêmes sous-unités (et les mêmes homologies de séquences) que les autres complexes adapteurs, la grande sous-unités  $\varepsilon$  ne possède pas de domaine Hinge et Ear où se trouvent les domaines de liaison à la clathrine (Shin et al., 2021). Le complexe AP-5 est le dernier complexe adapteur à avoir été découvert en 2011 et est impliqué dans le trafic depuis les endosomes tardifs et les lysosomes vers le TGN notamment (Figure 22B) (Hirst et al., 2011; Shin et al., 2021). Comme AP-4, le complexe AP-5 ne s'associe pas avec la clathrine. En revanche, il a été montré qu'il interagissait avec les protéines SPG11 (Spastic Paraplegia type 11) et SPG15 (Spastic Paraplegia type 15) (Hirst et al., 2013). Ces protéines possèdent des structures  $\alpha$ -solénoïdes similaires à celles retrouvées au niveau de la chaine lourde de la clathrine et des sous-unités de COPI, suggérant un rôle de protéine scaffold de ces protéines vis-à-vis de l'adaptine AP-5 (Park and Guo, 2014). Néanmoins, le mécanisme de recrutement d'AP-5 au niveau des membranes n'est pas connu. Le mécanisme le plus probable serait que la protéine SPG15 facilite l'ancrage membranaire du complexe en interagissant avec le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) via son domaine FYVE (Hirst et al., 2013; Park et Guo, 2014). De plus, des résultats ont montré qu'AP-5 était insensible à la Brefeldine A, indiquant que sa localisation subcellulaire n'était pas régulée par Arf1, Arf5 ou encore GBF1 (Reiling et al., 2013). Pour l'heure, aucun séquence consensus reconnue par AP-5 n'a été identifiée. Les résidus conservés nécessaires à la liaison à la séquence consensus  $YXX \oslash$  sont absents au niveau de la sous-unité µ5 d'AP-5, suggérant un mécanisme différent de reconnaissance des cargos par l'adaptine AP-5 (Hirst et al., 2011).



**Figure 22 :** Diagrammes présentant la composition et la distribution subcellulaire des différents complexes adapteurs. (A) Diagramme présentant la composition des cinq complexes adapteurs connus. Tous les complexes sont composés des domaines « Core », « Hinge » et « Ear ». Les domaines « Core » sont responsables de la liaison au cargo et de l'ancrage membranaire. Les domaines « Hinge » et « Ear » sont importants pour l'interaction/recrutement des protéines de manteau et des protéines régulatrices/accessoires. (B) Distribution subcellulaire des complexes adapteurs. Le complexe AP-1 est localisé au niveau du TGN et est responsable du transport entre le TGN et le compartiment endosomal de recyclage. AP-2 est impliqué dans l'endocytose clathrine-dépendante depuis la membrane plasmique. AP-3 est localisé au niveau des endosomes et est impliqué dans le trafic entre les endosomes précoces et les lysosomes/LRO (Lysosomes-related organelles). AP-4 est localisé au niveau du TGN et est impliqué dans le trafic du TGN vers les endosomes précoces et le pôle basolatéral des cellules polarisées. Enfin, AP-5 est localisé au niveau des endosomes tardifs et impliqué dans le trafic vers les lysosomes et le TGN notamment. Adapté de Park et Guo, 2014.

#### d) Complexes adapteurs et infections virales

Un nombre important de virus exploite les voies de trafic intracellulaire des protéines afin notamment de promouvoir l'entrée virale, d'adresser les protéines virales à des compartiments particuliers ou promouvoir le réarrangement des membranes cellulaires. Ceci a pour objectif de promouvoir la réplication virale, la production de particules infectieuses ou encore d'interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte (Geljic et al., 2021). Les effecteurs les plus caractérisés du trafic intracellulaire des protéines sont les complexes adapteurs et de nombreuses études ont montré qu'un certain nombre de virus, appartenant à des genres différents, exploite les complexes adapteurs. Les complexes adapteurs constituent de ce fait une cible conservée pour les virus (Yan et al., 2020). Par soucis de concision, seules les interactions entre virus à ARN simple brin de polarité positive et complexes adapteurs seront développés ici.

### Complexes adapteurs et Coronavirus humains (hCoV)

Des études ont montré que les CoV humains hautement pathogènes MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) et SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) interagissaient avec les adaptines AP-1 et AP-2 (Yuan et al., 2020 ; Wang et al., 2020 ; Cantuti-Castelvetri et al., 2020 ; Rebendenne et al., 2022). En effet, une étude récente basée sur un criblage par l'approche CRISPR-Cas9 a permis d'identifier les facteurs d'hôte importants pour l'infectiosité virale. Parmi ces facteurs, la sous-unité y1 du complexe AP-1 a été identifiée comme étant importante pour les CoV humains hautement pathogènes ainsi que pour les CoV saisonniers NL63 et 229E (Rebendenne et al., 2022). De plus, il a été montré que la protéine Spike (ou S) des CoV se liait au récepteur cellulaire ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) *in vitro* et *in vivo* mais aucun domaine impliqué dans l'internalisation virale n'a été identifié (Wang et al., 2008). Plus récemment, il a été démontré dans le contexte de l'infection par le SARS-CoV-2 que la protéine S interagit avec la protéine virale ORF3a, qui possède un motif d'internalisation par AP-2 de type YXX Ø. En effet, en présence de Dynasore et de Pistop 2, deux molécules inhibant l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose de la protéine S était réduite (Bayati et al., 2021). De plus, l'inactivation spécifique de la sous-unité µ2 d'AP-2 par une approche d'interférence par petits ARN (siRNA) induisait le même phénotype pour les trois CoV humains (Wang et al., 2020).

### Complexes adapteurs et Virus de l'Hépatite C (HCV)

Le HCV utilise la voie d'endocytose médiée par la clathrine pour entrer dans la cellule hôte (Blanchard et al., 2006), où l'AP-2-associated kinase-1 (AAK1) la cyclin G-associated kinase (GAK) activeraient la sous-unité AP-2M1, suggérant un rôle indirect du complexe adapteur AP-2 dans l'étape d'entrée du HCV dans la cellule cible (Neveu et al., 2015). Une autre étude a montré que la sous-unité AP-2M1 était aussi impliquée dans l'étape d'assemblage du HCV, indépendamment de son rôle dans l'étape d'entrée, notamment en adressant la protéine Core aux gouttelettes lipidiques (Neveu et al., 2012). Plus tard, dans le cycle infectieux, il a été montré que les adaptines AP-1 et AP-4 étaient impliquées dans la sortie des particules infectieuses de la cellule hôte par le biais d'approches faisant intervenir des shRNA (Short Airpin RNA) et des molécules inhibitrices, ainsi que dans la transmission de cellule à cellule du virus (Xiao et al., 2018). De plus, une étude a montré que la sous-unité  $\sigma$ 1 du complexe AP-1 serait nécessaire à l'établissement de l'infection par le HCV *in vitro*, probablement en stabilisant la glycoprotéine E2, dans les cellules d'hépatome humain (Li et al., 2016).

## Complexes adapteurs et Virus de la Dengue (DENV)

Une étude basée sur un criblage d'une banque de siRNA a mis en évidence l'importance des adaptines AP-1 et AP-2 dans l'infection par le DENV (Ang et al., 2010). Plus tard, une étude a montré que le complexe AP-1 n'était impliqué ni dans l'étape d'attachement ni dans l'étape d'internalisation du DENV. Cette étude montre néanmoins l'importance de la sous-unité AP-1G1 dans la réplication virale, par une approche de siRNA et de molécule inhibitrice (Yasamut et al., 2015). De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont utilisé une molécule, le composé A5, inhibant spécifiquement l'adaptine AP-1. Cette molécule a été initialement développée chez la levure mais a montré sa spécificité dans des cellules humaines (Duncan et al., 2007 ; Yasamut et al., 2015).

## V) Les proprotéines convertases et les protéases intramembranaires

### a) Généralités sur les protéases

Après leur synthèse, les protéines peuvent être modifiées de façon réversible ou irréversible. Aujourd'hui, plus de 200 modifications post-traductionnelles des protéines ont été identifiées chez les mammifères, celles-ci incluent notamment : la O-glycosylation des résidus Sérine/Thréonine, la phosphorylation des résidus Sérine/Thréonine, la phosphorylation des protéines, la palmitoylation des résidus Cystéine, l'ubiquitination/méthylation des résidus Lysine, la sumoylation et l'oxydation des protéines et l'amidation carboxyterminale.

La modification post-traductionnelle irréversible la plus commune est la protéolyse au niveau de sites spécifiques/consensus des protéines, afin de générer plusieurs produits de clivage aux rôles divers. Ce processus est médié par des protéases qui clivent de façon spécifique les liaisons peptidiques, afin de générer des protuits de clivage qui pourront eux-mêmes être modifiés afin d'être actifs. Les protéases sont des protéines possédant une activité enzymatique permettant d'hydrolyser les protéines et les polypeptides. L'analyse du génome humain a révélé la présence d'environ 600 protéases distinctes, appartenant à cinq grandes classes (Puente et al., 2003). Parmi celles-ci, les protéases à sérine sont caractérisées par la présence d'un site actif à sérine qui sert à l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des substrats. C'est l'une des familles contenant le plus de membres, environ 200, et cette famille représente 1% des protéines humaines (Puente et al., 2003 ; Long et al., 2011). La trypsine, la chymotrypsine et les proprotéines convertases constituent les protéases les plus étudiées de cette famille.

La famille de protéases qui a été découverte le plus récemment, il y a vingt ans environ, est la famille des protéases intramembranaires, aussi appelées « i-CLiPs » pour *Intramembrane Cleaving Proteases,* qui sont des protéases à sérine ou à aspartate ou à glutamate ou encore des métalloprotéases. Les protéases appartenant à cette famille présentent la particularité d'hydrolyser leurs substrats au niveau des plans membranaires. Leurs membres ont été caractérisés dans le contexte de pathologies comme la maladie d'Alzheimer pour la préséniline, qui est la sous-unité catalytique du macro-complexe  $\gamma$ -sécrétase, par exemple. Les proprotéines convertases (PCs) et les i-CLiPs étant d'intérêt pour mon projet de recherche, sont détaillées ci-dessous.

# b) Les proprotéines convertases (PCs)

## Généralités chez les eucaryotes

1) Découverte des PCs

Jusqu'à présent, 9 PCs ont été identifiées chez les mammifères. La PC1, la PC2 et la furine ont été les premières proprotéines convertases (PCs) à avoir été identifiées il y a trente ans. Par la suite, les PC4, PC5, PACE4 (Paired basic Amino acid-Cleaving Enzyme 4) et PC7 ont été identifiées, ainsi que la SKI-1 (Subtilisin kexin isozyme-1) (Seidah et Prat, 2012). La dernière convertase, nommée PCSK9 (Proprotein convertase Subtilisin/Kexin type 9), a été identifiée en 2003 (Seidah et al., 2003). Les PCs sont les membres d'une sous-famille de neuf subtilisin-like protéases à sérine sécrétoires et leurs gènes respectifs sont nommés PCSK1-PCSK9 (**Figure 23**) (Seidah et Prat, 2012).

# 2) Activité enzymatique des PCs

Les PCs sont impliquées dans le clivage d'un bon nombre de protéines, aboutissant à leur activation ou à leur inactivation (Seidah et al., 2008). Les PCs reconnaissent des sites consensus de clivage bien caractérisés. PC1, PC2, la furine, PC4, PC5, PACE4 et PC7 clivent les protéines engagées dans la voie de sécrétion au niveau de résidus basiques simples ou appariés au sein du motif  $(R/K)X_n(R/K)\checkmark$  (où la flèche indique le site de clivage,  $X_n$  correspond à un spacer de 0, 2, 4 ou 6 résidus d'acides aminés et le résidu situé directement en amont du site de clivage doit préférentiellement être une arginine). SKI-1 reconnait les résidus non-basiques en aval du motif  $RX(L/V/I)X\checkmark$  (où X correspond à tout résidu d'acide aminé autre que la cystéine ou la proline). Enfin, PCSK9 s'autoclive au niveau de sa séquence VFAQ $\checkmark$ , et suite à ce clivage ne possède plus d'activité protéasique mais plutôt la capacité de se lier à des récepteurs cellulaires spécifiques (Seidah et Prat, 2012).

## 3) Mécanismes d'activation des PCs

Avant d'être actives, les PCs subissent un certain nombre de modifications posttraductionnelles. La première modification a lieu de façon co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique où les zymogènes perdent leur peptide signal et sont Nglycosylées au niveau de plusieurs sites **(Figure 23)** (Seidah et Prat, 2012). Sous le contrôle de leur prosegment Nt, les précurseurs acquièrent leur structure tridimensionnelle, les rendant actives et capables d'autocliver leur prosegment lors d'une dernière étape de maturation. Ce clivage a lieu dans des compartiments spécifiques de la voie de sécrétion, comme le TGN pour la furine ou le TGN et la surface cellulaire pour PC5 et PACE4 (Seidah et al., 2012).



<u>Figure 23 :</u> Représentation schématique de la structure primaire des proprotéines convertases humaines. Les différents domaines, modifications post-traductionnelles des proprotéines convertases ainsi que les séquences consensus de clivage qu'elles reconnaissent, sont indiqués. Tiré de Seidah et Prat, 2012.

#### 4) Profil d'expression tissulaire et localisation subcellulaire des PCs

Les différentes PC présentent un profil d'expression tissulaire et de localisation subcellulaire distincts. Ces caractéristiques sont également importantes dans la sélectivité de ces protéases vis-à-vis de leurs substrats (Thomas, 2002).

Les PC1 et PC2 sont localisées majoritairement au niveau des vésicules de sécrétion immatures ou à corps dense, au niveau des systèmes nerveux et endocriniens. Elles sont impliquées dans la maturation protéolytique de la plupart des prohormones polypeptidiques **(Figure 24)** (Day et al., 1992 ; Malide et al., 1995).

La furine est transportée du TGN vers la surface cellulaire puis de la surface cellulaire vers la voie endosomale. De plus, la furine est exprimée de façon ubiquitaire **(Figure 24)** (Seidah et Prat, 2012).

PC4 présente un profil d'expression tissulaire bien spécifique puisqu'elle est exprimée uniquement au niveau des cellules germinales testiculaires chez l'homme et au niveau des ovaires et du placenta chez la femme. Au niveau de ces cellules, PC4 présente une localisation majoritairement membranaire **(Figure 24)** (Gyamera-Acheampong et Mbikay, 2009).

PC5 est exprimée de façon ubiquitaire et est exprimée suite à un mécanisme d'épissage alternatif de deux ARNm : PC5A qui code une protéine soluble de 913 résidus d'acides aminés et PC5B qui code une protéine membranaire à activité enzymatique de 1860 résidus d'acides aminés (Nakagawa et al., 1993 ; Seidah et al., 2008). De plus, elle est exprimée de façon quasiment ubiquitaire, comme PACE4 (Dong et al., 1995). Les deux PCs, sont retrouvées au niveau de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire après leur sécrétion **(Figure 24)** (Seidah et Prat, 2012).

PC7, la membre la plus ancestrale de la famille des proprotéines convertases, est exprimée de façon ubiquitaire (Seidah et al., 1996 ; Bruzzaniti et al., 1996). Une fraction de PC7 rejoint la membrane plasmique par une voie non conventionnelle qui n'a pas été caractérisée et comme PC5B, PC7 peut aussi retourner de la membrane plasmique vers le TGN **(Figure 24)** (Declercq et al., 2012).

SKI-1 est exprimée de façon ubiquitaire et est localisée au niveau du *cis*-Golgi et du Golgi-*médian* mais elle peut également être retrouvée de façon minoritaire au niveau des endosomes et des lysosomes **(Figure 24)** (Pullikotil et al., 2007).

PCSK9 est exprimée majoritairement au niveau du foie, de l'intestin et des reins chez l'Homme. Elle est retrouvée au niveau du TGN mais elle est majoritairement sécrétée dans le milieu extracellulaire sous la forme d'un complexe enzymatiquement inactif, composé de son prosegment ainsi que du domaine à activité enzymatique. En se liant au LDLR au niveau de la membrane plasmique, le complexe PCSK9-LDLR est adressé vers les lysosomes pour dégradation **(Figure 24)** (Poirier et al., 2009). PCSK9 fonctionne comme une chaperonne capable de diriger la protéine qu'elle transporte vers les lysosomes.

Proprotéine convertase	Distribution tissulaire	Localisation subcellulaire
PC1	Neuroendocrine	Granules de sécrétion
PC2		
Furine	Ubiquitaire	TGN, endosomes, surface
		cellulaire
PC4	Germinale	Surface cellulaire
PC5	Quasi-ubiquitaire	Surface cellulaire, MEC
PACE4	Quasi-ubiquitaire	Surface cellulaire, MEC
PC7	Ubiquitaire	TGN, endosomes, surface
		cellulaire
SKI-1	Ubiquitaire	cis-Golgi et Golgi-médian
PCSK9	Foie, intestin, reins	TGN, milieu extracellulaire

**Figure 24 : Tableau récapitulatif de la distribution tissulaire et de la localisation subcellulaire des différentes proprotéines convertases.** MEC : matrice extracellulaire ; TGN : Trans-golgi network ou réseau trans-golgien. Adapté de Seidah et Prat, 2012.

## 5) Spécificités et fonctions des PCs

Les données obtenues sur les PCs depuis une trentaine d'années ont permis de caractériser leur spécificité de substrats ainsi que leur fonction *in vitro* et *in vivo*. Toutes les PCs clivent leur substrat de façon calcium-dépendante (Seidah et Prat, 2012). Les PC1 et PC2 atteignent leur maximum d'activité au niveau des granules de sécrétion dont le pH est acide. Les autres PCs nécessitent un environnement neutre à légèrement acide pour être actives (Seidah et Prat, 2012). Également, une étude a mis en évidence la redondance en termes de clivage entre la furine, PC5 et PACE4 (Seidah et al., 2008).

Concernant PC1 et PC2, leur knock-out (KO) chez la souris semble de ne pas affecter la viabilité des animaux. En revanche, le double-KO de PC1/PC2 induit la mort au

cours de l'embryogenèse, suggérant une redondance de ces deux PCs (Seidah et Prat, 2012). Les souris KO pour PC1 présentent un retard de croissance et un nanisme prononcé probablement à cause d'un déficit en somatolibérine, dont le précurseur est clivé par PC1 au niveau du motif RARLSR<sub>73</sub> √QE (Dey et al., 2004 ; Posner et al., 2004). Les souris KO pour PC2 présentent quant à elles un retard de croissance, un faible niveau de glucagon circulant ainsi qu'une hypoglycémie (Furuta et al., 2001). Ces souris présentent également un défaut de maturation de certains précurseurs hormonaux comme la dynorphine, la neurotensine, la nociceptine ou encore la somatostatine (Seidah et Prat, 2012). Chez l'Homme des déficits en PC1 ont été rapportés et induisent une obésité néonatale sévère, une homéostasie du glucose anormale et une infertilité d'origine hypothalamique, en partie expliquées par un niveau bas d'insuline et d'hormone corticotrope circulants (Jackson et al., 1997). Ceci illustre le rôle de PC1 et de PC2 dans la maturation protéolytique des hormones produites au niveau du système nerveux.

Concernant la furine, son KO en modèle murin induit une mort au jour embryonnaire 11 à cause d'insuffisances hémodynamiques et d'un défaut de fermeture des cavités cardiaques ventrales (Roebroek et al., 1998). Ce phénotype pourrait être expliqué par un défaut de maturation protéolytique du facteur de croissance Lefty et de BMP10 (Bone Morphogenetic Protein 10), un facteur impliqué dans la morphogenèse cardiaque (Constam et Robertson, 2000 ; Susan-Resiga et al., 2011). De manière complémentaire, la furine est impliquée dans la maturation protéolytique des chaines  $\alpha$ des intégrines, des protéines transmembranaires impliquées dans la liaison au cytosquelette et de ce fait dans le maintien de la morphologie cellulaire et tissulaire. Notamment, il a été montré que la furine est impliquée dans le clivage des intégrines  $\alpha$ 4 et  $\alpha$ V, pouvant expliquer également les phénotypes observés (Lehmann et al., 1996).

Concernant PC4, son KO en modèle murin induit une altération sévère de la fertilité probablement à cause du défaut de maturation protéolytique et d'activation des métalloprotéinases de type ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) (Basak et al., 2004). PC4 est également impliqué dans la maturation protéolytique de l'IGF2 (Insulin Growth Factor 2), notamment, au niveau du placenta (Qiu et al., 2005). Ces données soulignent le rôle important de PC4 dans la fertilité et la gestation.

Concernant PC5, son KO en modèle murin induit le décès à la naissance des nouveau-nés, qui présentent une absence de rein, des vertèbres extra-thoraciques et extra-lombaires ainsi qu'une absence de queue (Szumska et al., 2008). Ce phénotype est semblable à celui observé chez des souris KO pour le facteur de croissance GDF11 (Growth Differentiation Factor 11), un substrat de PC5, clivé au niveau du motif RSRR<sub>296</sub>  $\checkmark$ NL, indiquant que c'est probablement l'absence de clivage de GDF11 par PC5 qui est responsable du phénotype observé (Essalmani et al., 2008). Ces résultats indiquent que PC5 est impliqué dans l'établissement de la symétrie antéro-postérieure, le développement du squelette et le développement rénal (Seidah et Prat, 2012).

Concernant PACE4, son KO en modèle murin induit une mort embryonnaire au jour 14 à cause de sévères malformations cardiaques, des défauts dans l'axe droite-gauche et dans le développement osseux (Constam et Robertson, 2000). Ces phénotypes pourraient être expliqués par l'absence de maturation protéolytique des facteurs Nodal et Lefty, qui sont impliqués dans l'établissement de l'axe droite-gauche notamment. Ceci souligne l'importance de PACE4 dans de nombreux processus de développement comme le développement cardiaque ou l'établissement de l'axe droite-gauche à travers la maturation protéolytique de facteurs de croissance.

Le KO de PC7 en modèle murin n'affecte pas la viabilité et l'état de santé général des souris. Néanmoins, la perte de PC7 induit une perte d'anxiété importante impliquant l'amygdale cérébrale et une dérégulation de l'hippocampe. Indépendamment de ce phénotype, le substrat de PC7 le mieux caractérisé est le récepteur à la transferrine 1 (ou CD71), indiquant un rôle important de PC7 dans l'homéostasie du fer. De plus, l'ARNm de PC7 est exprimé dans de nombreux tissus et types cellulaires, suggérant un rôle physiologique étendu de PC7 pour l'heure mal caractérisé (Seidah et Prat, 2012).

Le KO de SKI-1 en modèle murin induit une mort embryonnaire précoce, au stade blastocyste, avec l'absence de formation d'embryoblaste (Mitchell et al., 2001). De même, la diminution de l'expression de SKI-1 chez le poisson zèbre par interférence ARN est létale et associée à une désorganisation des chondrocytes, soulignant le rôle de SKI-1 dans la formation du cartilage (Schlombs et al., 2003). De plus, des études chez la souris ont montré l'implication de SKI-1 dans le métabolisme des acides gras et dans la régulation du cholestérol et des triglycérides. Parmi les substrats de SKI-1 les plus caractérisés sont les protéines SREBP et CREB notamment. Ces protéines sont impliquées dans la régulation du métabolisme des acides gras et dans la régulation de l'expression génique, notamment (Seidah et Prat, 2012).

Enfin, le KO de PCSK9 en modèle murin n'est pas léthal, il est associé à une perte de sa capacité à se lier à ses substrats comme le LDLR (Low Density Lipoprotein

Receptor), le VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor ou récepteur aux lipoprotéines de très basse densité en français) ou LRP8 (LDLR-related protein 8). Ceci induit une augmentation du niveau de LDLR détecté dans le foie des souris ainsi qu'à une diminution du cholestérol circulant (Seidah et Prat, 2012). Chez l'Homme, des mutations gain-de-fonction dans la séquence codante de PCSK9 ont été identifiées chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie autosomale dominante, résultant en une capacité accrue de PCSK9 de promouvoir la dégradation du LDLR (Abifadel et al., 2003 ; Benjannet et al., 2004). Ces données illustrent le rôle central de la PCSK9 dans l'hypercholestérolémie et suggèrent que son ciblage représente une stratégie viable afin de lutter contre ce problème majeur de santé publique et de prévenir certaines maladies cardiovasculaires (Seidah et Prat, 2012).

#### Proprotéines convertases et infections virales

Les PCs sont impliquées dans la maturation protéolytique post-traductionnelle et dans la régulation des protéines sécrétées. En ce sens, des mutations ou une activité protéolytique aberrante de ces protéases sont associées à de nombreux processus pathologiques comme des cancers, des troubles cardiovasculaires ou des maladies autoimmunes. Par là même, un certain nombre d'agents pathogènes bactériens ou viraux notamment, exploitent les protéases cellulaires dont les PCs pour le clivage ou la maturation de leurs protéines. Les PCs peuvent être impliquées au niveau extracellulaire dans l'entrée virale et la sortie des virions de la cellule infectée ou au niveau intracellulaire dans la morphogenèse des particules virales et la maturation des glycoprotéines sécrétées (Izaguirre, 2019 ; Seidah et al., 2021). L'ensemble des données présentes dans la littérature montrent que la furine est la PC la plus exploitée par les virus à ARN simple brin de polarité positive ou négative.

Par exemple, la glycoprotéine S (pour Spike) des hCoV hautement pathogènes SARS-CoV et SARS-CoV-2 est un substrat bien caractérisé de la furine. Au niveau de la particule virale mature, la protéine S est composée de deux sous-unités associées de façon non-covalentes : la sous-unité S1 qui se lie au récepteur cellulaire ACE2 grâce à son domaine RBD (Receptor Binding Domain ou domaine de liaison au récepteur en français) et la sous-unité S2 qui est impliquée dans l'ancrage membranaire de la protéine. Le domaine S2 comprend également un peptide de fusion important pour la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de l'hôte au cours d'une nouvelle infection

(Jackson et al., 2022). Chez le SARS-CoV-2, le clivage de la protéine S par la furine a lieu dans un premier temps au cours de l'entrée lorsque la protéine se fixe sur le récepteur ACE2. Ce clivage a lieu au niveau de la jonction S1-S2 et sert d'étape dite de « préactivation » de la protéine S avant la fusion membranaire. Néanmoins, l'abolition de ce clivage, en mutant par exemple le site S1-S2, n'inhibe pas l'entrée virale de façon totale (Shang et al., 2020). De plus, au niveau intracellulaire, la protéine S de pleine longueur subit également un clivage par la furine afin de générer les domaines S1 et S2 au niveau des compartiments de la voie de sécrétion (Jackson et al., 2022). Une étude a mis en évidence que l'inhibition de la furine au niveau intracellulaire par des inhibiteurs pharmacologiques bloquait la production virale ainsi que les effets cytopathiques associés comme la formation de syncitia. Ces résultats mettent en évidence le rôle primordial de la furine intracellulaire dans le clivage de la protéine S pour l'infectiosité virale (Chen et al., 2020). Le même type de mécanisme a lieu pour les glycoprotéines impliquées dans l'entrée du VIH-1 et du virus de la grippe (Jackson et al., 2022). L'enveloppe des Flavivirus nécessite également un clivage par la furine pour être activée. Leur protéine de surface est composée d'un hétérodimère composé de la protéine E et du précurseur de la protéine M (prM). La furine est impliquée dans le clivage du prM au niveau des phases tardives du cycle infectieux, avant que la particule ne quitte la cellule hôte. Ce clivage est nécessaire pour l'infectiosité du TBEV (Tick Borne Encephalitis Virus ou virus de l'encéphalite à tique en français), et dans une moindre mesure à l'infectiosité du DENV (Seidah et al., 2021).

Deux autres PCs ont également montré leur implication dans la maturation de protéines virales : SKI-1 et PCSK9. Concernant SKI-1, elle est impliquée dans la maturation protéolytique des précurseurs des glycoprotéines de surface (GP-C) des Arenavirus, et particulièrement du virus de Lassa (LASV) et du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), au niveau des sites RRLL  $\checkmark$ GT et RRLA  $\checkmark$ GT, respectivement (Lenz et al., 2001 ; Burri et al., 2012). Ces clivages permettent de générer les formes matures de ces glycoprotéines. L'inhibition de ce clivage affecte drastiquement la production virale dans ces modèles viraux, illustrant le rôle primordial de SKI-1 dans l'infectiosité de ces virus (Seidah et al., 2021). Enfin, concernant PCSK9, qui ne possède pas d'activité protéasique, son activité vis-à-vis de protéines virales n'a pour l'heure été décrite que de façon indirecte. Par exemple, PSCK9 dans le contexte de l'infection par le HCV de génotype 2a/clone JFH1 impacte négativement la production virale, probablement à cause de la diminution de la quantité de LDLR, qui est un facteur d'entrée du HCV, détectables à la

surface cellulaire. En ce sens, il a été démontré que le virus induisait une augmentation de l'expression du LDLR et une diminution de l'expression de PCSK9 dans le foie de patients infectés chroniquement (Syed et al., 2014 ; Li et Liu, 2018). Le rôle de PCSK9 dans le cadre d'infections semble donc être indirect mais mérite d'être étudié plus en détails.

## Inhibiteurs de proprotéines convertases et potentiel antiviral

Le lien existant entre PCs et virus a été discuté précédemment et ont permis de mettre en évidence le rôle proviral des PCs et notamment de la furine et de SKI-1. En ce sens, leur inhibition représenterait une stratégie antivirale prometteuse. Par contre, le rôle de PCSK9 dans le contexte d'une infection virale semble indirect et est mal caractérisé. De ce fait, bien que de nombreux inhibiteurs de PCSK9 aient été développés (Liu, Cells, 2022), cibler cette PC dans un contexte infectieux n'est pas une approche qui ait été développée à ce jour.

## 1) Agents protéiques

Les agents protéiques capables d'inhiber la furine et SKI-1 peuvent être divisés en trois classes distinctes : les  $\alpha$ 1-antitrypsines, les variants d' $\alpha$ 2-macroglobulines et les prosegments de PCs. Cette approche agit de façon compétitive vis-à-vis des substrats des PCs correspondantes.

L' $\alpha$ 1-antitrypsine est un inhibiteur de 494 résidus d'acides aminés de l'élastase des neutrophiles. Comme les autres serpines, l' $\alpha$ 1-antitrypsine agit en piégeant l'enzyme dans un complexe stable au niveau de son site actif qui forme une boucle (RSL : Reactive Site Loop en anglais), empêchant son activité. L' $\alpha$ 1-antitrypsine a été modifiée au niveau de son RSL afin de cibler certaines PCs dont la furine, et SKI-1 pour donner l' $\alpha$ 1-PDX et l' $\alpha$ 1AT-RRVL, respectivement (Anderson et al., 1993). Plus tard, un nouveau variant de l' $\alpha$ 1-antitrypsine présentant une meilleure sélectivité vis-à-vis de la furine *in vitro* et *ex vivo* a été développé, appelé AVNR. Il a été montré que cet inhibiteur n'affecte pas les autres PCs comme PACE4, PC5 ou PC7 (Pasquato et al., 2013). Les variants d' $\alpha$ 1antitrypsine ont montré leur efficacité dans l'inhibition de la maturation protéolytique de la gp160 du VIH et des glycoprotéines des virus Ebola et Marburg notamment (Pasquato et al., 2013). Néanmoins, une étude a montré qu'au cours du temps, dans le contexte d'une infection par le VIH, le variant d' $\alpha$ 1-antitrypsine utilisé était dégradé par la cellule hôte (Bahbouhi et al., 2001). L'utilisation de ces variants étaient basée sur la stabilité de ceuxci ainsi que de leur effet supposé, ils ont de ce fait été de moins en moins utilisés.

L' $\alpha$ 2-microglobuline est une glycoprotéine homotétramérique de 1474 résidus d'acides aminés qui contient une liaison S-ester qui lui confère la capacité d'inhiber toutes les classes de protéases (Kan et al., 1985). Cette glycoprotéine est également caractérisée par la présence d'un peptide flexible qui inclut le site de clivage des protéases qu'il inhibe. Un site multibasique spécifique de la furine a été inséré au niveau de ce peptide de générer un inhibiteur de la furine, la FUR- $\alpha$ 2-microglobuline. De manière intéressante, des études ont montré la spécificité de cet inhibiteur et sa capacité à inhiber le clivage de substrats de la furine, comme la gp160 du VIH (Pasquato et al., 2013).

La dernière classe d'inhibiteurs protéiques des PCs est basée sur l'expression intracellulaire de prepro-segments (ppPC) de PCs, afin d'inhiber la PC correspondante. Par exemple, les inhibiteurs ppFurine et ppPC7 ont montré leur capacité à inhiber la maturation protéolytique de la gp160 du VIH avec une moins bonne efficacité tout de même pour ppPC7 (Pasquato et al., 2013).

### 2) Agents peptidiques

Les chlorométhylkétones décanoylées couplées à un peptide (cmk) représentent les inhibiteurs peptidiques de PCs les mieux caractérisés. Ils ont été développés au début des années 90 (Hallenberger et al., 1992). Les cmk contiennent un domaine peptidique qui mime le motif reconnu par la furine et les PCs apparentés, lié au niveau Ct à une chlorométhykétone. Quand le clivage a lieu, l'inhibiteur bloque la réaction d'alkylation de l'histidine du site actif de la furine, la rendant inactive de façon irréversible (Braun et Sauter, 2019). Le cmk le mieux caractérisé est le dec-RVKR-cmk. Cet inhibiteur a montré sa capacité à inhiber *in vitro* toutes les PCs de type Kexin-like **(Figure 23)** ainsi qu'à prévenir la maturation protéolytique de la gp160 du VIH ou de la p62 du virus du Chikungunya (Hallenberger et al., 1992 ; Ozden et al., 2008) associée à une diminution de la production virale. Néanmoins, cette molécule ne peut pas être utilisée comme agent thérapeutique du fait de son instabilité, de son IC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire, sa toxicité relative *in vivo* et son manque de spécificité.

Également, les polyarginines sont des inhibiteurs de furine bien caractérisés, actifs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. L'hexa-D-arginine (D6R), composé de six arginines en orientation D, est le polyarginine le plus largement utilisé et agit en tant que compétiteur des substrats de la furine. A des concentrations bien plus élevées, cette molécule est également capable d'inhiber d'autres PCs de type Kexin-like. Les polyarginines semblent inhiber la furine au niveau de la surface cellulaire et ne pas entrer dans les cellules. Le D6R a montré sa capacité à inhiber la maturation protéolytique de la gp160 du VIH ainsi que la production de particules virales infectieuses (Kibler et al., 2004).

#### 3) Petites molécules inhibitrices

Les protéines et peptides inhibiteurs ayant été les inhibiteurs les plus développés, peu de molécules inhibitrices ont été développées et peu de données sont disponibles quant à leur efficacité. Plusieurs petites molécules capables d'inhiber la furine ont été décrites dans la littérature. Ces molécules peuvent être de synthèse ou naturelles.

Le SSM3 trifluoroacétate est un inhibiteur de synthèse dérivant de la 2,5dideoxystreptamine qui possède *in vitro* une EC<sub>50</sub> vis-à-vis de la furine de 54nM (Jiao et al., 2006). L'EC<sub>50</sub> est la concentration efficace permettant d'inhiber 50% du phénomène/mécanisme ciblé. Ce composé synthétique a initialement montré sa capacité à protéger des macrophages humains *in vitro* et *in vivo* de la bactérie responsable de l'anthrax dont l'antigène responsable de la pathologie est clivé par la furine (Remacle et al., 2010). Pour l'heure, aucune étude n'a permis de démontrer le potentiel antiviral de ce composé. Un autre type d'inhibiteurs de synthèse a montré sa capacité à inhiber la furine, il s'agit des guanylhydrazones. Une étude a montré que ces composés étaient capables d'inhiber la furine en conformation OFF (conformation adoptée en absence de substrat) en se fixant de manière compétitive au niveau de son site actif (Dahms et al., 2021). Pour l'heure, aucune étude n'a permis de démontrer le potentiel antiviral de ce

En plus des composés synthétiques, des molécules naturelles ont montré leur capacité inhibitrice vis-à-vis de la furine. Par exemple, des inhibiteurs de furine ont été extraits de la plante herbacée *Andrographis paniculata* et nommés « Ester succinoylés d'andrographolide » (ESA en français ou SEA pour succinoyl esters of andrographolide en anglais). Ces molécules ont montré *in vitro* leur capacité à inhiber la furine à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Basak et al., 2006). Des études ont montré le potentiel antiviral de ces molécules vis-à-vis de l'infection par le VIH, en inhibant la maturation protéolytique de la gp160, mais également par le virus de la grippe H1N1

(Basak et al., 2006 ; Ko et Chiou, 2006). Les fucoïdanes, une autre classe d'inhibiteurs naturel de la furine, ont été extraits de plusieurs espèces végétales comme *Laminaria japonica* ou *Undaria pinnatifida*. Ces polysaccharides sulfatés à longue chaine agissent comme compétiteur des substrats de la furine et ont d'ores et déjà montré leur potentiel thérapeutique en tant qu'anti-coagulants, antioxydants, anticancéreux ou encore antithrombotiques notamment (Luthuli et al., 2019). Plus récemment, ces molécules ont montré un potentiel antiviral vis-à-vis des hCoV OC43 et SARS-CoV-2, en inhibant l'entrée virale et donc la production de particules virales (Yang et al., 2023).

Concernant SKI-1, un seul inhibiteur spécifique a été décrit, il s'agit du composé PF-429242. Ce composé est un inhibiteur de type aminopyrrolidineamide dont l'action est réversible. Il a été découvert par Pfizer et a montré sa capacité à inhiber la maturation de nombreux substrats cellulaires de SKI-1 comme le facteur de transcription SREBP, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Hay et al., 2007). Des études ont également mis en évidence une activité antivirale de ce composé vis-à-vis des infections par le LASV et le LCMV en bloquant la maturation protéolytique SKI-1-dépendante de leur glycoprotéine et la production de nouvelles particules virales, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Urata et al., 2011 ; Pasquato et al., 2012).

## c) Les protéases intramembranaires

Plusieurs classes de protéases intramembranaires (i-CLIPs) ont été décrites : les protéases à sérine, à aspartate, à glutamate et des métalloprotéases. Ici, seules les i-CLIPs à aspartate seront décrites par soucis de concision. De plus, elle constitue la seule classe d'intérêt pour le projet développé dans le cadre de l'infection par le HEV. En ce sens, l'abréviation « i-CLIPs » désigne ici les protéases intramembranaires à aspartate et non la famille des protéases intramembranaires au sens large.

### Généralités chez les eucaryotes

### 1) Découverte des i-CLIPs

Les i-CLIPs ont été découvertes au début des années 2000 avec la recherche sur la maladie d'Alzheimer (ou AD pour Alzheimer Disease en anglais), qui constitue la première cause de démence dans le monde. La possibilité qu'un phénomène de protéolyse puisse avoir lieu dans l'environnement hydrophobe que constituent les membranes cellulaires paraissait peu probable. Cette hypothèse a été émise en 1996 par le Pr Dennis J. Selkoe. Il suggérait que la *y*-sécrétase pourrait être responsable de la formation des peptides amyloïdes à partir de leur précurseur (Selkoe, 1996). La preuve expérimentale de l'existence de ce mécanisme a été obtenu en 2000 avec l'identification préalable de mutations présentes dans les formes familiales d'AD qui ont conduit à l'identification de deux protéines transmembranaires la préséniline-1 (PS1) et la préséniline-2 (PS2) (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). Le rôle de ces protéines est resté inconnu quelques années avant que leur importance pour le clivage du précurseur amyloïde et de la protéine Notch ne soit mise en évidence (De Strooper et al., 1998 ; De Strooper et al., 1999). Des expériences de mutagenèse dirigée couplées à l'utilisation de peptidomimétiques a permis de mettre en évidence leur activité de protéase à aspartate (Wolfe et al., 1999). Plus tard, plusieurs équipes ont mis en évidence que la PS appartenait à un macro-complexe, la  $\gamma$ -sécrétase, dont elle était la sous-unité catalytique, et qu'elle était associée à d'autres protéines qui servent de co-facteurs : PEN-2 (pour presenilin enhancer-2), APH-1 (pour Anterior Pharynx Defective-1) et la nicastrine (NCT) (Figure 25A) (Yu et al., 2000; Steiner et al., 2002; Lee et al., 2002). Le rôle de ces protéines a été mis en évidence plus tardivement. PEN-2 est une protéine à deux domaines transmembranaires nécessaire pour l'endoprotéolyse de la PS et dans la stabilisation de celle-ci (Prokop et al., 2004 ; Holmes et al., 2014). APH-1 est composée de sept domaines transmembranaires et possède un motif GxxxG qui permet de connecter la NCT à la PS (Lee et al., 2004 ; Niimura et al., 2005). Enfin, la NCT est une protéine à simple domaine transmembranaire possédant un long ectodomaine hautement glycosylé. Elle est responsable de la reconnaissance et de la sélectivité de la PS vis à vis du substrat (Zhang et al., 2005; Shah et al., 2005).

Parmi les autres membres des i-CLIPs, la famille de la SPP (Signal Peptide Peptidase), initialement appelée « homologues de la PS », a été mise en évidence par des

approches bioinformatiques (Ponting et al., 2002). La découverte expérimentale de cette famille et plus précisément de la SPP, a été possible grâce à des approches mêlant la chimie et la biologie comme l'utilisation de sondes chimiques. Deux ans avant leur identification, l'équipe du Pr B. Martoglio avait émis l'hypothèse de l'existence d'une protéase capable de cliver les peptides signaux après qu'ils aient été préalablement clivés des protéines qui les contenaient. Dans ce travail, ils ont montré en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques que ceux-ci pouvaient inhiber l'activité de la SPP sans affecter le clivage du peptide signal sur la protéine, suggérant que ces mécanismes faisaient intervenir deux protéases différentes (Weihofen et al., 2000). Bien que la SPP n'ait pas encore été formellement identifiée, les chercheurs avaient émis l'hypothèse qu'une nouvelle i-CLIP était impliquée dans ce processus. Plus tard, à l'aide d'approches de photo-cross-linking, d'enrichissement à la biotine et de spectrométrie de masse, le même laboratoire a pu formellement identifier la SPP, une nouvelle protéine dont les fonctions précises n'ont pas encore été identifiées (Weihofen et al., 2002). La caractérisation de la SPP a permis de mettre en évidence un site catalytique typique des protéases à aspartate, semblable à celui de la PS. D'autres protéases semblables à la SPP, appelées SPP-like (Figure 25B), ont été découvertes plus tard mais ne seront pas d'intérêt dans le cadre de ces travaux de thèse. Toutes fonctionnent seules et ne sont pas incorporées au sein d'un macro-complexe, contrairement à la PS.





### 2) Activité enzymatique

Les i-CLIPs sont des protéines à neuf domaines transmembranaires qui partagent la caractéristique commune de présenter deux sites catalytiques conservés : le site de type CxGD au niveau du domaine transmembranaire 6 (ou TM6), avec notamment l'aspartate en position 162 (Asp162) et le site de type xYDxx au niveau du TM7 avec l'aspartate 220 (Asp220) (où x est n'importe quel résidu d'acide aminé hydrophobe) (Papadopoulou et Fluhrer, 2020). Les substrats des i-CLIPs se trouvent au niveau des plans membranaires, ce qui suggère un mécanisme de clivage complexe du fait de la faible accessibilité du site catalytique de l'enzyme pour le substrat. En ce sens, la structure tridimensionnelle du site catalytique des i-CLIPs et notamment de la PS et de la SPP, a été résolue (Li et al., 2013). La réaction de clivage nécessite que les deux résidus d'aspartate soient proches à une distance environ égale celle d'une liaison hydrogène (environ 2 Å). En l'absence de substrat, les deux résidus sont espacés de 6,7Å soit bien plus qu'une liaison hydrogène (Figure 26A). Ceci suggère qu'une transition conformationnelle a lieu en présence des substrats afin de rendre la protéase active. Ceci permet également de limiter les réactions de clivages aspécifiques. Par là même, la fixation du substrat au niveau du site catalytique de l'enzyme permet de stabiliser la conformation active de la protéase (Li et al., 2013). Une étude a mis en évidence la « voie d'entrée » des substrats au niveau de la protéase. Le substrat accèderait au site catalytique entre les TM6 et TM9, le TM9 ayant été décrit comme le domaine responsable de la liaison au substrat chez la PS notamment (Figure **26B)** (Kornilova et al., 2005). Ce domaine est composé d'un motif PAL conservé, capable de se lier au niveau des feuillets  $\beta$  du substrat (Zhou et al., 2019). Également, la réaction de clivage de la liaison peptidique nécessite de l'eau. Chez les i-CLIPs, l'accès des molécules d'eau au site catalytique n'est soumis à aucune contrainte grâce à la présence d'une cavité dédiée au solvent qui est ouverte et qui fait face au cytoplasme de la cellule.

La PS et la SPP participent toutes les deux à un processus de clivage protéolytique en deux étapes, appelé protéolyse intramembranaire régulée (ou RIP pour Regulated Intramembrane Proteolysis, en anglais). Dans un premier temps, le domaine luminal ou l'ectodomaine d'une protéine à simple domaine transmembranaire est libéré par un mécanisme de shedding ou alors une boucle entre deux domaines transmembranaires est coupée. De ce clivage résulte la production d'une protéine avec un ectodomaine ou un domaine luminal plus court, qui reste ancré dans les membranes cellulaires. La seconde étape de ce processus de RIP est catalysée par une i-CLIP qui hydrolyse une liaison peptidique au niveau de son substrat afin de libérer un peptide extracellulaire/luminal et un peptide intracellulaire (ou ICD) au niveau du cytosol (Lichtenthaler et al., 2011).



**Figure 26 : Structure tridimensionnelle du site catalytique des i-CLIPs.** (A) La conformation du site catalytique de la préséniline et de la SPP (ici PSH pour *Presenilin homolog*) est mis en évidence en vert. A titre comparatif, la conformation du site catalytique de la pepsine (en gris), une autre i-CLIPs non apparentée à la PS ou à la SPP dont les résidus d'asparagine constituant le site catalytique sont distants de l'équivalent d'une liaison hydrogène (3Å ici). Chaque sphère rouge représente une molécule d'eau, présente au niveau de la pepsine. (B) Conformation tridimensionnelle du site catalytique et des différents domaines de la préséniline et de la SPP. Tiré de Li et al., 2013.

# 3) Mécanisme d'activation

La PS et la SPP nécessitent toutes les deux un mécanisme de clivage endoprotéolytique pour être actives.

Concernant la PS, il est admis que la forme entière est un zymogène qui est activé par un clivage endoprotéolytique entre les TM6 et TM7 pour générer un hétérodimère composé du NTF (fragment Nt) et du CTF (fragment Ct). Ce clivage serait réalisé par une présénilinase. Dès 1999, il a été proposé que cette activité présénilinase serait portée par une protéase à aspartate et plus particulièrement par la PS elle-même. Une étude a même montré que la mutation du site catalytique de la PS abolissait non seulement l'activité  $\gamma$ sécrétase mais également la maturation de la PS (Wolfe et al., 1999). La PS présente donc la capacité de s'auto-cliver pour être active au sein du complexe  $\gamma$ -sécrétase. La PS de pleine longueur est rapidement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome, là où les NTF et CTF, intégrés au macrocomplexe sont beaucoup plus stables (Steiner et al., 1998). Ce mécanisme d'autoprotéolyse permettrait donc de réguler l'activation ainsi que la stabilité de la PS au sein du complexe γ-sécrétase.

Concernant la SPP, son activation ne nécessite pas de processus de maturation particulier et ne fait pas intervenir de phénomène d'autoprotéolyse comme décrit pour la PS (Voss et al., 2013). De plus, la surexpression ou l'expression exogène de la SPP *in vitro* induit une augmentation de la maturation protéolytique de ses substrats (Schrul et al., 2010). Ceci indique que la SPP est enzymatiquement active sous la forme de monomère (et de multimères) ou que ses cofacteurs potentiels sont abondants dans la cellule. Il semblerait que ce soit la localisation subcellulaire de la SPP qui soit importante pour son activité et notamment pour la sélectivité vis-à-vis de ses substrats.

## 4) Profil d'expression tissulaire et localisation subcellulaire

Les deux isoformes de la préséniline, PS1 et PS2 présentent une homologie de séquence de 67% et peuvent être intégrées de la même façon au complexe  $\gamma$ -sécrétase. Bien qu'elles clivent les mêmes substrats (Yonemura et al., 2011), les macrocomplexes  $\gamma$ -sécrétase ayant intégré PS1 présentent une meilleure affinité pour le précurseur amyloïde et présentent une localisation subcellulaire différente. En effet, les complexes PS1 sont localisés majoritairement au niveau de la membrane plasmique mais également au niveau

des membranes de la voie de sécrétion (Golgi et post-Golgi) et du compartiment endosomal (endosomes précoces et de recyclage). Les macrocomplexes γ-sécrétase intégrant PS2 sont retrouvés majoritairement au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes mais également au niveau des membranes de la voie de sécrétion (TGN) et de

la surface cellulaire (Meckler et al., 2016; Sannerud et al., 2016). Au cours du développement embryonnaire, la PS2 est exprimée plus tardivement que la PS1 (Lee et

al., 1996). Dans les deux cas, les macrocomplexes se forment dans le réticulum endoplasmique avant de rejoindre l'appareil de Golgi où la préséniline et la nicastrine sont maturées. La plupart des complexes formés restent inactif dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi et la minorité de complexe actifs sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique et du compartiment endosomal (Johnson et al., 2017).

Au niveau tissulaire, la PS1 est exprimée de façon ubiquitaire mais est moins exprimée dans le foie. La PS2 est quant à elle faiblement exprimée au niveau du système nerveux et du foie mais l'est beaucoup plus dans les tissus périphériques (reins, muscle, cœur, poumons, etc) et de façon plutôt homogène (Lee et al., 1996).

La SPP est retrouvée majoritairement au niveau de la voie de sécrétion cellulaire et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (RE). En effet, elle possède un motif de rétention au niveau du RE caractéristique, de type KKXX (où X est n'importe quel résidu d'acide aminé) (Weihofen et al., 2002). Au niveau tissulaire, la SPP présente une distribution ubiquitaire (Mentrup et al., 2017).

## 5) Spécificités et fonctions

Les données obtenues sur les i-CLIPs, et plus particulièrement sur la PS et la SPP, depuis leur identification ont permis de caractériser leur spécificité de substrats ainsi que leur fonction *in vitro* et *in vivo*.

Une des différences majeures entre la PS et la SPP est leur topologie inversée. En effet, l'extrémité Nt de la PS est cytosolique alors que l'extrémité Nt de la SPP est extracellulaire/luminale (Figure 25) (Friedmann et al., 2004 ; Nyborg et al., 2004), indiquant que leurs sites catalytiques présentent une orientation inverse. Cet aspect est important pour la reconnaissance de leurs substrats respectifs. En effet, la PS clive uniquement les protéines transmembranaires de type I, dont l'extrémité Nt se trouve au niveau extracellulaire/luminal (Figure 25A). La SPP clive uniquement les protéines transmembranaires de type I, dont l'extrémité Nt se trouve au niveau extracellulaire/luminal (Figure 25A). La SPP clive uniquement les protéines transmembranaires de type II, dont l'extrémité Nt se trouve au niveau cytosolique (Figure 25B) (Papadopoulou et Fluhrer, 2020). Dans les deux cas, aucune séquence consensus de clivage particulière n'est reconnue (Papadopoulou et Fluhrer, 2020).

Concernant la PS, le KO de PS1 chez la souris induit une mort à la naissance avec des défauts de morphogenèse du squelette, une hémorragie de l'ère frontale du système nerveux à cause de la perte d'un certain nombre de cellules. Le KO de PS2 seul, ou le KO de PS2 associé la perte d'une copie de PS1, n'affecte pas la viabilité des souris et les souris présentent un phénotype normal. En revanche, la perte d'une copie de PS2 associée au KO de PS1 exacerbe significativement le phénotype associé à la perte de PS1. En effet, ces embryons meurent entre les jours embryonnaires 9,5 et 13,5 de défauts pléiotropes. Le KO total de PS1 et de PS2, aboutit à un phénotype complexe et à la mort des embryons avant le jour embryonnaire 9,5 (Donoviel et al., 1999). Ces observations montrent que PS1 et PS2 ont des fonctions différentes mais aussi en partie redondantes (Lessard et al., 2019). Un certain nombre de substrats de la PS ont été identifiés comme le précurseur amyloïde- $\beta$  (APP), la protéine Notch ou la E-cadhérine (Haapsalo et Kovacs, 2011). A $\beta$ PP est une protéine transmembranaire de type I qui joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire, le transport protéique, la formation des synapses et la neuroprotection notamment (Figure 26A) (Haapsalo et Kovacs, 2011). APP est clivé par la  $\beta$ -sécrétase (ou BACE1 pour Beta-site APP cleaving enzyme 1) pour générer un fragment Nt soluble APPs $\beta$ et un fragment Ct ancré dans la membrane endosomale, C99. C99 est ensuite clivé par la PS pour générer un polypeptide luminal AICD (APP intracellular domain) et le peptide A $\beta$ au niveau cytosolique (Figure 27A). Les peptides A $\beta$  peuvent faire entre 38 et 43 résidus d'acides aminés. Parmi les différentes espèces de A $\beta$ , les A $\beta_{42}$  et A $\beta_{43}$  possèdent la capacité de s'auto-agréger facilement et sont responsables de la maladie d'Alzheimer notamment, alors que les A $\beta_{40}$  sont plus bénins (Zhao et al., 2020). D'autres substrats de la PS ont été identifiés et bien caractérisés, comme la protéine Notch (Figure 27B) (Bray, 2006). La protéine Notch est une protéine transmembranaire à large région extracellulaire composée majoritairement de domaines de type EGF-like. La liaison du ligand Jagged (ou Delta/Serrate chez C. elegans) au récepteur Notch induit une succession de deux clivages protéolytiques. Le premier est catalysé par la métalloprotéase ADAM10 et a lieu du niveau du motif S2. Le second est catalysé par la PS au niveau du motif S3 et permet générer le NICD (Notch IntraCellular Domain) qui sera libéré au niveau cytosolique. Le NICD va ensuite être importé dans le noyau de la cellule afin d'agir comme régulateur transcriptionnel en interagissant avec CSL (CBF-1/RBPJ- $\kappa$  in Homo sapiens and Mus musculus respectively, Suppressor of Hairless in Drosophila melanogaster and Lag-1 in *Caenorhabditis elegans*) afin de recruter d'autres facteurs de transcription (Figure 27B). Notch est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et développementaux mais est également considéré comme facteur pro-tumoral (Bray et al., 2006). Par exemple, des mutations dans Notch induisant son activation sont retrouvées dans plus de 50% des leucémies lymphoblastiques aigues à cellules T (Weng et al., 2004).



**Figure 27 : Processus de clivage des substrats connus de la**  $\gamma$ **-sécrétase, le précurseur amyloïde et Notch.** (A) Séquence de clivage successif du précurseur amyloïde APP par la  $\beta$ -sécrétase (BACE1) puis par la  $\gamma$ -sécrétase afin de générer plusieurs peptides amyloïdes (A $\beta$  et AICD). AICD = APP intracellular domain. (B) Séquence de clivage successif de la protéine Notch par ADAM10 ou TACE puis par la  $\gamma$ -sécrétase afin de libérer le NICD (Notch IntraCellular Domain). NICD = Notch IntraCellular Domain; CSL = CBF-1/RBPJ- $\kappa$  in *Homo sapiens* and *Mus musculus* respectively, Suppressor of Hairless in *Drosophila* melanogaster and Lag-1 in *Caenorhabditis elegans*; Mam = Mastermind; Co-R = Co-Repressors. Adapté de Zhao et al., 2020 et de Bray, 2006.

Concernant la SPP, son KO en modèle murin induit une mortalité peu après le jour embryonnaire 13,5. Néanmoins, aucun défaut histologique n'a été observé chez ces embryons (Aizawa et al., 2016). Le même type d'observation a été réalisé chez d'autres organismes modèles comme la drosophile ou *C. elegans* (Mentrup et al., 2017). Ceci pourrait être expliqué par une incapacité à dégrader les peptides signaux ainsi qu'à un défaut dans les voies UPR (Unfolded Protein Response ou réponse associée à la mauvaise conformation des protéines, en français) et dans le mécanisme d'ERAD (Endoplasmicreticulum-associated protein degradation ou dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique, en français) (Mentrup et al., 2017). Un certain nombre de substrats de la SPP ont été identifiés comme l'hème oxygénase-1 (HO-1) et la protéine XBP1 (Mentrup et al., 2017). HO-1 est une protéine ancrée dans la membrane du RE par le biais d'un segment transmembranaire Ct. Le reste de la protéine est présente au niveau cytosolique. Elle est impliquée dans la dégradation de l'hème qui génère du fer, du monoxyde de carbone et la biliverdine (Abraham et Kappas, 2008). La biliverdine possède une activité antioxydante et le monoxyde de carbone possède une activité antioxydante, conférant à HO-1 un rôle cytoprotecteur. HO-1 est également sujette à un clivage protéolytique réalisé par la SPP au niveau de la membrane du RE. Ce clivage a lieu après le résidu F276 et promeut la libération d'HO-1 dans le cytosol (Figure 28A), qui va ensuite être transloqué dans le noyau des cellules. Le rôle de la translocation nucléaire d'HO-1 n'est pas connu mais semble être impliqué, au cours d'un processus cancéreux, dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de façon indépendante de son activité enzymatique (Boname et al., 2014 ; Hsu et al., 2015). D'autres substrats de la SPP ont été caractérisés, comme la protéine XBP1. XBP1 est une protéine impliquée dans la réponse UPR. La SPP est capable de former un complexe avec le facteur Derlin1, une pseudoprotéase rhomboïde et TRC8 (Translocation in renal carcinoma on chromosome 8), une E3 ubiquitine ligase, afin de cliver XBP1u. Le clivage par la SPP nécessite au préalable une réaction de shedding catalysée par Derlin1. Le clivage de XBP1u par la SPP (Figure 28B) permet de réguler la réponse UPR : lorsque XBP1u n'est pas clivé, XBP1s (un effecteur central de la réponse UPR) est inhibé et dégradé par le protéasome, inhibant alors la réponse UPR. Ces résultats illustrent le rôle central de la SPP dans la biologie des protéines transmembranaires résidantes du RE.



**Figure 28 : Processus de clivage protéolytique de substrats connus de la SPP, l'hème oxygénase-1 et XBP1u.** (A) Illustration du processus de clivage de l'hème Oxygénase-1 (HO-1) par la SPP, libérant HO-1 dans le cytosol avant qu'elle soit transloquée dans le noyau des cellules (B) Illustration du processus de clivage de XBP1u par la SPP après shedding par Derlin1 afin de réguler la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Adapté de Mentrup et al., 2017 et de Chen et al., 2014.

## *i-CLIPs et infections virales*

Les iCLIPs et notamment la PS et la SPP, sont impliquées dans la maturation protéolytique de nombreuses protéines transmembranaires. En ce sens, des mutations ou une activité protéolytique aberrante de ces protéases sont associées à de nombreux processus pathologiques comme des cancers, des troubles cardiovasculaires. De plus, un certain nombre d'agents pathogènes parasitaires ou viraux notamment, exploitent les i-CLIPs pour le clivage et/ou la maturation de leurs protéines.

Pour l'heure, aucune étude n'a décrit l'implication de la PS dans la maturation protéolytique de déterminants viraux.

En revanche, des études ont mis en évidence le rôle de la SPP dans la maturation protéolytique de protéines virales, comme le précurseur de la glycoprotéine du virus Bunyamwera et la protéine Core du HCV (Mentrup et al., 2017). Le virus Bunyamwera (BUNV) est un virus modèle appartenant à la famille des *Bunyaviridae*, qui contient un grand nombre de virus pathogènes pour l'animal et l'Homme. Le précurseur de la glycoprotéine du BUNV (Gn-NSm-Gc) subit une maturation protéolytique pour générer deux glycoprotéines structurales, Gn et Gc, impliquées dans l'entrée virale, ainsi qu'une protéine non-structurale NSm impliquée dans la réplication virale (Shi et al., 2016). Ce précurseur est ancré dans la membrane du RE et présente plusieurs passages transmembranaires (domaines I, III et V). Le domaine I de NSm sert de peptide signal interne pour la protéine NSm et le domaine V de NSm sert de peptide signal interne pour la protéine Gc (Shi et al., 2016). Ces peptides signaux sont des cibles pour la signal peptidase et la SPP successivement. Ceci permet la libération des protéines NSm, Gn et Gc matures. Le clivage du précurseur glycoprotéique par la SPP est nécessaire pour l'infectivité virale (Shi et al., 2016). La protéine Core du HCV est également un substrat de la SPP. Ce substrat a été identifié au début des années 2000 et a été longuement caractérisé depuis (McLauchlan et al., 2002 ; Ait-Goughoulte et al., 2006 ; Aizawa et al., 2016, Hirano et al., 2017). La protéine Core constitue la capside virale, elle est produite à partir d'une polyprotéine virale exprimant les autres protéines structurales et nonstructurales (Figure 29A). Cette polyprotéine est clivée de manière co- et posttraductionnelle pour générer des protéines individuelles (Figure 29B). La protéine Core et la glycoprotéine E1 sont séparées par une jonction qui va être clivée par la signal peptidase pour générer deux protéines individuelles dont la protéine Core immature. Cette forme immature va ensuite être clivée au niveau Ct au niveau des plans membranaires par la SPP afin de générer la forme mature de la protéine Core qui va permettre l'assemblage viral et la production de virions (Figure 29C) (McLauchlan et al., 2002 ; Ait-Goughoulte et al., 2006). L'inhibition pharmacologique de la SPP ou l'utilisation de siRNA ciblant la SPP inhibe le clivage et de ce fait la maturation de la protéine Core, associée à une diminution de l'assemblage et de l'infectivité virale (Figure 29C) (McLauchlan et al., 2002; Ait-Goughoulte et al., 2006; Hirano et al., 2017). Une étude a montré que la forme immature de la protéine Core était soumise à un processus de dégradation par le protéasome de façon TRC8-dépendante (Aizawa et al., 2016). La SPP est également impliquée dans la maturation protéolytique de virus appartenant à la même famille que le HCV (Flaviviridae), comme le virus GBV-B (Targett-Adams et al., 2006). Ces données illustrent l'importance de la SPP dans la maturation protéolytique de protéines virales. Même si pour l'heure aucune étude n'a mis en évidence le rôle de la PS dans la maturation protéolytique de protéines virales, nous ne pouvons pas exclure que des virus exploitent cette protéase au cours de leur cycle infectieux.



**Figure 29 :** Schéma présentant l'organisation génomique, la topologie des protéines virales du HCV ainsi que le processus de maturation protéolytique de la protéine Core du HCV par la SPP. (A) Organisation du génome du HCV mettant en évidence les domaines de la polyprotéine virale et les différents sites de clivage par des protéases cellulaires ou virales. Les ciseaux représentent les sites de clivage par des protéases cellulaires de sources virales des domaines/protéases viraux. (B) Topologie des protéines du HCV visà-vis des membranes cellulaires. Le rôle des différentes protéines virales dans le cycle infectieux du HCV est indiqué. (C) Processus de maturation protéolytique de la protéine Core du HCV par la signal peptidase (SP) et la signal peptide peptidase (SPP) successivement pour générer la forme mature de Core nécessaire pour l'assemblage et l'infectivité virale. (D) Processus de maturation de la protéine Core du HCV lorsque la SPP est inhibée. Cette inhibition conduit à une absence de maturation de la protéine qui est de ce fait adressée au protéasome de façon TRC8-dépendante, afin d'être dégradée. Adapté de Bartenschlager et al., 2013 et de Aizawa et al., 2016.

### Inhibiteurs d'i-CLIPs et potentiel antiviral

Le lien existant entre i-CLIPs (PS et SPP) et virus, discuté précédemment, a permis de mettre en évidence le rôle proviral des i-CLIPs et notamment de la SPP. Bien qu'à ce jour aucune étude n'ait mis en évidence le rôle de la PS dans la maturation protéolytique de protéines virales, la PS a été identifiée depuis une vingtaine d'année comme étant le déterminant majeur responsable des manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer. En ce sens, un réel effort a été réalisé depuis dans le but d'identifier et de développer des inhibiteurs à la fois puissants et spécifiques de la PS. Le cas échéant, ces inhibiteurs pourraient également constituer des molécules antivirales, au même titre que les inhibiteurs de SPP. Il existe des molécules à la fois spécifiques de la SPP et de la PS mais également des molécules présentant une spécificité moindre et ciblant alors les deux protéases. L'ensemble de ces molécules suivent un développement clinique plus ou moins avancé.

Concernant l'inhibition spécifique de la SPP, une seule molécule est disponible, la (Z-LL)<sub>2</sub>-ketone **(Figure 30)**, synthétisée pour la première fois en 2000 (Weihofen et al., 2000). Son développement clinique n'a pas dépassé les phases précliniques. Cette molécule a en effet montré sa capacité à inhiber la maturation protéolytique de la protéine Core du HCV (McLauchlan et al., 2002). Cette molécule a également montré sa capacité à inhiber l'infectiosité du HSV-1 (Herpès Simplex Virus-1) *in vitro* et *in vivo* chez la souris, sans toutefois pouvoir identifier formellement la nature du substrat de la SPP responsable de cet effet (viral ou cellulaire). La glycoprotéine K du HSV-1 serait la cible supposée de la SPP, sans preuve expérimentale jusqu'ici (Allen et al., 2014).

Des molécules développées initialement pour cibler la PS ont montré également leur capacité à inhiber la SPP, à des concentrations différentes. Par exemple, la molécule LY-411,575 **(Figure 30)** a montré sa capacité à inhiber le clivage de la protéine Core du HCV, la production de particules virales *in vitro* ainsi qu'à améliorer les effets dus à l'expression de Core sur l'histopathologie hépatique chez la souris (Aizawa et al., 2016). Cette molécule a également montré sa capacité à inhiber la production de peptides amyloïdes dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, chez des modèles de souris et de rat (Lanz et al., 2004 ; Wong et al., 2004 ; Best et al., 2005). Néanmoins, cette molécule présente un index de sélectivité (Indice permettant de mettre en rapport la concentration efficace 50, IC<sub>50</sub> et la concentration cytotoxique 50, CC<sub>50</sub> afin de déterminer le potentiel thérapeutique d'une molécule) qui n'est pas optimal pour une utilisation en clinique (3<SI<5) mais surtout des effets secondaires notoires comme une altération de la lymphopoïèse et de la différenciation des cellules intestinales chez la souris (Wong et al., 2004 ; Hyde et al., 2006). Une autre molécule ciblant à la fois la PS et la SPP a suivi un développement clinique, il s'agit du RO4929097 ou RO, un dérivé de dibenzazepinone (Figure 30). Cette molécule a montré sa capacité à inhiber le clivage de la protéine Core du HCV par la SPP in vitro (Aizawa et al., 2006). Elle a également montré sa capacité à inhiber la signalisation associée à Notch dans de nombreux modèles de cancer dans le cadre d'études pré-cliniques. Ces études ont permis de mettre en évidence l'efficacité de cette molécule dans l'inhibition de Notch, une absence de toxicité et un réel effet antitumoral (Luistro et al., 2009). Suite à l'obtention de ces résultats, RO a été utilisée dans le cadre d'essais cliniques de phase I puis de phase II afin d'évaluer son innocuité et son efficacité chez l'Homme contre le mélanome, le cancer colorectal, le cancer de l'ovaire, le glioblastome ou encore l'adénocarcinome pancréatique (Gu et al., 2017). Dans les études de phase II, la molécule montrait une absence de toxicité et d'effets indésirables notoires. Néanmoins, l'efficacité de cette molécule, en monothérapie ou en combinaison, n'était pas satisfaisante et le développement clinique de cette molécule a été arrêté après l'obtention de ces résultats (McCaw et al., 2020).

Les inhibiteurs spécifiques de la PS (ou GSIs pour Gamma Secretase inhibitors, en anglais) sont les molécules qui ont subi le développement clinique le plus avancé à ce jour. Un des premiers inhibiteurs spécifiques de la PS à avoir été développé, le DAPT (ou GSI-IX) **(Figure 30)**, un inhibiteur peptidique, a montré sa capacité à inhiber le clivage du précurseur amyloïde par la PS *in vitro*. Ce composé a également été le premier à présenter la capacité d'inhiber, en modèle murin, la production des peptides A $\beta$  dans le système nerveux (Dovey et al., 2001). Plus tard, des études ont confirmé la spécificité de ce composé vis-à-vis de la PS en montrant qu'il était incapable d'inhiber la maturation protéolytique de substrats de la SPP (Nyborg et al., 2004 ; Aizawa et al., 2016). Bien que ce composé présente une bonne pénétration au niveau du système nerveux, aucun essai clinique faisant intervenir cette molécule n'a été référencé pour l'heure. Le DAPT ainsi que bon nombre de GSIs induisent de nombreux effets secondaires notoires chez l'Homme (Mentrup et al., 2017). Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'inhibition de la
maturation du précurseur amyloïde et de la protéine Notch se faisait dans la même gamme de concentration et de façon irréversible. Ensuite, le semagacestat (ou LY-450,139) (Figure 30), un dérivé de l'azepine, commercialisé par l'entreprise Eli Lilly (Henley et al., 2009) a été le premier GSI à entrer en phase III (Yao et al., 2022). Néanmoins, dans le cadre de ces deux essais de phase III, la molécule induisait des effets secondaires importants, probablement associés à l'inhibition d'autres substrats de la PS comme Notch. Ceci a provoqué l'arrêt immédiat des deux études (Doody et al., 2013 ; Henley et al., 2014). Pour outrepasser ce problème, d'autres GSIs comme l'avagacestat (ou BMS-708163) (Figure 30), un dérivé d'oxadiazole, ont été développés. Cette molécule commercialisée par l'entreprise Bristol-Myers-Squibb, a montré sa capacité à inhiber le clivage du cytochrome P-450, un substrat de la PS, à diminuer la formation des peptides amyloïdes sans affecter le clivage de la protéine Core du HCV, in vitro (Gillman et al., 2010 ; Aizawa et al., 2016). De plus, cette molécule présente une bonne stabilité métabolique ainsi qu'un indice de sélectivité pour le clivage de Notch par rapport à APP de 193, indiquant que la concentration nécessaire pour inhiber APP est nettement inférieure à celle nécessaire pour inhiber Notch (Gillman et al., 2010). In vivo, chez le rat et le mâle Beagle, cette molécule a montré sa capacité à inhiber la formation des peptides amyloïdes dans le système nerveux central des animaux. Suite à cela cette molécule a suivi un développement clinique de phase I concluant (Tong et al., 2012). Puis, un essai clinique de phase II n'a pas permis de montrer la capacité de l'avagacestat à inhiber la production de peptides amyloïdes de façon significative par rapport au groupe contrôle. De plus, l'utilisation de cette molécule a montré une augmentation dose-dépendante de l'apparition d'effets secondaires notoires tels que des cancers cutanés ou des troubles gastrointestinaux sévères, mettant fin à tout développement clinique de cette molécule (Coric et al., 2012 ; Coric et al., 2015). Un dérivé d'anti-inflammatoire développé par Chiesi Farmaceutici, l'itanapraced (ou CHF-5074) (Figure 30) a montré sa capacité à inhiber la PS in vitro et sa capacité à réduire drastiquement le dépôt de peptides amyloïdes au niveau du cerveau (cortex et hippocampe notamment) dans des modèles de maladie d'Alzheimer chez le rat et la souris (Imbimbo et al., 2007 ; Imbimbo et al., 2009). Une étude clinique de phase I a montré que la molécule était bien tolérée et potentiellement sûre. En revanche, une étude de phase II a mis en évidence des effets secondaires notoires associés à cette molécule comme une toxicité gastrointestinale ou un déclin cognitif à haute dose sur une durée de 40 semaines (Yao et al., 2022). Le développement clinique de cette

molécule dans le contexte de la maladie d'Alzheimer a été arrêté suite à l'obtention de ces résultats. Enfin, un composé identifié par l'entreprise Pfizer, le nirogacestat (ou PF-03084014) **(Figure 30)** a montré sa haute sélectivité vis-à-vis de la PS et sa capacité à inhiber la production des peptides amyloïdes dans des systèmes *ex cellulo* (Wen et al., 2022). Surtout, cette molécule a été étudiée dans le domaine de la cancérologie dans le cadre d'essais cliniques où elle a montré une excellente tolérabilité, une faible toxicité et une efficacité significative (Wen et al., 2022). Elle est actuellement en développement clinique de phase II dans le cadre des cancers ovariens, du sein et du myélome multiple, réfractaire ou non (Wen et al., 2022). Également, elle a suivi un développement clinique de phase III pour évaluer son efficacité sur les cancers desmoïdes et les résultats obtenus cette année montrent que le nirogacestat est efficace dans ce contexte, en améliorant significativement la survie et la qualité de vie des patients (Gounder et al., 2023). Des effets secondaires de faible grade ont été rapportés dans cette étude. Cette molécule est donc porteuse d'espoir pour les patients atteints de cette pathologie et son développement mérite d'être poursuivi dans le cadre d'autres pathologies.

Par la suite, avec l'échec du développement clinique de nombreux GSIs dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une autre classe de molécules a été développée pour des applications cliniques, appelées « modulateurs de la  $\gamma$ -sécrétase » (GSM pour  $\gamma$ -secretase modulators, en anglais). Contrairement aux GSIs qui interfèrent avec le recrutement du substrat, ces molécules se fixent sur des sites différents du site actif de la PS. Ces inhibiteurs sont plus spécifiques et présentent donc une affinité moindre pour les autres substrats de la PS comme Notch. Ces aspects confèrent à ces molécules un profil thérapeutique *a priori* plus sûr dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Pour l'heure, la plupart de ces molécules est toujours en phase de développement clinique précoce (Wen et al., 2022).

Les molécules présentées ici, à l'exception de la (Z-LL)<sub>2</sub>-ketone ou du LY-411,575, n'ont pas démontré de potentiel antiviral à ce jour. Néanmoins, le fait que leur innocuité chez l'Homme ait été démontrée et que ces molécules ont suivi différentes phases de développement clinique avancées rendent ces molécules repositionnables le cas échéant. De plus, bon nombre d'infections virales présentent un tropisme et induisent un tableau clinique bien distincts de ceux décrits dans la maladie d'Alzheimer ou dans certains cancers. En ce sens, l'ensemble des molécules présentées ici constituent des candidats antiviraux potentiels.

Nom(s) de la	Nom(s) de la Cible		Statut de	Référence(s)	
molecule	SPP	PS	clinique		
(Z-LL) <sub>2</sub> -ketone	+	-	Préclinique	McLauchlan et al., 2002 ;	
				Allen et al., 2014	
LY-411,575	+	+	Préclinique	Lanz et al., 2004 ; Best et al.,	
				2005	
R04929097	-	+	Phase II	Cuistro et al., 2009 ; Gu et al.,	
				2017	
DAPT	-	+	Préclinique	Dovey et al., 2001	
Semagacestat	-	+	Phase III	Doody et al., 2013 ; Henley et	
(LY-450,139)				al., 2014	
Avagacestat	-	+	Phase II	Coric et al., 2012 ; Coric et al.,	
(BMS-708163)				2015	
Itanapraced	-	+	Phase II	Yao et al., 2022	
(CHF-5074)					
Nirogacestat	-	+	Phase III	Gounder et al., 2023	
(PF-03084014)					

Figure 30 : Tableau récapitulatif des principaux inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase/Préséniline (GSIs) et/ou de Signal **Peptidase (SPP).** Un symbole « - » indique une absence d'inhibition de la protéase et un symbole « + » indique une inhibition de la protéase.

# Contexte et objectifs de recherche

## **Objectif #1 – Annexe 1 : Caractérisation du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 du HEV**

Les travaux de thèse réalisés par le Dr Maliki Ankavay il y a quelques années au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence la localisation nucléaire de la protéine ORF2 *in vitro* (Ankavay et al., 2019). Cette observation a également été faite par une équipe suisse *ex vivo* à partir de biopsies de tissu hépatique issues de patients infectés par le HEV (Lenggenhager et al., 2017).

Le trafic nucléocytoplasmique des protéines est médié par les protéines de la famille des karyophérines et plus particulièrement par les importines pour l'import nucléaire et les exportines pour l'export nucléaire. Les importines reconnaissent des signaux d'import nucléaire (NLS) sur les protéines qu'elles transportent. Les exportines reconnaissent quant à elles des signaux d'export nucléaire (NES) sur les protéines qu'elles transportent. De nombreux virus utilisent le trafic nucléocytoplasmique pour favoriser leur réplication ou pour réguler la réponse immunitaire de l'hôte qu'ils infectent (Yarbrough et al., 2014). Dans le cadre de l'infection par le HEV, les mécanismes précis du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 ne sont pas connus. En ce sens, les mécanismes d'import et d'export nucléaire de la protéine ORF2, ainsi que les effecteurs impliqués restent à être identifiés/caractérisés. De plus, le rôle de ce trafic dans les étapes du cycle infectieux du HEV est inconnu.

L'étude du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 avait été initiée de façon préliminaire par le Dr Maliki Ankavay à la fin de sa thèse. Mon premier objectif de thèse était donc de caractériser les mécanismes précis et le rôle de ce processus dans le cycle infectieux du HEV.

Les résultats de cette étude, que j'ai obtenus pendant les deux premières années de ma thèse, ont fait l'objet d'une publication dans *PLoS Pathogens* (IF 2022-2023 = 7,464) **(Annexe 1)** que je signe en tant que co-premier auteur (#) :

# An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecycle and interactions with the host cell

Kévin Hervouet<sup>1,#</sup>, <u>Martin Ferrié<sup>1,#</sup></u>, Maliki Ankavay<sup>1,2,#</sup>, Claire Montpellier<sup>1</sup>, Charline Camuzet<sup>1</sup>, Virginie Alexandre<sup>1</sup>, Aïcha Dembélé<sup>1</sup>, Cécile Lecoeur<sup>1</sup>, Arnold Thomas Foe<sup>1</sup>, Peggy Bouquet<sup>3</sup>, David Hot<sup>3</sup>, Thibaut Vausselin<sup>1</sup>, Jean-Michel Saliou<sup>3</sup>, Sophie Salomé-Desnoulez<sup>3</sup>, Alexandre Vandeputte<sup>3</sup>, Laurent Marsollier<sup>4</sup>, Priscille Brodin<sup>1,3</sup>, Marlène Dreux<sup>5</sup>, Yves Rouillé<sup>1</sup>, Jean Dubuisson<sup>1</sup>, Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>1</sup> & Laurence Cocquerel<sup>1</sup>.

PLoS Pathogens, 2022, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798

### **Objectif #2 – Annexe 2 : Identification et caractérisation des usines virales du HEV**

Les étapes de réplication et d'assemblage de nombreux virus à ARN simple brin de polarité positive se déroulent dans des compartiments intracellulaires appelés usines virales. Ces structures induites par l'infection virale sont composées de facteurs viraux (protéine et acides nucléiques) et cellulaires. De plus, la nature et la localisation de ces compartiments sont très variées, elles dépendent de la stratégie de réplication mise en place par le virus. L'identification et la caractérisation des usines virales permettent d'identifier des cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques comme les molécules antivirales. La réorganisation des membranes de la cellule hôte semble être un mécanisme conservé chez les virus à ARN simple brin de polarité positive.

Pour l'heure, aucune étude ne porte sur l'identification et la caractérisation des usines virales du HEV. Par là même, l'origine des usines virales du HEV est inconnue. Nous avons donc cherché à identifier les réorganisations membranaires mises en place par le HEV afin d'identifier ses usines virales, leur composition en facteurs cellulaires et viraux ainsi que leur origine. Pour ce faire, une collaboration étroite a été établie avec la plateforme de microscopie électronique de l'Université de Tours, dirigée par le Pr Philippe Roingeard, afin de bénéficier de toute leur expertise dans le domaine de la microscopie électronique et des structures membranaires induites par les virus. Mon second objectif de thèse a été de participer à l'identification des usines virales du HEV, à la caractérisation de leur composition et leur origine et d'analyser leur importance dans le cycle infectieux du HEV.

Cette étude à laquelle j'ai participé durant ma deuxième année de thèse, a fait l'objet d'une publication dans *Cellular and Molecular Life Sciences* (IF 2022-2023 = 9,234) **(Annexe 2)** que je signe en tant que co-deuxième auteur (<sup>§</sup>) :

### The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for

#### **Hepatitis E Virus**

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

Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, https://doi.org/10.1007/s00018-022-04646-y

# Objectif #3 – Annexe 3 : Étude du mécanisme d'adressage de la protéine de capside ORF2i aux usines virales du HEV

Dans les cellules eucaryotes, un certain nombre de facteurs sont impliquées dans l'adressage subcellulaire des protéines, des lipides et des acides nucléiques. L'adressage subcellulaire des protéines est un processus complexe qui peut faire intervenir des protéines reconnaissant une séquence consensus précise et être dépendant de vésicules, entre une membrane donneuse et une membrane accepteuse, toutes deux provenant de compartiments intracellulaires différents.

Dans le cadre de mon second projet de thèse, nous avons pu identifier les usines virales du HEV, leur composition non-exhaustive ainsi que leur origine. Nous avons pu

montrer, entre autres, que la protéine ORF2i était détectée au niveau de ces usines virales. Nous avons également montré dans mon premier projet de thèse que le NLS fonctionnel identifié au niveau de la séquence de la protéine ORF2 du HEV servait également à réguler la translocation réticulaire de la protéine afin de produire les formes ORF2g/c au niveau luminal de la voie de sécrétion et la forme ORF2i, ancrée du côté cytosolique des membranes de la voie de sécrétion. Les résultats obtenus dans le cadre de mes deux premiers projets de thèse soulevaient un certain nombre de questions. Notamment, comment les différents facteurs viraux et cellulaires sont adressés au niveau des usines virales du HEV. Plus particulièrement, quel(s) est/sont le/les facteur(s) cellulaire(s) impliqués dans l'adressage de la protéine ORF2i, qui est un intervenant central dans le cycle infectieux du HEV, au niveau des usines virales du HEV.

Mon troisième objectif de thèse était donc d'identifier le(s) facteur(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans l'adressage de la protéine ORF2i au niveau des usines virales du HEV.

Cette étude que j'ai menée durant ma fin de thèse, fait l'objet d'un article soumis pour publication **(Annexe 3)** que je signe en tant que premier auteur :

# The AP-1 adaptor complex drives intracellular trafficking and assembly of the infectious ORF2 capsid protein of Hepatitis E virus

<u>Martin Ferrié</u><sup>1</sup>, Virginie Alexandre<sup>1</sup>, Claire Montpellier<sup>1</sup>, Peggy Bouquet<sup>2</sup>, Maliki Ankavay<sup>1,3</sup>, Cyrine Bentaleb<sup>1</sup>, Jean Dubuisson<sup>1</sup>, Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>1</sup>, Yves Rouillé<sup>1</sup>, Laurence Cocquerel<sup>1,\*</sup>

# **Objectif #4 : Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des différentes formes de la protéine de capside ORF2 du HEV**

La recherche sur le HEV a longtemps été limitée par l'absence de système de culture cellulaire efficace. Ces dernières années plusieurs systèmes de culture faisant intervenir des types cellulaires distincts ont émergé. Au laboratoire, un système de culture efficace a été implémenté en utilisant la souche Kernow-C1/p6 de HEV-3 et les cellules PLC3 (un sous-clone de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5) (Montpellier et al., 2018). L'exploitation de ce système de culture a permis de mettre en évidence qu'au cours de son cycle infectieux, le HEV produisait au moins trois formes de sa protéine de capside ORF2 : (i) la forme ORF2g pour « glycosylée », (ii) la forme ORF2c pour « clivée » et (iii) la forme ORF2i pour « infectieuse » qui est associée aux particules virales et qui n'est pas glycosylée. Les formes ORF2g et ORF2c (abréviées ORF2g/c) ne sont pas associées aux particules infectieuses. Elles sont N-glycosylées, O-glycosylées, sialylées et massivement sécrétées dans les surnageants de culture cellulaire et dans le sérum des patients infectés par le HEV (Montpellier et al., 2018). Dans cette même étude et une étude ultérieure (Ankavay et al., 2019), le résidu d'acide aminé constituant l'extrémité Nt de chaque forme a été identifié en utilisant une approche de spectrométrie de masse et un marquage Nt des protéines. L'extrémité Nt de l'ORF2i est la leucine 14 (L14), la sérine 34 (S34) pour l'ORF2g et la sérine 102 (S102) pour l'ORF2c.

Ces résultats ont soulevé un certain nombre de questions de recherche. Notamment, quels sont les mécanismes permettant de produire les différentes formes de la protéine ORF2 ? De manière intéressante, des résultats obtenus précédemment dans l'équipe (Montpellier et al., 2018 ; Ankavay et al., 2019 ; Hervouet et al., 2022) suggéraient que des protéases cellulaires pourraient être à l'origine de la production de ces différentes formes.

# Mon quatrième objectif, qui constituait l'objectif principal de ma thèse, était de caractériser les mécanismes de maturation protéolytique de la protéine ORF2 du HEV, permettant de générer les formes ORF2i/g/c.

Les résultats que j'ai obtenus sur les mécanismes de maturation des formes ORF2g/c ont été valorisés dans la publication Hervouet K, Ferrié M, Ankavay M et al., PLoS Pathogens, 2022. Les résultats sur le mécanisme de maturation de l'ORF2i feront l'objet d'une autre publication que je signerai premier auteur.

# Matériel et méthodes

**Culture cellulaire.** Les cellules hépatocytaires PLC3 et Huh-7.5 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) en présence de glutaMAX-I (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal (Life Technologies) et de 1% d'acides aminés non essentiels (Life Technologies) (milieu complet) à 37°C en atmosphère humide. Dans certains cas, les cellules PLC3 électroporées ont été maintenues à 32°C dans du milieu DMEM/M199 (1v/1v) avec 1mg/mL d'Albumax-I (Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de pyruvate de sodium (Life Technologies).

Les cellules H7-T7-IZ, dérivées de Huh-7 et exprimant stablement l'ARN polymérase T7 (Romero-Brey et al., 2012), ont été maintenues dans un milieu complet enrichi de 50µg/mL de zéocine (Invivogen).

Les cellules PLC3-réplicon expriment stablement un réplicon de souche p6 de HEV-3 décrit dans Bentaleb et al., 2022 **(Annexe 2)**. Ces cellules ont été maintenues dans un milieu complet en présence de 2,5µg/mL de puromycine (Euromedex).

Les hépatocytes primaires humains (PHHs) ont été obtenus chez un fournisseur commercial (Biopredic). Les cellules ont été mises en culture dans un milieu permettant de favoriser l'adhérence des cellules, composé de milieu Williams E GlutaMAX-A supplémenté avec 100 UI/mL de pénicilline, 100  $\mu$ g/mL de streptomycine, 4  $\mu$ g/mL d'insuline bovine et 10% de sérum de veau fœtal (Biopredic), puis les cellules ont été placées à 37°C en atmosphère humide. Un jour après, le milieu a été remplacé par du milieu de culture composé de milieu Williams E GlutaMAX-1 supplémenté avec 100 UI/mL de streptomycine, 4  $\mu$ g/mL d'insuline bovine et 50  $\mu$ M d'hydrocortisone (Biopredic) et les cellules placées à 37°C en atmosphère humide.

**Plasmides, transcription** *in vitro* **et transfection.** Le plasmide pBlueScript SK (+) portant l'ADN du génome complet de la souche Kernow-C1/p6 de HEV-3 (Genbank, JQ679013) a été utilisé comme matrice. Les mutants des sites ARM et NES ont été générés par mutagenèse dirigée. Des mutations individuelles ont été introduites lors d'étapes successives de PCR, comme décrit dans Ankavay et al., 2019, en utilisant le Q5 High-fidelity 2X mastermix (NEB), puis des étapes de digestion et de ligations ont été réalisées. La présence des mutations a été vérifiée par séquençage Sanger (Genoscreen). Les amorces utilisées pour générer les mutants dans l'ORF2 sont répertoriées dans la **Table** 

**1.** Le mutant n'exprimant plus la protéine ORF3 du HEV (HEV-p6- $\Delta$ ORF3) a été généré de la même manière que décrit dans Graff et al., 2006.

Afin de préparer les ARN génomiques coiffés, les plasmides pBlueScript SK (+) portant ou non les mutations ont été linéarisés par l'enzyme de restriction MluI (NEB). Puis la transcription *in vitro* a été réalisée à l'aide du kit mMESSAGE mMACHINE T7 (Life Technologies). Les ARN ont ensuite été électroporés dans les différentes lignées cellulaires avec un Gene Pulser XCellTM (Biorad). Les plasmides pTM ont été transfectés dans les cellules H7-T7-IZ en utilisant du ViaFect (Promega) en suivant les recommandations du fabricant. Les plasmides pTM et pC1-HA-CA2A exprimant la protéine Core du HCV ont été transfectés dans les cellules H7-T7-IZ et PLC3, respectivement, en utilisant du ViaFect (Promega) en suivant les recommandations du fabricant.

Nom	Séquence	Mutant
(orientation)		correspondant
HEV-1 (Fw)	TTTCTGCCTATGCTGCCCGCGCCACCGGCCGGCCAGCCGTCTGGCGCTGC	3R/3A
	TGCTGGGCGGCGCAGCGGCGGTGCCGGCGGTGGTTTCTGGG GTGACAGG	
HEV-2 (Rv)	CCTGTCACCCCAGAAACCACCGCCGGCACCGCCGCTGCGCCGCCCAGCAG	
	CAGCGCCAGACGGCTGGCCGGCCGGTGGCGCGGGCAGCATA GGCAGAAA	
HEV-3 (Fw)	CGTCGTCGTGGGGCGGCCAGCGGCGGTGC	2R/2A
HEV-4 (Rv)	GCACCGCCGCTGGCCGCCCACGACGACG	
HEV-5 (Fw)	CCGTCTGGCGCTGCTGCTGGGGCGGCCAGCGGCGGTGCCGGCGGTGCACC	5R/RA
	GCCGCTGGCCGCCCACGACGACG	
HEV-6 (Rv)	ACCGCCGGCACCGCCGCTGGCCGCCCCAGCAGCAGCGCCAGACGG	
HEV-7 (Fw)	TCTGGCCGTCGTCGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	G/A
HEV-8 (Rv)	ACCGCCGCTGCGCCGCGCACGACGACGGCCAGA	
HEV-9 (Fw)	CCCGCGCCACCGGCCGGCCAGCGGCGTCGCCGTCGTCGTGGGCGGCGC	PSG/3R
HEV-10 (Rv)	GCGCCGCCCACGACGACGCCGACGCCGCTGGCCGGCGGGGGGGG	
HEV-11 (Fw)	CAGCCGTCTGGCCGTCGTCG	⊿SP
HEV-12 (Rv)	ACGGCCAGACGGCTGCATGGTGATCCCATGGGCGATGCAACA	
HEV-13 (Fw)	CTGCCTATGCTGCCCGCGCCACCGGCCAG	⊿SP1
HEV-14 (Rv)	GGGCAGCATAGGCAGCATGGTGATCCCATGGGCGATGCAACAAACA	
	TATTCATT	
HEV-15 (Fw)	CCTGCCCCCTCACGCCCTTTCTCAGTCGCTCGCGCTAACGATGCTTTGTG	NES9
	GGCCTCCGCCACTGCCGCTGAGTACGATCAGGCTACG	
HEV-16 (Rv)	CGTAGCCTGATCGTACTCAGCGGCAGTGGCGGAGGCCCACAAAGCATCG	
	TTAGCGCGAGCGACTGAGAAAGGGCGTGAGGGGGGCAGG	
HEV-17 (Fw)	CAGCAGTATTCTAAGACATTTTATGTTGCCCCGGCCCGCGGAAGGCGT	NES10
	CCGCTTGGGAGGCTGGCACAACTAGGGCCGGC	
HEV-18 (Rv)	GCCGGCCCTAGTTGTGCCAGCCTCCCAAGCGGACGCCTTCCCGCGGGCCG	
	GGGCAACATAAAATGTCTTAGAATACTGCTG	
HEV-19 (Fw)	CGTACCCTAGGTTTGCAGGGTTGTGCAGCCCAGTCCACTGCTGAGG	NES12
	CTCAGCGCGCTAAAACGGAGGTAGGCAAAACCCGGGAG	
HEV-20 (Rv)	CTCCCGGGTTTTGCCTACCTCCGTTTTAGCGCGCTGAGCCTCAGCAGCAG	
	TGGACTGGGCTGCACAACCCTGCAAACCTAGGGTACG	

<u>**Table 1 : Liste des amorces utilisées pour l'approche de mutagenèse dirigée.** Fw = amorce sens ; Rev = amorce antisens.</u>

**Inhibiteurs pharmacologiques et viabilité cellulaire.** La Leptomycine B (Cell signaling) a été resuspendue dans de l'éthanol. Le Verdinexor (Adooq Biosciences), le decanoyl-RVKR-cmk (Sigma), l'hexa-D-arginine (Sigma), le SSM3 trifluoroacétate (Tocris), le composé L (Sigma), le composé N (MedChemExpress), la Ribavirine (MedChemExpress) et le Sofosbuvir (SelleckChem) ont été resuspendus dans du DMSO. Le composé A5 (Calbiochem) a été resuspendu dans de l'eau stérile.

L'impact des composés sur la viabilité cellulaire a été analysé à l'aide du kit CellTiter 96 AQueous non radioactive cell proliferation assay (Promega), en suivant les recommandations du fabricant.

Lyse cellulaire et Western-blot. Sauf mention contraire, les cellules ont été lysées dans un tampon RIPA-like contenant 10mM de Tris-HCl (pH 7), 150mM de NaCl, 2mM d'EDTA, 0,5% de Triton X-100, 1mM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Les surnageants récoltés et les lysats cellulaires générés ont été stockés à -80°C avant analyse. Les concentrations de protéines présentent dans les extraits cellulaires ont été déterminées avec le kit BiCinchronic Acid protein Assay (BCA, Sigma) conformément aux recommandations du fabricant. Les expériences de Western-blot ont été réalisées comme décrit dans Montpellier et al., 2018. Les protéines d'intérêt ont été ciblées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques (Table 2). Les anticorps conjugués à la péroxydase HRP ont été obtenus chez Jackson Immunoresearch. La détection du signal a été réalisée par chimioluminescence (ECL, Amersham).

**Immunoprécipitations et co-immunoprécipitations.** Les anticorps anti-ORF2 séquentiels P1H1 et P3H2, ou conformationnels 2E2 et 4B2, ont été couplés à des billes magnétiques (Dynabeads M-270, Life Technologies) pendant une nuit, à 37°C et sous agitation en suivant les recommandations du fabricant. Le lendemain, les billes ont été lavées puis incubées en rotation pendant 1h avec les échantillons. Puis les billes ont été lavées à nouveau avant que l'immunoprécipitat ne soit élué en présence de tampon réducteur Laemmli à 80°C pendant 20min. les protéines éluées ont ensuite été séparées par SDS-PAGE et les protéines ORF2 révélées avec l'anticorps 1E6 (voir Western Blot). Un anticorps anti-IgG total de souris (Santa Cruz) a été utilisé comme contrôle isotypique. Pour les expériences de co-immunoprécipitation, une étape de crosslinking avec 1% de paraformaldéhyde (PFA) a été réalisée avant la lyse cellulaire avec le tampon RIPA-like.

Puis, un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine AP-1  $\gamma$ 1 a été couplé à des billes magnétiques (Pierce Protein A/G Magnetic beads, Life Technologies) pendant une nuit, à 37°C et sous agitation en suivant les recommandations du fabricant. En parallèle, une étape de pré-clearing a été réalisée en incubant les lysats cellulaires avec des billes dépourvues d'anticorps pendant 1h et à 4°C, afin d'éliminer toute réaction aspécifique pour la suite de l'expérience. Le lendemain, les billes ont été lavées puis incubées pendant 90min, en rotation et à 4°C avec les lysats cellulaires ayant subi l'étape de préclearing. Puis les billes ont été lavées à nouveau avant que l'immunoprécipitat ne soit élué en présence de tampon réducteur Laemmli à 80°C pendant 20min. Les protéines éluées ont ensuite été séparées par SDS-PAGE et les protéines ORF2 et AP-1  $\gamma$ 1 révélées avec l'anticorps 1E6 et anti-AP-1  $\gamma$ 1, respectivement (voir Western Blot). Un anticorps anti-IgG de lapin (Novus) a été utilisé comme contrôle isotypique.

**Extraction subcellulaire.** Les extractions ont été réalisées à l'aide du kit Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fabricant afin d'extraire les compartiments cytoplasmiques, membranaires et nucléaires solubles. Les extraits cytoplasmiques ont été ultracentrifugés à 100000g pendant 1h à 4°C. Les anticorps anti-tubuline- $\beta$  (fraction cytoplasmique), anti-calnexine (fraction membranaire) et anti-SP1 (fraction nucléaire soluble) ont servi de contrôles pour vérifier la qualité de l'extraction.

**Immunofluorescence indirecte.** Les cellules ont été fixées avec 3% de PFA pendant 20 min. Par la suite, les cellules ont été incubées ou non pendant 5min avec du méthanol froid. Ensuite les cellules ont été perméabilisées avec 0.5% de Triton X-100 pendant 30 min. Puis, les sites de fixation aspécifiques des anticorps ont été bloqués en incubant les cellules avec 10% de sérum de chèvre pendant 30 min à température ambiante (RT). Les cellules ont alors été incubées avec les anticorps primaires **(Table 2)** pendant 30 min à RT puis avec les anticorps secondaires pendant 20 min à RT. Les noyaux ont été marqués au DAPI (4 ′, 6-diamidino-2-phénylindole, Sigma). Pour certaines expériences, les cellules ont été marquées avec du Green/Blue CellMask (Invitrogen), ajoutés en même temps que les anticorps secondaires et le DAPI. Après lavage, les lamelles ont été montées sur des lames de verre avec du Mowiol 4–88 (Calbiochem). Les lamelles ont été analysées à l'aide d'un microscope confocal LSM 880 à balayage laser (Zeiss) utilisant les objectifs Plan EC Neofluar 40xOil /1.4N.A. et/ou Plan Apochromat 63xOil /1.4N.A. Les images ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Fiji.

**Quantification des ratios d'intensité de fluorescence noyau/cytoplasme.** Les cellules ont été co-marquées avec du Green CellMask (Life Technologies) et analysées avec une méthode adaptée de McCloy et al., 2014 au niveau du marquage ORF2. Les régions d'intérêt (ROI) ont été tracées manuellement autour des contours cellulaires et des noyaux. L'aire, la densité intégrée ainsi que l'intensité de fluorescence en niveaux de gris ont été mesurées. Pour chaque cellule le ratio d'intensité de fluorescence noyau/cytoplasme a été calculé selon la formule suivante : intensité totale du noyau/(intensité de fluorescence exacte de la totalité de la cellule – intensité de fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) – la moyenne de la densité intégrée de cellules non infectées. Le CTCF est calculé de la façon suivante : densité intégrée – (aire de la cellule d'intérêt X moyenne de l'intensité de fluorescence correspondant à du bruit de fond autour de la cellule).

**Détermination des valeurs de coefficient de Pearson (PCC) ou de Manders (MOC).** Les valeurs de coefficients de Pearson (PCC) ont été déterminées à l'aide du plugin JACoP du logiciel Fiji. Pour chaque calcul, au minimum 30 cellules ont été analysées. Les valeurs de coefficients de Manders (MOC) ont également été déterminées à l'aide du plugin JACoP du logiciel Fiji. Pour chaque analyse, au moins 30 cellules ont été utilisées pour calculer une valeur moyenne de MOC. Une valeur de MOC de 1 indique un overlap de signal parfait et une valeur de 0, qu'aucun overlap d'intensité n'est présent.

**Expérience de ligation de proximité (PLA).** Les cellules PLC3 électroporées cultivées sur lamelles ont été fixées avec 3% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 min. Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 5min avec du méthanol froid. Ensuite les cellules ont été perméabilisées avec 0.5% de Triton X-100 pendant 30 min et l'expérience de PLA a été réalisée à l'aide du kit Duolink *in situ* detection kit (Sigma), selon les recommandations du fabricant avec les anticorps anti-ORF2 1E6 ou P1H1 et des anticorps dirigés contre différentes protéines cellulaires. Les lamelles ont été analysées en microscopie confocale comme décrit précédemment. Pour chaque condition, douze champs ont été imagés. Pour chaque champ, une pile de douze images représentatives du

volume total des cellules a été générée. Les images ont été assemblées et les spots comptés avec le logiciel Fiji. Pour chaque champ, le nombre de spot par cellule a été calculé en divisant le nombre total de spot par champ par le nombre de noyaux cellulaires.

**Extraction des particules virales intracellulaires et extracellulaires.** Les cellules PLC3 électroporées confluentes à ~90% ont été cultivées en flasques T75. Les surnageants de culture ont été récoltés et centrifugés pendant 5min à 4000rpm puis stockés à -80°C (particules virales extracellulaires). Le protocole d'extraction des particules virales intracellulaires est adapté de Emerson et al., 2006. Les cellules ont été trypsinées puis centrifugées 10min à 1500rpm et le culot cellulaire lavé 3x avec du PBS. Les cellules ont alors été resuspendues dans de l'eau stérile pendant 20min afin de créer un choc osmotique et de libérer le contenu des cellules, qui contient des particules virales. Puis, 100μL de PBS 10X ont été ajoutés aux cellules lysées et les tubes centrifugés 10min à 13400rpm. Les surnageants contenant les particules virales intracellulaires ont été aliquotés et stockés à -80°C.

**Détermination du titre infectieux.** Des cellules Huh-7.5 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à fond clair et à bords noirs coatées avec du collagène-I (Corning) à la densité de 3500 cellules par puits. Les cellules ont ensuite été infectées avec des surnageants (particules virales extracellulaire) et des particules virales intracellulaires pendant trois jours dans du milieu complet. Au bout de trois jours, les cellules ont été fixées et des immunofluorescences anti-ORF2 ont été réalisées avec l'anticorps 1E6. Le nombre de cellules positives pour le marquage ORF2 a été déterminé à l'aide de l'imageur confocal à haut débit InCell 6000 (GE Healthcare) et le logiciel d'analyses d'images Colombus (Perkin Elmer). Chaque cellule positive était considérée comme une FFU (unité formant un foyer ou Foci Forming Unit, en anglais) et les résultats exprimés en FFU/mL.

**Table 2 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western-blot et d'immunofluorescence indirecte.** pAb = anticorps polyclonal ; n/a = non applicable.

Nom	Cible / Épitope	Hôte	Isotype	Source	Référence	N° Ab Registry	WB	IF
P1H1	ORF2i (GQPSGRRRGRRSGG )	Souris	IgG3	Home made	Bentaleb et al., 2022	n/a	1/500	1/500
P2H1	ORF2i (AGYPYNYNTTASDQ )	Souris	IgG2a	Home made	Bentaleb et al., 2022	n/a	1/500	1/500
P3H2	ORF2i/g/c (SRVVIQDYDNQHEQ DR)	Souris	IgG3	Home made	Bentaleb et al., 2022	n/a	1/500	1/500
1E6	ORF2i/g/c (GDSRVVIQDYDNQH EQ DRPTPSPA)	Souris	IgG2b	Millipore	MAB8002	AB_827236	1/2000	1/800
ORF3	ORF3	Lapin	n/a	Bioss	BS-0212R	AB 10856478	1/500	n/a
ORF3	ORF3	Lapin	pAb	S. Emerson	Graff et al., 2006	n/a	n/a	1/1000
Tub	Région Ct de la β- tubulin	Souris	IgG1	Sigma	T5201	AB_609915	1/4000	1/100
Rab11	Rab11	Lapin	(mAb	Cell signaling	#5589	AB_10693925	n/a	1/50
Rab11a	Rab11a	Lapin	(mAb)	Abcam	ab128913	AB_11140633	1/20000	n/a
Rab11b	Rab11b	Lapin	(mAb)	Abcam	ab175925	n/a	1/10000	n/a
5A6	Tetraspanin CD81 (Grande boucle extracellulaire)	Souris	IgG1	S. Levy	Oren et al., 1990	AB_627192	1/1000	1/300
CD71	Récepteur à la transferrine	Lapin	pAb	Abcam	ab214039	AB_2904534	n/a	1/100
Importin $\alpha$ -1		Chèvre	n/a	Abcam	ab6036	AB_30524	n/a	1/50
Importin $\alpha$ -1		Lapin	n/a	Invitrogen	PA5-83544	AB_2790697	n/a	1/100
CRM1	Exportine-1	Lapin	n/a	Cell Signaling	#46249	AB_2799298	1/1000	1/400
CNX-N	N-term de la Calnexine	Lapin	mAb	Abcam	ab92573	AB_10563673	n/a	1/1000
CNX-C	C-term de la Calnexine	Lapin	n/a	Abcam	ab22595	AB_2069006	1/5000	1/1000
5P1 CM120		Lapin		PD Bioggiongoo	#PA5-29105 #610022	AB_2540041	1/1000	1/F00
GM150		Jonin	igui	Abcom	#010622	AD_390141	11/a	1/500
	Class MON 152	Lapin	II/a	Abcam	ab124968	AB_11129/40	1/1000	n/a
Furin	Clone MON-152	Souris	lgG1	Sciences	ALX-803- 017-R100	AB_2051436	1/1000	n/a
Notch-1 clivé		Lapin	n/a	Cell Signaling	#4147	AB_2153348	1/1000	n/a
Notch-1 total		Lapin	n/a	Cell signaling	#4380	AB_10691684	1/1000	n/a
M6PR	Mannose-6- Phosphate Receptor (Cation Independent)	Lapin	n/a	B. Hoflack	Méresse et Hoflack, 1993	n/a	n/a	1/500
AP-1G1	Sous-unité gamma-1 d'AP-1	Lapin	n/a	Abcam	ab220251	n/a	1/300	1/250
Presenilin-1		Lapin	n/a	Abcam	ab76083	AB_1310605	1/1000	n/a
Presenilin-2		Lapin	n/a	Abcam	ab51249	AB_882202	1/20000	n/a
GRP78	Glucose regulated protein of 78kDa	Rat	n/a	Santa Cruz Biotechnology	sc-13539	AB_627698	1/1000	n/a
TGN46	Trans-Golgi Network protein of 46kDa	Mouto n	n/a	Biorad Laboratories	AHP500GT	AB_2203291	n/a	1/200
Clathrin	Chaîne lourde de la clathrine	Lapin	n/a	Cell signaling	#2410	AB_2083156	1/1000	1/100
AP-2B1	Sous-unité Beta 1 d'AP-2	Lapin	n/a	Proteintech	15690-1-AP	AB_2056351	1/2000	1/200
PEN2	Presenilin enhancer- 2	Lapin	n/a	Invitrogen	MA5-34830	AB_2848738	1/2000	1/200
Syntaxin-6		Souris	lgG1	BD Biosciences	610636	AB_397966	1/2000	1/500
2H9	HLV Lore	Souris	igul	I. Wakita	n/a	n/a	1/20000	n/a
CD4		Kabbit		Abcam	ab133616	AR <sup>7</sup> /0883	1/5000	1/200

Extraction et quantification des ARN viraux et cellulaires. Les ARN viraux ont été extraits des surnageants de culture à l'aide du kit QIAmp viral RNA (Qiagen) et extraits des cellules à l'aide du kit Nucleospin RNA Plus (Macherey & Nagel). L'étape de rétrotranscription des ARN viraux en ADNc a été réalisée à l'aide du kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA synthesis (Agilent Technologies) en suivant les recommandations du fabricant. Puis, les ARN viraux ont été quantifiés par RT-qPCR suivant en utilisant des amorces (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3' (F) et 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3' (R)) et une sonde (5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3') qui cible une région conservée chevauchante de l'ORF2/3. Dans certaines expériences, les ARN viraux ont été quantifiés par RT-qPCR en utilisant des amorces (5'-AAGACATTCTGCGCTTTGTT-3' (F) et 5'-TGACTCCTCATAAGCATCGC-3' (R)) et une sonde (5'-FAM-CCGTGGTTCCGTGCCATTGA-TAMRA-3') qui cible une région conservée de l'ORF1. Les amplifications ont été réalisées avec un appareil Quant Studio 3 (Applied Biosystems) à l'aide du Taqman universal mastermix no AmpErase UNA (Applied Biosytems). Les ARN cellulaires ont été quantifiés par RT-qPCR également en utilisant des amorces et des standards mis au point au laboratoire (Table 3). Les ARN cellulaires totaux ont été extraits avec du TRIzol (Life Technologies) en suivant les recommandations du fabricant et rétrotranscrits à l'aide du kit High-Capacity reverse transcription (Applied Biosystems). Les amplifications ont ensuite été réalisées avec l'appareil Quant Studio 3 (Applied Biosystems) et le SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems).

**Analyse transcriptomique**. Les cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN HEV- p6wt, HEV-p6-5R/5A, HEV-p6- $\Delta$ ORF3 ou sans ARN (Mock). Aì 18h post-électroporation (p.e.), les ARN cellulaires totaux ont été extraits à l'aide de TRIzol (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. L'intégrité et la pureté des ARN ont été vérifiées à l'aide du bioanalyseur Agilent System (Agilent Technologies). Deux µg d'ARN totaux ont été traités avec deux unités de DNase I (Sigma Aldrich) pendant 10 minutes avant d'être purifiés à l'aide de billes Nucleomag NGS cleanup (Macherey Nagel). La méthode de Microarrays oligonucléotidiques pour le génome humain entier (conception G4858A 072363, puces 8x60k SurePrint G3 sans restriction GE, Agilent Technologies) a été utilisée pour analyser l'expression génique du génome humain. Ainsi, 200ng d'ARN total ont été utilisés lors du marquage faisant intervenir le kit Agilent Quick-Amp conformément aux instructions du fabricant. Après purification à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen), le rendement en ARNc et l'efficacité d'incorporation (activité spécifique) au sein de l'ARNc ont été déterminés à l'aide d'un NanoDrop 2000 Spectrophotomètre (Thermo Scientific). Pour chaque échantillon, un total de 600ng d'ARNc a été fragmenté et hybridé pendant une nuit à 65°C. Après l'hybridation, les lames ont été lavées avant d'être scannées avec un SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies) pour ensuite être traitées à l'aide du Logiciel v10.7.3.1. Les fichiers texte R v4.0.3 obtenus ont été téléchargés et analysés à l'aide du logiciel LIMMA (Linear Model for Microarray Data). Une normalisation interne à la puce a été réalisée grâce à la méthode LOWESS (régression linéaire pondérée localement) afin de corriger les effets de coloration et spatiaux obtenus. La méthode t-statistic modérée à l'aide de la méthode empirical Bayes shrinkage of the standard errors a ensuite été utilisée afin de la calculer et d'étudier les modulations d'expression génique de manière significative. Les statistiques ont été corrigées via plusieurs tests en utilisant l'approche false-discovery rate. Le réseau d'interactions protéine-protéine a été généré à l'aide de la base de données STRING. L'enrichissement par ontologie génique a été effectué à l'aide de la base de données Metascape (www.metascape.org) afin d'identifier les voies cellulaires impactées de façon comparative entre la condition sauvage et les mutants.

Interférence ARN. Les cellules PLC3 électroporées avec de l'ARN p6-wt ou non (Mock) ont été transfectées de façon indépendante ou non avec 20nM de pools de petits ARN interférents (siRNA) (Horizon Discovery) ciblant la furine (ON-TARGETplus human Furin, gene 5045, siRNA SMART-pool), Rab11a (ON-TARGETplus human Rab11a, gene 8766, siRNA SMART-pool), Rab11b (ON-TARGETplus human Rab11b, gene 9230, siRNA SMART-pool), AP-1  $\gamma$ 1 (ON-TARGETplus human AP-1G1, gene 164, siRNA SMART-pool), la préséniline-1 (ON-TARGETplus human PSEN1, gene 5663, siRNA SMART-pool), la préséniline-2 (ON-TARGETplus human PSEN2, gene 5664, siRNA SMART-pool) et un siRNA contrôle (siCTL, ON-TARGETplus Non-targeting pool, siRNA SMART-pool) en utilisant la lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) en suivant les recommandations du fabricant. L'efficacité/impact de la transfection a ensuite été analysée en Western-blot, immunoprécipitation, immunofluorescence, quantification d'ARN et détermination des titres infectieux.

**Analyses statistiques.** Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels RStudio version 1.2.5001 combinée avec la version R 3.6.1 et Graphpad Prism version 9.5.0.

<u>Table 3 :</u> Séquence des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR sur les gènes cellulaires. Fw = amorce sens ; Rev = amorce antisens.

Nom de l'amorce / Cible	Séquence
hCCL2Fw / CCL2	CATGAAAGTCTCTGCCGCCC
hCCL2Rev / CCL2	GGGCATTGATTGCATCTGGCTG
hCCL20Fw / CCL20	TTGTGCGTCTCCTCAGTAAAAA
hCCL20Rev / CCL20	TCCAACCCCAGCAAGGTTC
hCXCL1Fw / CXCL1	CTTCCTCCTCCTTCTGGTC
hCXCL1Rev/ CXCL1	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG
hCXCL2Fw / CXCL2	GCTTCCTCCTTCCTTCTGGT
hCXCL2Rev / CXCL2	GGGCAGAAAGCTTGTCTCAA
hNFKBIAFw / NFKBIA	AAGGCCAGGTCTCCCTTCAC
hNFKBIARev / NFKBIA	CAGCAGCTCACCGAGGAC
hTNFAIP2Fw / TNFAIP2	CTACGCTGGCCGAGATCATT
hTNFAIP2Rev / TNFAIP2	CTCAGGTGGCCTTTGCTGAA
hTNFAIP3Fw / TNFAIP3	GGCCCGGAGAGGTGTTG
hTNFAIP3Rev / TNFAIP3	TCTTCTGGAGTTCTCTCCCGT

# Résultats

**Objectif #1 – Annexe 1 : Caractérisation du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 du HEV** 

a) Cinétique de translocation nucléaire de la protéine de capside ORF2

Afin de caractériser le mécanisme d'import nucléaire de la protéine de capside ORF2 du HEV, nous avons dans un premier temps réalisé une analyse cinétique de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2 dans les cellules PLC3 ou Huh-7.5 électroporées/infectées avec la souche p6-wt ou HEV83-2-wt de HEV-3 ou SAR55-wt de HEV-1, par immunofluorescence, 18h, 24h, 48h, 72h ou 6j post-électroporation/infection (p.e/p.i) **(Figure 31)**. Dans les cellules PLC3 électroporées avec la souche p6-wt (PLC3/HEV-p6), la protéine ORF2 présentait une localisation nucléaire maximale à 18h p.e et cette localisation nucléaire diminuait au cours du temps au profit d'une localisation cytosolique, maximale à 72h p.e **(Figure 31A)**. Ceci indique que la protéine ORF2 est transloquée dans le noyau puis exportée du noyau vers le cytoplasme des cellules infectées dès 48h p.e. De manière intéressante, les mêmes observations ont été réalisées avec les souches HEV83-2 de HEV-3 et Sar55 de HEV-1 **(Figure 31B & Figure 31C)**. Ceci suggère que le trafic nucléocytoplasmique de la protéine ORF2 est un mécanisme conservé chez d'autres souches de HEV-3 et de HEV-1.

Afin de contrôler que ces observations ne correspondent pas à des artéfacts dus à l'électroporation des cellules PLC3, la même expérience a été réalisée avec des cellules Huh-7.5 infectées avec des particules intracellulaires de la souche p6 de HEV-3 (Figure 31D). Les mêmes observations ont été faites qu'en cellules PLC3 électroporées avec cette même souche, mais avec un léger décalage temporel puisque la localisation nucléaire de la protéine ORF2 était maximale 48h p.i associée à une décroissance progressive pour atteindre un maximum à 6 j.p.i. A ce temps post-infection, plusieurs populations de cellules étaient observables. En effet, les cellules pour lesquelles l'ORF2 avait déjà subi son export nucléaire présentaient les valeurs de ratio d'intensité de fluorescence ORF2 Noyau/Cytoplasme (Fn/c) les plus faibles alors que les cellules nouvellement infectées, où la protéine ORF2 présentait majoritairement une localisation nucléaire, présentaient les valeurs de Fn/c les plus élevées (Figure 31C). Ces résultats montrent que les données présentées dans les figures 31A, 31B et 31C, ne sont pas attribuables à un artefact d'électroporation.

Analysées ensemble, les données obtenues suggèrent que la protéine ORF2 du HEV subit une translocation nucléaire aux temps précoces de l'infection, suivi par un mécanisme d'export nucléaire et que ce mécanisme est conservé chez les HEV-1 et HEV-3.



**Figure 31 :** Cinétique de localisation subcellulaire de la protéine ORF2 du HEV. Les cellules PLC3 électroporées avec l'ARN de souche p6 (A), Sar55 (B), HEV83-2 (C) et les cellules Huh-7.5 infectées avec des particules intracellulaires de souche p6 (D) ont été fixées aux temps indiqués. Des immunofluorescences indirectes ont été réalisées à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6. La quantification des ratios d'intensité de fluorescence Noyau/Cytoplasme ont été réalisées avec le logiciel Fiji (n  $\geq$  30 cellules). Les cellules PLC3 non électroporées (mock), électroporées avec mutant de la souche HEV83-2 déficient pour la réplication (PLC3/HEV83-2-GAD) et les cellules Huh-7.5 non infectées ont été utilisées comme contrôles.

#### b) Caractérisation du signal d'import nucléaire de la protéine ORF2

Afin d'identifier le signal d'import nucléaire (NLS) de la protéine ORF2, nous avons analysé la séquence primaire de la protéine à l'aide du logiciel NLSTradamus (Ba et al., 2009). Nous avons identifié un NLS potentiel au niveau de la région Nt de la protéine ORF2 qui correspond à une séquence conservée riche en résidus arginine que nous avons nommée ARM (pour Arginine Rich Motif : RRRGRR), situé en aval du peptide signal (Figure 32A). Pour analyser sa fonctionnalité, nous avons généré une série de mutants de l'ORF2 (Figure 32A) et caractérisé leur expression, leur distribution subcellulaire (Figure 32B et Figure 32C) ainsi que l'impact de ces mutations sur le cycle infectieux du HEV (Figure 32D) dans les cellules PLC3 électroporées avec l'ARN de la souche p6 de HEV-3 (PLC3/HEV-p6).

La mutation des résidus arginine de l'ARM en alanine (mutants 3R/3A, 2R/2A et 5R/5A) induisait une diminution drastique de la localisation nucléaire de la protéine ORF2, comparativement à la forme sauvage (Figure 32B et Figure 32C, « Nuclear extract »), indiquant que l'ARM est probablement un NLS fonctionnel. De plus, cette observation était corrélée à une accumulation de la protéine ORF2 dans l'appareil de Golgi (colocalisation avec le marqueur golgien GM130, données non présentées) ainsi qu'à une réduction de l'association membranaire de la protéine ORF2 (Figure 32C, « Membrane extract »), suggérant que chez ces mutants, la protéine ORF2 est soluble dans le lumen golgien. De manière intéressante, les mutations réalisées n'affectaient pas la stabilité ou le repliement de la protéine ORF2, comparativement à la forme sauvage, comme le montrent les immunoprécipitations réalisées avec les anticorps conformationdépendants 2E2 et 4B2, mis en rapport avec les Western-blot réalisés sur les extraits cellulaires totaux (Figure 32C). Des formes d'ORF2 de plus haut poids moléculaire ont été observées dans la fraction soluble des mutants 3R/3A et 5R/5A ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des formes ORF2g/c pour les trois mutants de l'ARM (Figure 32C). Ces résultats suggèrent que les mutations de l'ARM induisent une augmentation de la translocation réticulaire de la protéine ORF2 probablement due à une meilleure fonctionnalité du peptide signal de la protéine. La quantification des ARN viraux intracellulaires montrait que la réplication n'était pas affectée chez ces mutants (Figure **32D).** Également, les mutations de l'ARM n'affectaient pas l'expression de la protéine ORF3 (Figure 32C). Néanmoins, ces mutants ne produisaient plus de particules infectieuses (Figure 32D). Ces résultats montrent que l'ARM est un NLS fonctionnel. Ce

motif joue probablement un rôle important dans la régulation de la translocation réticulaire de la protéine ainsi que dans le mécanisme d'assemblage des particules infectieuses.

Nous avons également généré des mutations au niveau des résidus 25, 26 et 27 (respectivement une proline, une sérine et une glycine) qui ont été remplacés par trois arginines (mutant PSG/3R) ainsi que des mutants où le peptide signal a été partiellement (mutant  $\triangle$ SP1) ou totalement (mutant  $\triangle$ SP) délété **(Figure 32A)**. Le mutant PSG/3R présentait une augmentation de la localisation nucléaire de la protéine ORF2 **(Figure 32B) et Figure 32C)** tout en présentant une abolition de la sécrétion des formes ORF2g/c **(Figure 32C, « Supernatants »)**, de façon similaire aux mutants de délétion du peptide signal  $\triangle$ SP et  $\triangle$ SP1. Ces résultats indiquent que l'addition de résidus d'arginine renforce probablement la fonctionnalité du NLS mais inhibe la fonctionnalité du peptide signal. Le mutant PSG/3R présentait également une diminution de la réplication virale et n'était plus du tout infectieux **(Figure 32D)**. L'augmentation de la localisation nucléaire de la protéine ORF2 chez ce mutant semblait donc être à l'origine de la réduction du niveau de réplication virale et d'assemblage viral.

Comme attendu, les mutants de délétion partielle ( $\Delta$ SP1) ou totale ( $\Delta$ SP) du peptide signal de la protéine ORF2 présentaient un défaut de sécrétion des formes ORF2g/c (Figure 32C). Bien que l'expression ou la stabilité de la protéine ORF2 était réduite chez le mutant  $\Delta$ SP1 (Figure 32C), les deux mutants présentaient une localisation nucléaire marquée (Figure 32B et Figure 32C), indiquant que le processus de translocation nucléaire de l'ORF2 est indépendant de son processus de translocation réticulaire. L'ORF2 et l'ORF3 étant chevauchants, et la protéine ORF3 étant essentielle à la sécrétion des particules virales, les deux mutants de délétion du peptide signal n'exprimaient plus la protéine ORF3 (Figure 32C) et présentaient donc une réduction des titres infectieux extracellulaires. Néanmoins, le mutant  $\Delta$ SP présentait en plus une diminution des titres infectieux intracellulaires (Figure 32D). Ces résultats indiquent donc que le peptide signal de la protéine ORF2 joue probablement un rôle dans la réplication et l'assemblage des particules infectieuses.



Figure 32 : La protéine ORF2 contient un motif riche en Arginine important pour sa localisation nucléaire. (A) Alignement des séquences de la protéine ORF2 sauvage (wt) de la souche p6 de HEV-3 comparativement aux mutants de l'ARM et du peptide signal (ARM/SP). (B) Localisation subcellulaire de la protéine ORF2 sauvage et des mutants ARM/SP. Les cellules PLC3 ont été electroporées avec l'ARN p6 sauvage ou muté. A 18h h.p.e des immunofluorescences indirectes ont été réalisées avec l'anticorps 1E6 et analysées en microscopie confocale (grossissement x63). Rouge = ORF2 ; Bleu = DAPI ; Échelle = 20µM. Les ratios d'intensité de fluorescence noyau/cytosol ont été calculés à l'aide de Fiji (n  $\geq$  30). (C) Extraction subcellulaire à partir de cellules PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage ou les mutant ARM/SP à 10 j.p.e. La protéine ORF2 a été détectée avec l'anticorps 1E6. Les formes ORF2 glycosylée (ORF2g), clivée (ORF2c), intracellulaire (ORF2intra), nucléaire ORF2intra (ORF2ni), nucléaire et clivée ORF2intra (ORF2nc) sont indiquées. La protéine ORF3 a été détectée avec un anticorps polyclonal de lapin. La tubuline (cytosol), la calnexine (membranes) et SP1 (nucléaire soluble) ont été utilisés comme contrôle de la qualité d'extraction. Les anticorps 2E2 et 4B2 sont des anticorps dépendants de la conformation de l'ORF2. Les poids moléculaires sont indiqués sur la droite (kDa). (D) La détermination des titres infectieux et la quantification de l'ARN viral ont été réalisés en PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage ou les mutants ARM/SP. Les particules virales intracellulaires et extracellulaires ont été extraites à 10 j.p.e et utilisées pour infecter des cellules Huh-7.5 pendant 3j. Puis des immunofluorescences ont été réalisées. Les résultats ont été exprimés en FFU/mL (n=4). Les ARN viraux intracellulaires et extracellulaires ont été quantifiés à 10 j.p.e par RT-qPCR.

Enfin, le résidu Gly31 hautement conservé a été muté en alanine (mutant G/A, **Figure 32A**). Ce mutant présentait une distribution subcellulaire semblable à la forme sauvage et exprimait normalement la protéine ORF3 (**Figure 32B et Figure 32C**). Ce mutant présentait une légère réduction des titres infectieux intracellulaires et une réduction des titres infectieux et ARN extracellulaires plus marquée. Ceci indique que la mutation G/A affecte la sécrétion des particules virales.

Ensuite, nous avons réalisé une étude comparative des séquences de NLS présentes au niveau de protéines virales et des importines qui les reconnaissent. Nous avons observé que l'ARM de la protéine ORF2 du HEV était similaire au NLS riche en arginine (RRVRRR) de l'antigène nucléaire leader du virus Epstein-Barr (EBNA-LP) qui interagit avec l'importine- $\alpha$ 1 (Nakada et Matsuura, 2017). De manière intéressante, la protéine ORF2 et l'importine- $\alpha$ 1 colocalisent dans le noyau des cellules infectées, ceci avec une valeur de PCC de 0,670, et la mutation de l'ARM affecte drastiquement cette colocalisation (Figure 33A). Également, nous avons réalisé des expériences de ligation de proximité (PLA) en utilisant l'anticorps anti-ORF2 1E6 et un anticorps anti-l'importine- $\alpha$ 1 en PLC3/HEV-p6-wt, PLC3/HEV-p6-5R/5A, PLC3/HEV-p6-PSG/3R et PLC3/Mock (Figure 33B). Dans les cellules exprimant la protéine ORF2-wt ou le mutant PSG/3R plus de cinq spots/cellules étaient comptés alors que dans les cellules exprimant le mutant 5R/5A ou les cellules contrôles PLC3-Mock (PLC3), ce nombre de spots/cellule était quasiment nul. Ces résultats montrent que la protéine ORF2 et l'importine- $\alpha$ 1 colocalisent et interagissent probablement dans les cellules PLC3/HEV-p6 grâce à l'ARM présent dans la séquence de la protéine ORF2 et qui sert de NLS fonctionnel. De plus, l'ensemble des

résultats indiquent que l'ARM est impliqué dans la régulation fine de l'adressage et la stœchiométrie de la protéine ORF2 entre les compartiments nucléaires, cytosoliques et réticulaires. Cette stœchiométrie semble être essentielle au cycle infectieux du HEV.







**Figure 33 :** La protéine ORF2 colocalise et interagit avec l'importine- $\alpha$ 1. (A) Les cellules PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage (wt) ou les mutants ARM/SP ont été analysées par immunofluorescence indirecte à 18 h.p.e. Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie confocale (grossissement X63). Échelle = 20 µm. Les valeurs de PCC ont été calculées en utilisant le plugin JACoP du logiciel Fiji en utilisant la totalité de l'aire cellulaire comme ROI (n  $\geq$  30 cellules). Rouge = ORF2 ; Vert = importine- $\alpha$ 1 ; Bleu = DAPI. (B) Les cellules PLC3/HEV-p6-wt, PLC3/HEV-p6-5R/5A, PLC3/HEV-p6-PSG/3R et PLC3 mock ont été utilisées pour des expériences de ligation de proximité (PLA) avec l'anticorps anti-ORF2 1E6 et l'anticorps anti-importine- $\alpha$ 1 à 18 h.p.e. Des piles d'images correspondant à la totalité du volume de la cellule ont été réalisées. Pour chaque condition, douze champs de cellules ont été analysés (nombre total de cellules  $\geq$  165). Des régions d'intérêt de champs représentatifs sont présentées (gauche) avec les quantifications du nombre de spots/cellule (droite).

# c) Rôle de la translocation nucléaire de la protéine de capside ORF2 sur l'expression génique de l'hôte infecté

Nous avons montré que la protéine ORF2 présentait une localisation nucléaire (ORF2ni) grâce à l'ARM qui sert notamment de NLS fonctionnel. Nous avons également montré que l'ORF2ni était détectée de façon maximale dès 18 h.p.e en PLC3/HEV-p6 (HEV-3) et PLC3/HEV-Sar55 (HEV-1) **(Figure 31A et Figure 31B)**. Nous avons donc cherché ensuite à comprendre l'impact de cette translocation nucléaire précoce sur l'expression génique de l'hôte infecté. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par microarrays (Agilent SurePrint Technology) en PLC3/HEV-p6-wt, PLC3/HEV-p6-5R/5A, PLC3/HEV-p6-△ORF3 et PLC3/Mock à 18 h.p.e **(Figure 34)**. Le mutant HEV-p6-△ORF3 n'exprime plus la protéine ORF3 (**Figure 34C** ; Graff et al., 2006).

De manière intéressante, dans les cellules PLC3/HEV-p6-wt et PLC3/HEV-p6- $\varDelta$ ORF3, une inhibition significative de sept gènes associés aux voies TNF $\alpha$ , IL-17, NF- $\kappa$ B ainsi qu'à la réponse inflammatoire (comme la réponse associée au récepteurs NOD-like) a été observée (Figure 34A). En revanche, aucune différence en termes d'expression génique n'a été observée dans les cellules PLC3/HEV-p6-5R/5A, soulignant l'importance de la translocation nucléaire de la protéine ORF2 dans l'inhibition observée. Des études ont montré que la protéine virale ORF3 était capable de moduler les réponses de l'hôte (Dong et al., 2012 ; Lei et al., 2018 ; Wang et al., 2018 ; He et al., 2016 ; Nan et al., 2014 ; Xu et al., 2014). Pour autant, aucune différence significative en termes d'expression génique n'a été observée entre les cellules PLC3/HEV-p6-wt et les cellules PLC3/HEV-p6- $\varDelta$ ORF3, ainsi qu'en terme de localisation subcellulaire de la protéine ORF2 (localisation nucléaire, Figure 34B) indiquant que la modulation observée de l'expression génique et la localisation nucléaire de l'ORF2 sont indépendants de la protéine ORF3. L'ensemble des résultats obtenus par microarrays a été confirmé par RT-qPCR (Figure 34D).

Ces résultats montrent que l'ARM, en plus d'être responsable de la translocation nucléaire de la protéine ORF2, est également impliqué dans la modulation de l'expression génique de l'hôte infecté, notamment vis-à-vis de la voie NF- $\kappa$ B induite par l'infection. D'autres études seront maintenant nécessaires pour comprendre plus précisément l'impact de cette modulation de l'expression génique sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire ou humorale, notamment.



Figure 34 : La translocation nucléaire précoce de la protéine de capside ORF2 module l'expression génique de l'hôte infecté. (A) Analyse transcriptomique de cellules PLC3 exprimant le HEV-p6 sauvage, mutant ou Mock par microarrays (Agilent SurePrint Technology). A gauche, Heatmap de l'expression génique de PLC3 exprimant le HEV-p6 sauvage, mutant ou Mock à 18 h.p.e. Le code couleur représente le log Fold-Change (logFC) de l'expression génique dans les conditions indiquées. Au milieu, représentation du réseau d'interaction protéine-protéine des gènes modulés par la protéine ORF2 (String database). A droite, les voies de signalisation induites par la translocation nucléaire de la protéine ORF2 et identifiées par Gene Ontology Enrichment à l'aide de Metascape. (B) Images représentatives de la localisation subcellulaire en PLC3/HEV-p6 de la protéine ORF2 sauvage, présentant les mutation 5R/5A, ⊿ORF3 ou Mock à 18 h.p.e, soit le même temps auquel les expériences de transcriptomique ont été réalisées. Les cellules ont été analysées par microscopie confocale (grossissement X63). Rouge = ORF2 ; Bleu = DAPI ; barre d'échelle = 20µM. (C) Images représentatives montrant l'expression de la protéine ORF3 dans les cellules utilisées pour l'analyse transcriptomique à 6 j.p.e du fait de la faible expression de la protéine aux temps précoces de l'infection. Des co-marguages ORF2-ORF3 ont été réalisés et analysées en microscopie confocale (grossissement X63). Rouge = ORF2 ; Bleu = DAPI ; barre d'échelle = 20μM. (D) Les ARN intracellulaires ont été quantifiés par RT-qPCR à l'aide de sonde ciblant CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2, NFKBIA, TNFAIP2 ou TNFAIP3. La quantification des ARN viraux intracellulaire a été réalisée avec une sonde ciblant l'ORF1. n ≥6.

### d) Caractérisation du(des) signal(-aux) d'export nucléaire de la protéine de capside ORF2 du HEV

Le fait d'observer que la localisation nucléaire de la protéine de capside ORF2 est transitoire et diminue avec le temps (Figure 31), nous a ensuite poussé à étudier le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2. Nous avons traité des cellules PLC3/HEV-p6 avec des inhibiteurs d'export nucléaire, la leptomycine B (LepB) et le Verdinexor (Verd) (Figure 35A). La LepB et le Verd sont, respectivement, des inhibiteurs irréversibles et réversibles de l'Exportine1/CRM1 (Receptor chromosome maintenance protein 1), qui reconnait des motifs hydrophobes riches en leucine (Mathew et al., 2017). Après traitement, les cellules présentaient une accumulation nucléaire significative par rapport aux conditions contrôle (EtOH et DMSO, respectivement). Ces observations ont été également faites en PLC3/HEV83-2 et en cellules Huh-7.5 infectées avec des particules virales intracellulaires (données non montrées). Ces résultats indiquent que l'exportine CRM1 est probablement impliquée dans le mécanisme d'export nucléaire de la protéine ORF2. Ensuite, nous avons montré que la protéine ORF2 et CRM1 colocalisaient partiellement ou de façon transitoire dans des cellules PLC3/HEV-p6 non traitées alors que les deux protéines colocalisaient de façon significative après traitement avec la LepB ou le Verd (Figure 35A). Également, nous avons réalisé des expériences de ligation de proximité (PLA) avec un anticorps anti-ORF2 (1E6) et un anticorps anti-CRM1. Les résultats montraient que les protéines ORF2 et CRM1 interagissent probablement (Figure 35B). L'ensemble de ces données montre que la protéine ORF2 subit un mécanisme d'export nucléaire dépendant de l'exportine CRM1.

L'exportine CRM1 reconnaît des motifs hydrophobes riches en leucine. En analysant la séquence primaire de la protéine ORF2, nous avons identifié douze motifs correspondant à des sites d'export nucléaire (NES) potentiels. Nous avons réalisé des mutations des résidus de Leucine en Alanine au niveau de ces sites et caractérisé ces mutants. La plupart des mutations réalisées n'affectait pas la localisation subcellulaire de la protéine ORF2 dans des expériences d'immunofluorescence indirecte. Néanmoins, les mutations de trois motifs conservés, appelés NES9, NES10 et NES12 (Figure 35B) induisaient une accumulation nucléaire significative de la protéine ORF2 (Figure 35C) ainsi qu'une proximité avec CRM1 (Figure 36A), comme observé avec les inhibiteurs pharmacologiques. Bien que la réplication virale n'était pas affectée par ces mutations (Figure 35F), les mutants NES9 et NES10 n'étaient plus infectieux et le mutant NES12 présentait une diminution drastique des titres infectieux (Figure 35E). En réalisant des expériences d'immunoprécipitations à l'aide des anticorps conformation-dépendants 2E2 et 4B2, nous avons observé que la protéine ORF2 issue des mutants NES9 et NES10 était mal repliée, contrairement à celle du mutant NES12 (Figure 35D, IP 2E2 et IP 4B2). Ces résultats suggèrent que les motifs NES9 et NES10 sont probablement des NES fonctionnels mais leur mutation affecte le repliement de la protéine ORF2 et donc l'assemblage des particules infectieuses. En revanche, la réduction d'infectiosité observée pour le mutant NES12 est probablement uniquement due à un défaut de localisation subcellulaire de la protéine ORF2 et non à un défaut de réplication ou de repliement de la protéine.



Figure 35 : Export nucléaire de la protéine ORF2. (A) Les cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées 32 h.p.e avec 20nM de Leptomycine B (LepB), 100nM de Verdinexor (Verd) ou avec le diluant (EtOH ou DMSO, respectivement) pendant 16h. Puis les cellules ont été analysées par microscopie confocale après marquage avec l'anticorps anti-ORF2 1E6 (grossissement X63). Rouge = ORF2 ; Vert = CRM1 ; Bleu = DAPI ; barre d'échelle = 20µM. (B) Représentation schématique de la séquence primaire de la protéine ORF2 de HEV-p6 mettant en évidence les sites NES étudiés (NES9, NES10 et NES12). (C) Localisation subcellulaire de la protéine ORF2 sauvage ou mutée (NES9, NES10 et NES12), 48 h.p.e. Les Fn/c ont été déterminés à l'aide du logiciel Fiji. Rouge = ORF2 ; barre d'échelle = 20µM. (D) Extraction subcellulaire de cellules PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage ou les mutants NES à 4 j.p.e. Le fractionnement a été réalisé avec le kit « Subcellular fractionation kit for cultured cells ». La protéine ORF2 a été détectée avec l'anticorps 1E6. Les formes ORF2 glycosylée (ORF2g), clivée (ORF2c), intracellulaire (ORF2intra), nucléaire ORF2intra (ORF2ni), nucléaire et clivée ORF2intra (ORF2nc) sont indiquées. La protéine ORF3 a été détectée avec un anticorps polyclonal de lapin. La tubuline (cytosol), la calnexine (membranes) et SP1 (nucléaire soluble) ont été utilisés comme contrôle de la qualité d'extraction. Les anticorps 2E2 et 4B2 sont des anticorps conformationnels. Les poids moléculaires sont indiqués sur la droite (kDa). La détermination des titres infectieux (E) et la quantification de l'ARN viral (F) ont été réalisés en PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage ou les mutants NES. Les particules virales intracellulaires et extracellulaires ont été extraites 10 j.p.e et utilisées pour infecter des cellules Huh-7.5 pendant 3j. Puis des immunofluorescences ont été réalisées. Les résultats ont été exprimés en FFU/mL (n=4). Les ARN viraux intracellulaires et extracellulaires ont été quantifiés 10 j.p.e par RT-qPCR.

Analysés ensemble, les résultats obtenus indiquent que le HEV a mis au point un mécanisme d'export de sa protéine de capside ORF2. Ce mécanisme fait intervenir CRM1 qui reconnaît trois sites NES sur la protéine ORF2. De plus, ces résultats montrent à nouveau qu'il existe une stœchiométrie fine entre les voies nucléaires, cytosoliques et réticulaire, qui est importante pour le déroulé du cycle infectieux du HEV.



**Figure 36 :** La protéine ORF2 et l'exportine CRM1 colocalisent et interagissent en cellules PLC3/HEV-p6. (A) Les cellules PLC3/HEV-p6 exprimant la protéine ORF2 sauvage ou les mutants NES ont été analysées par immunofluorescence indirecte à 48 h.p.e. Puis les cellules ont été analysées par microscopie confocale (grossissement X63). Rouge = ORF2 ; Vert = CRM1 ; Bleu = DAPI ; barre d'échelle =  $20\mu$ M. Les valeurs de PCC ont été calculées à l'aide du plugin JACoP du logiciel Fiji en utilisant la cellule entière comme ROI. n  $\ge 30$ . (C) Les cellules PLC3/HEV-p6-wt, PLC3/HEV-p6-NES12 et PLC3/Mock ont été utilisées dans des expériences de ligation de proximité (PLA) avec les anticorps anti-ORF2 1<sup>E</sup>6 et anti-CRM1 à 48 h.p.e. Des piles d'images correspondant à la totalité du volume de la cellule ont été réalisées. Pour chaque condition, douze champs de cellules ont été analysées (nombre total de cellules  $\ge 165$ ). Des régions d'intérêt de champs représentatifs sont présentées (gauche) avec les quantifications du nombre de spots/cellule (droite). Barre d'échelle =  $20\mu$ M. L'article dans lequel ces travaux ont été publiés intègre une autre partie de mes travaux de thèse concernant la maturation protéolytique des formes ORF2g/c (voir « Résultats > IV) > a) »). Également, une partie du travail de thèse du Dr Kévin Hervouet où il a pu montrer que l'ARM régulait négativement la fonctionnalité du peptide signal et donc la topologie de la protéine ORF2 y a aussi été intégrée. Dans la majorité des cas, le peptide signal permet la translocation réticulaire de la protéine ORF2 dans la lumière du réticulum endoplasmique, aboutissant à la production des formes ORF2g/c glycosylées et massivement sécrétées. Dans certains cas (environ 1x/1000), l'ARM exerce une répulsion électromagnétique, du fait de ses charges positives, vis-à-vis du canal du translocon, empêchant sa translocation. Alors, la protéine ORF2 reste ancrée dans les membranes de la voie de sécrétion au niveau de la face cytosolique de celles-ci, par le biais de son extrémité Nt, aboutissant à la formation de la forme ORF2i **(Figure 37)**.



<u>Figure 37 : Modèle de régulation de l'adressage subcellulaire de la protéine de capside ORF2 du HEV par l'ARM.</u> Adapté de Hervouet et al., 2022.

#### **Objectif #2 – Annexe 2 : Identification et caractérisation des usines virales du HEV**

#### a) Résumé des résultats du projet

Dans ce projet de recherche, nous avons généré des anticorps monoclonaux spécifiques de la forme ORF2i selon deux stratégies distinctes (P1 et P2) ainsi qu'un anticorps capable de reconnaître les formes ORF2i/g/c de façon semblable à l'anticorps commercial 1E6 (stratégie P3). Plus particulièrement, nous avons montré que l'anticorps P1H1, reconnaissant l'extrémité Nt de la protéine ORF2i, était capable de reconnaître les particules virales délipidées issues de surnageant de culture cellulaire ou de sérums de patients. En collaboration avec l'équipe du Dr Stéphane Bressanelli (I2BC, Gif-sur-Yvette), nous avons mis en évidence à l'aide de modélisations AlphaFold2 que l'épitope reconnu par l'anticorps P1H1 était exposé à la surface des particules virales.

Les anticorps générés ont ensuite été utilisés pour identifier les usines virales dans des cellules électroporées avec l'ARN de la souche p6 de HEV-3 et/ou infectées avec des particules virales de la souche p6. En microscopie confocale, nous avons mis en évidence des accumulations périnucléaires compactes composées des protéines virales ORF1, ORF2 et ORF3 ainsi que de l'ARN viral. Des analyses en microscopie électronique, réalisées en collaboration étroite avec la plateforme de microscopie électronique de l'Université de Tours, dirigée par le Pr Philippe Roingeard, ont permis de mettre en évidence un réseau sans précédent de structures tubulaires et vésiculaires. Nous avons montré que ces structures étaient dépendantes de l'assemblage de la protéine ORF2i et de l'expression de la protéine ORF3. Une analyse poussée de colocalisation entre les protéines virales et différents marqueurs de compartiments cellulaires couplée à des expériences d'interférence ARN (siRNA) ont permis de montrer que ces structures dérivent du compartiment endosomal de recyclage (ERC) au niveau duquel la protéine Rab11 est un acteur essentiel.

Dans cette étude, nous avons identifié les usines virales du HEV pour la première fois et mis en évidence que le HEV détournait l'ERC pour former un réseau membranaire composé de structures vésiculaires et tubulaires qui pourraient être la marque de fabrique de l'infection par le HEV.

#### b) Ma contribution dans le projet

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai participé activement à ce projet portant sur la mise au point et la caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine ORF2i puis sur l'identification et la caractérisation des usines virales du HEV. Plus en détails, j'ai caractérisé l'impact des mutations 5R/5A et ⊿ORF3 sur la détection des accumulations périnucléaires de protéines virales, d'ARN viraux et de la protéine Rab11 en microscopie confocale (Figure 5 de l'article). J'ai aussi réalisé un certain nombre de calculs des valeurs de coefficient de Manders. Également, j'ai réalisé des électroporations de cellules PLC3/HEV-p6 afin d'utiliser ces cellules pour des immunomarquages et analyses en microscopie électronique. Enfin, j'ai généré les cellules PLC3/HEV-p6 transfectées avec des siRNA ciblant la protéine Rab11 (Figure 11 de l'article), un effecteur central de l'ERC, utilisées pour caractériser l'importance du détournement de ce compartiment par le HEV pour le cycle infectieux. Sur ces mêmes cellules, j'ai réalisé les expériences de titre infectieux et les expériences en réplicon stable (PLC3-réplicon) pour analyser l'impact du silencing de Rab11 sur la réplication et la production de particules virales infectieuses du HEV.

## **Objectif #3 - Annexe 3 : Étude du mécanisme d'adressage de la protéine de capside ORF2i aux usines virales du HEV**

#### a) Rationnel

Les résultats issus de mes deux premiers projets de thèse suggèrent que l'adressage de la protéine ORF2 est régulé par l'ARM afin de produire au niveau luminal de la voie de sécrétion les formes ORF2g/c glycosylées massivement sécrétées, ou au niveau de la face cytosolique des membranes, la forme ORF2i qui constitue la forme infectieuse. Nous avons également montré en microscopie confocale que la protéine ORF2i était retrouvée au niveau d'accumulation périnucléaire, avec la protéine ORF1, la protéine ORF3, l'ARN viral et des effecteurs de l'ERC (Rab11 notamment). L'ERC est également un compartiment membranaire.

Ces résultats ont soulevé un certain nombre de questions de recherche. Notamment, les mécanismes d'adressage des différentes protéines virales à l'ERC ne sont pour l'heure pas connus et notamment le mécanisme d'adressage de la protéine ORF2i, un effecteur central du cycle infectieux du HEV.

Les complexes adapteurs, ou adaptines, sont des complexes hétérotétramériques impliqués dans le trafic vésiculaire dépendant de la clathrine et qui ont un rôle dans l'adressage subcellulaire des protéines d'un compartiment membranaire donneur vers un compartiment membranaire accepteur. De manière intéressante, le complexe adpateur AP-1 est impliqué dans le trafic vésiculaire bidirectionnel entre les membranes de la voie de sécrétion (plus particulièrement du TGN) et le compartiment endosomal tardif, dont fait partie l'ERC. De plus, un certain nombre de virus exploite ce complexe pour l'adressage subcellulaire de leurs protéines virales, comme le virus de la varicelle (Varicella-Zoster), le HCV ou le SARS-CoV-2.

L'objectif de mon troisième projet de thèse était donc de caractériser le rôle de l'adaptine AP-1 dans l'adressage subcellulaire de la protéine ORF2i, puis de caractériser son rôle plus largement dans le cycle infectieux du HEV.
#### b) Résultats obtenus

#### Colocalisation et interaction de la protéine de capside ORF2i avec l'adaptine AP-1

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans l'adressage de la protéine ORF2i vers l'ERC, nous avons analysé l'importance du complexe AP-1 dans ce processus en réalisant des analyses de colocalisation entre les deux marqueurs (Figure 38). Dans un premier temps, des cellules PLC3 ont été électroporées avec l'ARN de la souche p6 de HEV-3 (PLC3/HEV-p6) ou non (PLC3/Mock) (Figure 38A). Puis, l'analyse de la colocalisation entre la protéine ORF2i (anticorps P1H1) et l'adaptine AP-1 a été réalisée à 6 j.p.e. Nous avons analysé l'overlap d'intensité de fluorescence entre les marquages associés à la protéine ORF2i et l'adaptine AP-1 (Figure 38A) et calculé les valeurs de coefficient de Manders (MOC) du signal ORF2i dans le signal AP-1 (Figure 38F). Une accumulation périnucléaire de la protéine ORF2i était observable, conformément à ce que nous avions décrit précédemment (Bentaleb et al., 2022). L'adaptine AP-1 montrait un marquage périnucléaire et cytosolique en accord avec sa localisation au niveau du TGN et des endosomes tardifs. De manière intéressante, le marquage associé à la protéine ORF2i était superposable au marquage associé à l'adaptine AP-1 (Figure 38A), avec une valeur de MOC égale à 0,86 (Figure 38F), indiquant que la protéine ORF2i et l'adaptine AP-1 sont fortement colocalisées dans les cellules PLC3/HEV-p6. De plus, l'analyse de cellules Huh-7.5 électroporées avec l'ARN (Figure 38B), ou infectées avec des particules virales intracellulaires (Figure 38C), de la souche p6 de HEV-3, a montré que les deux marqueurs colocalisaient hautement également, dans les régions périnucléaires avec des valeurs de MOC de 0,83 et 0,81, respectivement (Figure 38F). Des analyses de microscopie à haute résolution ont également révélé que les deux marquages superposaient fortement également (Figure 38B et Figure 38C). Ces données suggèrent que la colocalisation ORF2i/AP-1 n'est pas un artéfact d'électroporation et n'est pas non plus un mécanisme spécifique d'un type cellulaire.

Afin de renforcer nos observations, nous avons étendu notre analyse au HEV-1 en transfectant des constructions exprimant la protéine ORF2 de HEV-1 (souche Sar55) ou de HEV-3 (souche p6) dans les cellules H7-T7-IZ, qui expriment stablement l'ARN polymérase T7 (Romero-Brey et al., 2012). Dans ce contexte, les protéines ORF2 de HEV-1 et de HEV-3 présentent une localisation subcellulaire similaire, comme nous l'avions décrit précédemment (Hervouet et al., 2022). Elle est caractérisée par une accumulation



**Figure 38 :** La protéine ORF2i de HEV-1 et HEV-3 colocalise avec l'adaptine AP-1 dans des lignées cellulaires d'hépatome humain. Les cellules PLC3/HEV-p6 (A) et Huh-7.5/HEV-p5 (B) ont été fixées 6 j.p.e et les cellules Huh-7.5 infectées avec des particules virales intracellulaires (C) ont été fixées 12 j.p.i. Les cellules H7-T7-IZ transfectées avec les plasmides pTM-ORF2-p6 (D) ou pTM-ORF2-Sar55 (E) ont été fixées 24 h.p.t. Des immunofluorescences indirectes ont ensuite été réalisées avec les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-AP-1/1. Rouge = ORF2 ; Vert = AP-1 ; Bleu = DAPI. Barre d'échelle = 20µM. (A-E) A droite sont présentés les graphes d'intensité de fluorescence qui a été mesurée tous les 50nm au niveau de la ligne blanche visible sur chaque panel « Merge ». (F) Valeurs de coefficient de Manders (MOC) du marquage ORF2i dans le marquage AP-1, réalisé avec le plugin JACoP du logiciel Fiji, en utilisant la totalité de la cellule comme ROI.

périnucléaire de la protéine ainsi que par un profil plus diffus dans le cytosol **(Figure 38D) et Figure 38E).** De manière intéressante, les protéines ORF2 de HEV-1 et de HEV-3 ont montré une colocalisation avec l'adaptine AP-1 dans les régions périnucléaires, avec des valeurs de MOC de 0,76 et 0,77, respectivement **(Figure 38F)**. De plus, les intensités de fluorescence des marquages ORF2 et AP-1 étaient parfaitement superposables (**Figure 36D et Figure 36E**), indiquant que la colocalisation ORF2i/AP-1 est conservée chez les HEV-1 et HEV-3.

Dans un second temps, nous avons cherché à observer si la protéine ORF2i et l'adaptine interagissaient dans les cellules PLC3/HEV-p6, à 7 j.p.e (Figure 39). D'abord, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation (Figure 39A). En WB direct sur les lysats cellulaires, l'adaptine AP-1 était détectée à des intensités similaires entre les cellules PLC3/HEV-p6 et PLC3/Mock là où la protéine ORF2i était détectée uniquement dans les cellules PLC3/HEV-p6 (Figure 39A, « inputs »). Après immunoprécipitation de l'adaptine AP-1 avec un anticorps polyclonal anti-AP-1/1, une bande correspondant à l'ORF2i était détectée dans les cellules PLC3/HEV-p6 et pas dans les cellules PLC3/Mock ou la condition isotype contrôle, indiquant que la protéine ORF2i était spécifiquement co-immunoprécipitée avec le complexe AP-1 (Figure 39A, IP AP-1). Il est important de noter que l'immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps P1H1 a été réalisée mais n'a pas permis de détecter l'adaptine AP-1, probablement parce que l'épitope reconnu par l'anticorps P1H1 est masqué par l'interaction. Puis, nous avons confirmé ces données par une approche de ligation de proximité (PLA) (Figure 39B). Dans les cellules PLC3/HEV-p6 (p6-H2O), une moyenne de 2,5 spots/cellule a été dénombrée alors qu'une moyenne de 0,2 spots/cellules a été dénombrée dans les cellules mock (PLC3-H20) (Figure 39B), confirmant que la protéine ORF2i et l'adaptine AP-1 interagissent.

L'adaptine AP-1 peut être inhibée de façon spécifique par le composé A5 qui est un inhibiteur pharmacologique bien caractérisé (Duncan et al., 2005 ; Zallochi et al., 2012 ; Yasamut et al., 2015). Le composé A5 est un dérivé de piperazinyl phényléthanone qui est capable d'entrer dans la cellule. Il inhibe le complexe AP-1 après son recrutement au niveau des membranes, inhibant également tout le trafic subcellulaire dans lequel le complexe est impliqué (Duncan et al., 2007). Nous avons alors testé la capacité de cette molécule, à la dose non-cytotoxique de 150  $\mu$ M (données non présentées), à inhiber l'interaction entre la protéine ORF2i et l'adaptine AP-1 (p6-A5) en PLA **(Figure 39B)**. De

manière intéressante, la molécule A5 induisait une réduction significative du nombre de spots/cellule (<1 spot/cellule) comparativement au contrôle (p6-H2O) **(Figure 39B)**, confirmant la spécificité de l'interaction ORF2/AP-1 observée.

Analysés ensemble, ces résultats indiquent que la protéine ORF2i et l'adaptine AP-1 colocalisent et interagissent que ce soit dans le contexte du HEV-1 et/ou du HEV-3, dans des cellules d'hépatome humain.



Figure 39 : La protéine de capside ORF2i interagit avec l'adaptine AP-1 dans les cellules PLC3/HEV-p6. (A) Des lysats cellulaires de cellules PLC3/HEV-p6 et PLC3/Mock ont été générés après cross-linking avec 1% de paraformaldéhyde. Puis ces lysats ont été soumis à des expériences de coimmunoprécipitation à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre AP-1G1 afin de montrer l'interaction ORF2i/AP-1. Un anticorps anti-Ig total de lapin a été utilisé comme contrôle isotypique (Iso). (B) Les cellules PLC3/HEV-p6/Diluent, PLC3/HEV-p6/A5-150µM et PLC3/Diluent ont été utilisées pour réaliser des expériences de ligation de proximité (PLA) à l'aide de l'anticorps anti-ORF2i P1H1 et d'un anticorps anti-AP-1G1 après trois jours de traitement. Des piles d'images correspondant à la totalité du volume de la cellule ont été réalisées. Pour chaque condition, douze champs de cellules ont été analysées (nombre total de cellules ≥ 165). Des régions d'intérêt de champs représentatifs sont présentées avec les quantifications du nombre de spots/cellule (en bas à droite). Barre d'échelle = 20µm.

Inhibition pharmacologique d'AP-1 : Impact sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i et sur l'infectiosité virale

Nous avons ensuite cherché à caractériser l'importance de l'interaction entre la protéine de capside ORF2i et le complexe AP-1, dans le cadre du cycle infectieux du HEV. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps réalisé une analyse extensive en immunofluorescence afin de caractériser l'impact du traitement avec le composé A5 sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i et sur sa colocalisation avec d'autres

marqueurs cellulaires ou viraux. Les analyses ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-ORF2i P1H1 et des anticorps ciblant des marqueurs liés au trafic de l'adaptine AP-1 (AP-1, récepteur au mannose-6-phosphate et clathrine), au TGN (TGN46, syntaxine-6), à l'ERC (Rab11) et aux protéines virales (ORF3) **(Figure 40)**. La colocalisation a été quantifiée en calculant les valeurs de coefficient de Manders **(Figure 40, panels de droite)**.

La protéine ORF2i colocalisait de façon significative avec l'adaptine AP-1 dans les cellules traitées avec le solvent du composé A5, au niveau des régions périnucléaires. Cette colocalisation était significativement réduite dans les cellules traitées avec le composé A5 (A5-150 $\mu$ M, MOC = 0,45) **(Figure 40A)**. De plus, dans les cellules traitées, la protéine ORF2i présentait une localisation subcellulaire plus diffuse que dans la condition contrôle, en accord avec les résultats obtenus en **Figure 39B**.

Afin de s'assurer que la redistribution subcellulaire de la protéine ORF2i dans les cellules traitées avec A5 était bien due à l'inhibition de l'adaptine AP-1, nous avons analysé la colocalisation entre la protéine ORF2i et le récepteur au mannose-6-phosphate cation-indépendant (M6PR), une protéine résidente du TGN qui transite entre le TGN et les endosomes (Klumperman et al., 1993 ; Ghosh et al., 2003). L'adaptine AP-1 lie et incorpore le M6PR, lui-même lié à des enzymes lysosomales, dans des vésicules de transport au niveau du TGN afin de les adresser vers les endosomes tardifs/lysosomes (Doray et al., 2002; Ghosh et Kornfeld, 2004). Quand le trafic de l'adaptine AP-1 est inhibé, les enzymes lysosomales sont sécrétées au lieu d'être adressées aux endosomes tardifs/lysosomes (Tan et Gleeson, 2019). Dans les cellules traitées avec le solvent de la molécule A5 (H<sub>2</sub>O), le M6PR était détecté dans les régions périnucléaires, conformément à sa localisation au niveau du TGN et colocalisait de façon modérée avec la protéine ORF2i (MOC = 0,49 ; Figure 40B). Dans les cellules traitées avec le composé A5, le M6PR présentait un profil cytosolique diffus et ponctiforme, indiquant que le trafic de l'adaptine AP-1 était bien inhibé. Une réduction significative de la colocalisation avec la protéine ORF2i a également été observée (MOC = 0,22 ; Figure 40B). De manière intéressante, dans les cellules où la localisation subcellulaire du M6PR était altérée, celle de la protéine ORF2i l'était également, indiquant que l'inhibition spécifique de l'adaptine AP-1 était responsable de l'altération de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i. Par là même, le traitement avec la molécule A5



ORF2i-TGN46 (n>30) STX6-TGN46 (n>30) ORF2i-Clathrin (n>30) Figure 40 : Impact de l'inhibition avec

pharmacologique de l'adaptine AP-1, avec le composé A5, sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2 et sa colocalisation des marqueurs viraux/cellulaires. Les cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées avec le solvant (H<sub>2</sub>O) ou 150µM de composé A5 pendant 3j. Puis, des doubles marquages avec les anticorps indiqués ont été réalisés par une approche d'immunofluorescence indirecte. Puis les marquages ont été analysés en microscopie confocale. Pour chaque double marquage, les valeurs de MOC du marquage ORF2i dans le marquage des protéines cellulaires/virales ont été déterminées à l'aide du plugin JACoP du logiciel Fiji, en utilisant la cellule entière comme ROI.

n'induisait pas de changement de localisation subcellulaire du complexe adapteur AP-2 (données non montrées), qui est impliqué dans l'endocytose de cargos protéiques depuis la membrane plasmique vers les endosomes (Park et Guo, 2014), confirmant la spécificité de la molécule A5 vis-à-vis de l'adaptine AP-1.

Afin de renforcer nos observations, nous avons analysé l'impact du traitement avec le composé A5 sur l'intégrité du TGN afin d'être certains que la modification de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i ne puisse être attribuée à une altération morphologique du TGN. Pour cela, nous avons analysé la colocalisation ORF2i/TGN46 **(Figure 40C)** et la colocalisation TGN46/Syntaxine-6, qui sont deux marqueurs du TGN (Luzio et al., 1990 ; Bock et al., 1997) **(Figure 40D)**. Dans les conditions contrôles ou traitées avec le composé A5, la localisation des marqueurs TGN46 et syntaxine-6 (STX) n'était pas modifiée **(Figure 40C et Figure 40D)**, confirmant l'intégrité morphologique du TGN. Même si la colocalisation était faible entre l'ORF2i et le TGN46 dans la condition contrôle, celle-ci était diminuée significativement dans la condition traitée avec le composé A5 (MOC = 0,35 vs 0,15 ; **Figure 40C**), du fait de la relocalisation de l'ORF2i. L'ensemble de ces résultats indiquent que le complexe AP-1 est impliqué dans l'adressage subcellulaire de la protéine ORF2i, sans affecter la morphologie du TGN.

Le trafic faisant intervenir l'adaptine AP-1 étant dépendant de la clathrine, nous avons analysé ensuite la colocalisation entre la protéine ORF2i et la clathrine **(Figure 40E)**. De façon attendue, la colocalisation était importante entre les deux marqueurs au niveau des régions périnucléaires dans la condition contrôle (MOC = 0,88). Dans la condition traitée avec le composé A5, cette colocalisation était significativement diminuée (MOC = 0,50) et le marquage associé à la clathrine était plus diffus, indiquant que le composé A5 affecte également le recrutement de la clathrine au niveau des membranes de la voie de sécrétion **(Figure 40E)**. Ces résultats indiquent que la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i est dépendante du complexe AP-1et fait également intervenir la clathrine.

Nous avions montré précédemment que la protéine ORF2i était co-distribuée avec les protéines ORF3 et Rab11, un effecteur de l'ERC, et ceci dans des régions périnucléaires au niveau de structures ressemblant à des « pépites » (Bentaleb et al., 2022). Nous avons donc analysé l'impact du traitement avec le composé A5 sur la colocalisation de la protéine ORF2i avec la protéine ORF3 **(Figure 40F)** et la protéine Rab11 **(Figure 40G)**. Concernant le co-marquage ORF2i/ORF3, un marquage associé à l'ORF3 diffus et ponctiforme a été observé dans les cellules traitées avec le composé A5 ainsi qu'une diminution drastique de la colocalisation entre les deux marqueurs, comparativement à la condition contrôle (MOC = 0,22 vs 0,80; **Figure 40F**). Ceci indique que le traitement avec la molécule A5 affecte la codistribution des protéines virales ORF2i et ORF3. Concernant le co-marquage ORF2i/Rab11, une colocalisation importante a été observée dans la condition contrôle au niveau des structures de type « pépite » retrouvées dans les régions périnucléaires (MOC = 0,82; **Figure 40G**) et cette colocalisation était significativement diminuée dans la condition traitée avec la molécule A5 (MOC = 0,42). Ces résultats indiquent que l'inhibition pharmacologique d'AP-1 avec le composé A5 inhibe la localisation de la protéine ORF2i au niveau de celles-ci.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'impact de l'inhibition pharmacologique de l'adaptine AP-1 par le composé A5 sur le cycle infectieux du HEV. Pour cela nous avons analysé l'expression de la protéine ORF2 au niveau intracellulaire et extracellulaire à partir de cellules PLC3/HEV-p6 traitées ou non avec le composé A5, en Western-blot (WB) et par immunoprécipitation (IP) (Figure 41A). En WB, nous avons utilisé l'anticorps 1E6 qui reconnait toutes les isoformes de la protéine ORF2. Nous avons aussi contrôlé le niveau d'expression de la protéine virale ORF3, de la tubuline- $\beta$  et de la protéine GRP78 qui est surexprimée en cas de stress cellulaire (Figure 41A). Pour les IPs, nous avons utilisé les anticorps P1H1 et P3H2 qui permettent d'immunoprécipiter de manière différentielle les formes de la protéine ORF2 : l'anticorps P1H1 immunoprécipite spécifiquement la forme ORF2i associée aux particules virales, alors que l'anticorps P3H2 va préférentiellement immunoprécipiter les formes ORF2g/c dans les surnageants de cultures dénaturés par la chaleur (Bentaleb et al., 2022). L'impact du composé a également été analysé en quantifiant les ARN viraux (Figure 41B) et les titres infectieux (Figure 41C) intracellulaires et extracellulaires. Des cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec du Sofosbuvir, un inhibiteur de réplication et de production virale bien caractérisé in vitro (Dao Thi et al., 2016) ont été utilisées comme contrôles.



Figure 41 : Impact de l'inhibition pharmacologique de l'adaptine AP-1, par le composé A5 sur l'expression protéique, la réplication virale et la production de particules virales. (A) Les surnageants et les lysats de cellules PLC3/HEV-p6/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV-p6/A5-150µM et PLC3 ont été générés après trois jours de traitement. Dans les surnageants, les protéines ORF2i et ORF2g/c ont été immunoprécipitées avec les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-ORF2i/g/c P3H2, respectivement, immobilisés sur des billes magnétiques. Un IgG total de souris a été utilisé comme contrôle isotypique (Iso). La protéine ORF2 a été détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysats cellulaires, la protéine ORF2i a été détectée par WB avec l'anticorps 1E6. Les protéines GRP78 et tubuline- $\beta$  ont été détectées avec un anticorps de rat anti-GRP78 et un anticorps monoclonal de souris anti-tubuline- $\beta$ , respectivement. (B) La quantification des ARN viraux extracellulaires et intracellulaires issus de cellules PLC3/HEV-p6/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEVp6/A5-150µM, PLC3/HEV-p6/DMSO, PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20µM ou PLC3 a été réalisée par RT-qPCR après trois jours de traitement. Les cellules PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20µM ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition de la réplication. (C) Les titres infectieux extracellulaires et intracellulaires de cellules PLC3/HEV-p6/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV-p6/A5-150µM, PLC3/HEV-p6/DMSO, PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20µM ou PLC3, ont été déterminés après trois jours de traitement. Les particules virales extraites ont été utilisées pour infecter des cellules Huh-7.5 pendant 3j. Puis des immunofluorescences ont été réalisées avec l'anticorps 1E6. Les résultats sont exprimés en titres infectieux relatifs. Les cellules PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20µM ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition des titres infectieux.

Bien que le composé A5 n'était pas associé à l'induction d'un stress cellulaire (absence d'impact sur l'intensité de détection de la protéine GRP78 intracellulaire en WB) et n'affectait pas le profil ou l'intensité de détection des protéines virales ORF2 et ORF3, le composé A5 induisait une réduction de la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture après IP avec l'anticorps P1H1. Toutefois, le traitement n'affectait pas la détection des formes ORF2g/c après IP avec l'anticorps P3H2 (Figure 41A). Ces résultats indiquent que le composé A5 conduit probablement à une réduction de la sécrétion des particules virales. En effet, les titres ARN extracellulaires présentaient une réduction par rapport à la condition contrôle, là où les titres ARN intracellulaires présentaient une augmentation, probablement du fait de l'accumulation des ARN non sécrétés (Figure 41B). De manière intéressante, les titres infectieux extracellulaires et intracellulaires étaient significativement réduits après traitement avec le composé A5 par rapport à la condition contrôle ( $\approx 70\%$ ; Figure 41C). Ces données suggèrent que l'inhibition de l'adaptine AP-1 par le composé A5 affecte l'assemblage viral et la sécrétion des particules virales.

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus ici mettent en évidence l'importance du complexe AP-1 dans l'adressage de la protéine ORF2i au niveau des usines virales du HEV et pour la sécrétion des particules infectieuses. L'adaptine joue probablement un rôle central dans le cycle infectieux du HEV.

## Silencing de la sous-unité $\gamma$ 1 du complexe adapteur AP-1 (AP-1 $\gamma$ 1) par ARN interférence : Impact sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i et sur l'infectiosité virale

Afin de confirmer l'importance du complexe AP-1 dans l'adressage de la protéine ORF2i aux usines virales et pour la production de particules virales, les cellules PLC3/HEV-p6 ont été transfectées avec des petits ARN interférents (siRNA) ciblant la sous-unité  $\gamma$ 1 du complexe adapteur AP-1 (AP-1 $\gamma$ 1). Nous avons choisi de cibler cette sous-unité car de nombreux virus, comme les Coronavirus (Rebendenne et al., 2022), l'exploitent pour promouvoir leur infectiosité.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse de colocalisation par immunofluorescence afin de comprendre l'impact du silencing de la sous-unité AP-1 $\gamma$ 1 sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i ainsi que sur sa colocalisation avec d'autres marqueurs viraux ou cellulaires **(Figure 42)**. Les analyses ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-ORF2i P1H1 et des anticorps ciblant des marqueurs liés au trafic

du complexe AP-1 (AP-1, M6PR et clathrine), au TGN (TGN46, syntaxine-6), à l'ERC (Rab11) et aux protéines virales (ORF3) **(Figure 42)**. La colocalisation a été quantifiée en calculant les valeurs de coefficient de Manders **(Figure 42, panels de droite)**.

Comme montré dans la **Figure 42A**, la protéine ORF2i colocalisait significativement avec l'adaptine AP-1 dans la condition siCTL (MOC = 0,80) au niveau des régions périnucléaires, et cette colocalisation était abolie dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 (MOC = 0,06). De manière intéressante, dans les cellules ayant été transfectées avec le siAP-1 $\gamma$ 1, la protéine ORF2i présentait une distribution subcellulaire plus diffuse que dans la condition contrôle **(Figure 42A)**, comme observé avec le composé A5 **(Figure 40A)**. De plus, nous n'avons pas observé d'effet du siAP-1 $\gamma$ 1 sur la localisation subcellulaire du complexe AP-2 (Données non montrées). Ces résultats confirment l'importance de l'adaptine AP-1 dans l'adressage subcellulaire de la protéine ORF2i.

La transfection du siAP-1 $\gamma$ 1 dans les cellules PLC3/HEV-p6 induisait une modification de la localisation subcellulaire du M6PR au profit d'un profil plus diffus et ponctiforme comparativement à la condition contrôle, ainsi qu'une diminution de la codistribution ORF2i/M6PR (MOC = 0,44 dans la condition siCTL vs MOC = 0,27 dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 ; **Figure 42B**), sans effet sur l'intégrité du TGN (**Figure 42C et Figure 42D**). Ces résultats indiquent que l'extinction de la sous-unité AP-1 $\gamma$ 1 altère l'activité de l'adaptine et que c'est bien cet effet qui est à l'origine de la redistribution subcellulaire de la protéine ORF2i, confirmant les résultats obtenus avec le composé A5.

La clathrine présentait une localisation subcellulaire plus diffuse dans le cytosol, associée à une diminution de sa colocalisation avec la protéine ORF2i (MOC = 0,82 dans la condition siCTL vs MOC = 0,40 dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 ; **Figure 42E**). Ces résultats indiquent de nouveau que l'activité de l'adaptine AP-1 et de la clathrine sont impliquées dans l'adressage de la protéine ORF2i.



Figure 42 : Impact du silencing de la sous-unité AP-1/1 de l'adaptine AP-1 sur la localisation subcellulaire de la protéine ORF2 et sa colocalisation avec des marqueurs viraux/cellulaires. Les cellules PLC3/HEV-p6 ont été transfectées avec le siCTL ou le siAP-1γ1. А 3j posttransfection, des doubles marquages avec les anticorps indiqués ont été réalisés par approche une d'immunofluorescence indirecte. Puis les marquages ont été analysés en microscopie confocale. Pour chaque double marquage, les valeurs de MOC du marquage ORF2i dans le marquage des protéines cellulaires/virales ont été déterminées à l'aide du plugin JACoP du logiciel Fiji, en utilisant la cellule entière comme ROI.

Concernant le co-marquage ORF2i/ORF3 **(Figure 42F)**, le marquage ORF3 semblait plus diffus dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 par rapport aux conditions contrôles et était associé à une diminution drastique de la colocalisation entre les deux marqueurs (MOC = 0,79 dans la condition siCTL vs MOC = 0,22 dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 ; **Figure 42F**). Ces résultats indiquent que l'extinction de la sous-unité AP-1 $\gamma$ 1 altère la codistribution des protéines virales ORF2i et ORF3, comme nous l'avions observé avec le composé A5. De façon similaire, la colocalisation entre les protéines ORF2i et Rab11 était réduite significativement après transfection du siAP-1 $\gamma$ 1 (MOC = 0,80 dans la condition siCTL vs MOC = 0,37 dans la condition siAP-1 $\gamma$ 1 ; **Figure 42G**), indiquant que l'extinction de la sous-unité AP-1 $\gamma$ 1 inhibe l'adressage de la protéine ORF2i au niveau de l'ERC et donc des usines virales, comme observé avec le composé A5, à savoir l'importance de l'adaptine AP-1 dans l'adressage de la protéine ORF2i au l'ERC et donc aux usines virales.

Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de l'altération de la localisation subcellulaire de la protéine ORF2i induite par la transfection de siRNA ciblant la sousunité AP-1 $\gamma$ 1, sur le cycle infectieux du HEV, dans les cellules PLC3/HEV-p6. Pour ce faire, nous avons procédé comme décrit dans la **Figure 41**, avec des cellules PLC3/HEV-p6 transfectées avec un siCTL, un siAP-1 $\gamma$ 1 ou non transfectées (NT) **(Figure 43)**.

Bien que la transfection du siAP-1/1 n'affectait pas le niveau et le profil de détection intracellulaire de la protéine ORF2 ou la sécrétion des formes ORF2g/c dans les surnageants de culture, nous avons observé une diminution significative de la détection de la protéine ORF2 i dans les surnageants de culture après immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps P1H1, comparativement aux conditions contrôles NT (non transfectées) ou siCTL (Figure 43A). En accord avec les résultats obtenus avec le composé A5 (Figure 41B), les résultats préliminaires de titres ARN extracellulaires montraient une diminution significative alors que les titres ARN intracellulaires étaient significativement aux conditions contrôles (Figure 43B). Ces résultats doivent néanmoins être confirmés. Les titres infectieux extracellulaires et intracellulaires étaient significativement réduits par rapport aux conditions contrôles, comme observé avec le composé A5 (Figure 43C).



Figure 43 : Impact du silencing de la sous-unité AP-1<sup>1</sup>/1 de l'adaptine AP-1 sur l'expression protéique, la réplication virale et la production de particules virales. (A) Les surnageants et les lysats de cellules PLC3/HEVp6/NT (non transfectées), PLC3/HEV-p6/siCTL, PLC3/HEV-p6/siAP-1/1 et PLC3 ont été générés après trois jours post-transfection. Dans les surnageants, les protéines ORF2i et ORF2g/c ont été immunoprécipitées avec les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-ORF2i/g/c P3H2, respectivement, immobilisés sur des billes magnétiques. Un IgG total de souris a été utilisé comme contrôle isotypique (Iso). La protéine ORF2 a été détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysats cellulaires, la protéine ORF2i a été détectée par WB avec l'anticorps 1E6. Les protéines AP-1/1, GRP78 et tubuline- $\beta$  ont été détectée avec un anticorps polyclonal de lapin anti-AP-1 $\gamma$ 1, de rat anti-GRP78 et un anticorps monoclonal de souris anti-tubuline- $\beta$ , respectivement. (B) La quantification des ARN viraux extracellulaires et intracellulaires issus de cellules PLC3/HEV-p6/NT (non transfectées), PLC3/HEV-p6/siAP-1/1, PLC3/HEV-p6/DMSO, PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20μM ou PLC3 a été réalisée par RT-qPCR après trois jours de traitement/transfection. Les cellules PLC3/HEV-p6/Sofosbuvir-20µM ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition de la réplication. (C) Les titres infectieux extracellulaires et intracellulaires ont été déterminés après trois jours de transfection/traitement. Les particules virales extraites ont été utilisées pour infecter des cellules Huh-7.5 pendant 3j. Puis des immunofluorescences ont été réalisées avec l'anticorps 1E6. Les cellules PLC3/HEVp6/Sofosbuvir-20µM ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition des titres infectieux.

Analysés ensemble, ces résultats confirment par une approche différente l'importance du complexe adapteur AP-1 dans l'adressage de la protéine ORF2i aux usines virales. Le complexe AP-1 joue probablement un rôle central dans le cycle infectieux du HEV.

# Analyse en hépatocytes primaires humains de l'importance du trafic AP-1-dépendant dans la sécrétion de particules virales infectieuses

Afin de valider nos observations dans un modèle d'infection plus relevant et proche du contexte in vivo, nous avons analysé l'impact du composé A5 dans un modèle *ex vivo* d'hépatocytes primaires humains infectés (PHHs) (Figure 44). De nombreuses études ont montré que ce modèle est permissif à l'infection par le HEV et représente un modèle préclinique pour analyser le potentiel antiviral bon d'inhibiteurs pharmacologiques (voir « Introduction générale » > « I) Le virus de l'hépatite E » > « h) Modèles d'étude » cellulaires du HEV, page 50 de ce manuscrit). Brièvement, un jour après ensemencement (D-0), les PHHs ont été infectés avec des particules virales intracellulaires et traités avec le composé A5 à 150µM (A5), la ribavirine à 25µM (RBV) ou avec les solvants respectifs des composés (H<sub>2</sub>O et DMSO, respectivement). Les PHHs non infectés ont été utilisés comme contrôles négatifs (Mock). Les PHHs ont été traités également aux jours 1 et 2 (D-1 et D-2) avant que les surnageants ne soient récoltés pour analyse (Figure 44A). Nous avons analysé dans un premier temps l'impact du composé A5 sur la sécrétion de la protéine ORF2 dans les surnageants de culture (Figure 44B). Ensuite, l'impact du composé A5 sur la production de particules infectieuses a été analysé en quantifiant les titres infectieux extracellulaires et comparé aux cellules traitées avec la RBV, un inhibiteur de réplication du HEV approuvé par la FDA (Figure 44C).

Nous avons observé que le composé A5 n'affectait pas le profil de détection de la protéine ORF2g dans les surnageants de PHHs là où nous n'observions plus de signal associé à la protéine ORF2g dans les cellules traitées avec la RBV, qui inhibe la réplication et par conséquent la production de particules virales intracellulaires et extracellulaires **(Figure 44B)**. Ces résultats indiquent que le composé A5 n'affecte pas la sécrétion de la protéine ORF2g et plus globalement la sécrétion des protéines dans les surnageants des PHHs traités.

Ensuite, nous avons analysé l'impact du traitement avec le composé A5 sur les titres infectieux extracellulaires **(Figure 44C)**. Dans les surnageants de PHHs traités avec le composé A5, les titres infectieux extracellulaires étaient significativement réduits par rapport à la condition contrôle, à des niveaux comparables à ceux des cellules traitées avec la RBV. Ces résultats indiquent que le composé A5 inhibe la production des particules virales en PHHs, comme observé en cellules d'hépatome humain **(Figure 41C)**.



**Figure 44 :** Impact de l'inhibition pharmacologique du complexe AP-1, par le composé A5, sur la production de la protéine ORF2 et des particules virales en hépatocytes primaires humains infectés par le HEV. (A) Stratégie expérimentale. Un jour après ensemencement (D-0), les hépatocytes primaires humains (PHHs) ont été infectés avec des particules virales intracellulaires et traités avec le composé/solvant correspondant. Aux jours 1 et 2 (D-1 et D-2), du milieu frais contenant les composé/solvants a été ajouté dans les puits. Au jour 3 (D-3), les surnageants ont été récupérés puis analysés en WB et les titres infectieux ont été déterminés. D = jour. (B) Des WB à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6 ont été réalisés sur les surnageants récoltés. (C) Les surnageants contenant les particules virales extracellulaires ont été appliqués sur des cellules Huh-7.5 pendant trois jours pour déterminer les titres infectieux extracellulaires puis des immunofluorescences ont été réalisées à l'aide de l'anticorps 1E6. Les résultats sont exprimés en titres infectieux relatifs. Les cellules traitées avec la RBV ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition des titres infectieux.

Analysés dans leur ensemble, les résultats obtenus ici indiquent que le trafic dépendant de l'adaptine AP-1 est primordial pour l'infectiosité du HEV dans le modèle *ex vivo* que constituent les PHHs, de manière indépendante de la sécrétion de la protéine ORF2g. Ces résultats confirment également les résultats obtenus en lignées d'hépatome humain, illustrant le rôle central de l'adaptine AP-1 dans le cycle infectieux du HEV.

Ainsi, nous avons mis en évidence par des approches d'inhibition pharmacologique (composé A5) et génétique (siRNA ciblant la sous-unité AP-1/1), le rôle central de l'interaction entre la protéine ORF2i et le complexe adapteur AP-1 dans l'adressage de la protéine ORF2i à l'ERC/aux usines virales ainsi que dans la production de particules virales infectieuses, dans des modèles cellulaires *in vitro* (cellules d'hépatomes humains) et *ex vivo* (PHHs) **(Figure 45)**.

Nous émettons l'hypothèse que lorsque l'adaptine AP-1 est inhibée par l'une de ces deux approches, la protéine ORF2i présente une localisation subcellulaire altérée, l'assemblage des particules virales est altéré, les ARN viraux s'accumulent au niveau intracellulaire et une réduction drastique des titres infectieux est observée. Ces résultats ont permis d'identifier pour la première fois un facteur de l'hôte impliqué dans l'adressage de la protéine virale ORF2i, depuis son site de production vers les usines virales.



**Figure 45 :** Modèle de l'adressage de la protéine ORF2i aux usines virales du HEV médié par le complexe adapteur AP-1. Les protéines ORF2i nouvellement produites sont ancrées dans les membranes de la voie de sécrétion par le biais de son extrémité Nt, du côté cytosoliques de celles-ci. La protéine ORF2i interagit ensuite avec le complexe AP-1 au niveau du TGN afin de générer des vésicules de transport ORF2i/AP-1-positives, de manière clathrine-dépendante. Ces vésicules de transport sont acheminées vers les endosomes de recyclage/usines virales où la protéine ORF2i colocalise avec des marqueurs de l'ERC comme Rab11. Le fait que les usines virales soient enrichies en protéines ORF1, ORF3, ORF3 et en ARN viral promeut l'assemblage viral et aboutit à la production/sécrétion de particules virales. L'inhibition du complexe AP-1 par la molécule A5 ou le silencing de la sous-unité AP171 inhibe l'interaction ORF2i/AP-1 et de ce fait aucune vésicule de transport ORF2i- et AP-1-positives. Dans ce cas, la protéine ORF2i n'est plus adressée aux usines virales et ne colocalise plus avec la protéine Rab11. Ceci affecte l'assemblage viral et induit une diminution significative de la production/sécrétion de sarticules virales et de la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture cellulaire.

# **Objectif #4 : Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des différentes formes de la protéine de capside ORF2 du HEV**

Ce quatrième objectif représente le projet central de ma thèse et celui pour lequel mon contrat doctoral a été co-financé par la région Hauts-de-France et l'Institut Pasteur de Lille en 2019, puis par l'ANRS-Maladies Infectieuses Émergentes pour l'année 2023. Ce projet s'articule en deux volets :

- Le premier volet s'intéresse aux mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c (Annexe #1).
- Le second volet s'intéresse aux mécanismes de maturation protéolytique de la forme ORF2i (**Article en préparation**)

# Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c de la protéine de capside ORF2 du HEV

### a) Rationnel

Une étude menée au sein du laboratoire a permis de mettre en évidence que les sérine 34 (Ser34) et 102 (Ser102) constituaient l'extrémité Nt de l'ORF2g et de l'ORF2c, respectivement (Montpellier et al., 2018) (Ankavay et al., 2019). La Ser34 se trouve directement en aval de l'ARM constitué du séquon <sup>28</sup>RRRGRR<sup>33</sup> (Figure 46) qui pourrait correspondre au site consensus de clivage (R/K)X<sub>n</sub>(R/K)  $\checkmark$  reconnu par les proprotéines convertases (PCs) de type Kexin-like comme la furine (Figure 23). La Ser102 se trouve quant à elle, directement en aval du séquon <sup>99</sup>RRR<sup>101</sup> (Figure 46) qui pourrait correspondre également à un site de clivage reconnu par les PCs de type Kexin-like. Les PCs sont des protéases à sérine impliquées dans la maturation protéolytique de nombreuses glycoprotéines virales comme la protéine Spike des Coronavirus.

En ce sens, nous avons étudié l'implication des PCs de type kexin-like dans la maturation protéolytique des formes glycosylées ORF2g/c du HEV par des approches d'inhibition pharmacologique et génétique (siRNA).

	Peptide signal	→ ORF2i → ORF2g				
1	MC P R V V L L L F	F V F L P ML P A P	P A G Q P S G <b>R R R</b>	G <b>RR<mark>S</mark>GGAGGG</b>	F WG DR V DS QP	50
51	FALPYIHPTN	PFAADI VSQS	GAGTRPRQPP	R P L G S A WR D Q	S	100
101	RSAPÁGAAPL	TAVSPAPDTA	P V P D V D S R G A	I L R R QYNL S T	SPLTSSVASG	150
151	TNLVLYAAPL	NPLLPLQDGT	NTHI MATEAS	NYAQYRVVRA	TIRYRPLVPN	200
201	AVGGYAI SI S	FWPQTTTTPT	SVDMNSITST	DVRILVQPGI	ASELVI PSER	250
251	L H Y R N Q G W R S	VETTGVAEEE	ATSGLVMLCI	HG S P V N S Y T N	TPYTGALGLL	300
301	DFALELEFRN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	LRRGADGTAE	LTTTAATRFM	350
351	K D L H F T G T N G	VGEVGRGI AL	TLFNLADTLL	GGLPTELISS	AGGQLFYSRP	400
401	V V S ANGE P T V	KLYTSVENAQ	QDKGI TI PHD	IDLGDSRVVI	QDY DNQHE QD	450
451	R P T P S P A P S R	PFSVLRANDV	L WL S L T A A E Y	DQATYGSSTN	P MY V S DT V T F	500
501	VNVATGAQAV	A R S L DWS K V T	LDGRPLTTIQ	QYSKTFYVLP	L R G K L S F WE A	550
551	GTTRAGYPYN	YNT TAS DQIL	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV	600
601	LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTI AELQRL	650
651	K T E V G K T R E S	660				

<u>Figure 46 :</u> Représentation schématique de la séquence primaire des différentes formes de la protéine ORF2 du HEV, mettant en évidence leur extrémité Nt. Le cadre vert met en évidence le peptide signal de la protéine ORF2. Les cadres marrons mettent en évidence les 2 sites de N-glycosylation des formes ORF2g et ORF2c. Les résidus en rouge et bleu constituent l'extrémité Nt des trois isoformes ORF2. Les résidus en gras montrent les séquons riches en résidus d'arginine.

#### b) Résultats obtenus

#### Mécanisme de translocation réticulaire des protéines ORF2g/c du HEV

Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que les formes ORF2g/c étaient hautement glycosylées et massivement sécrétées dans les surnageants de culture et dans le sérum des patients infectés (Montpellier et al., 2018 ; Ankavay et al., 2019). Néanmoins, le mécanisme sous-jacent à la translocation réticulaire de ces formes est inconnu. La majorité des protéines sécrétées est transloquée dans la lumière du RE par un mécanisme dépendant du translocon Sec61.

Afin de définir si les formes ORF2g/c sont transloquées dans la lumière du RE de façon Sec61-dépendante, nous avons traité des cellules PLC3/HEV-p6 et PLC3/Mock (PLC3) avec la mycolactone, un inhibiteur bien caractérisé du translocon Sec61-dépendant (Demangel et al., 2018). De manière intéressante, nous avons observé une diminution dose-dépendante de la sécrétion des formes ORF2g/c dans le surnageant des cellules PLC3/HEV-p6 traitées **(Figure 47)**. Ceci indique que la translocation réticulaire des formes ORF2g/c est un mécanisme Sec61-dépendant.



**Figure 47 : Impact de l'inhibition du translocon Sec61 par la mycolactone sur la translocation réticulaire des formes ORF2g/c.** Expérience d'inhibition en dose-réponse de la sécrétion des formes ORF2g/c dans les cellules PLC3/HEVp6 traitées par la mycolactone. A 7 j.p.e, les cellules PLC3/HEV-p6 et Mock ont été traitées pendant 24h avec les concentrations indiquées de mycolactone. Les surnageants de culture (SN) et les lysats cellulaires (Cells) ont été collectés et la protéine ORF2 détectée avec l'anticorps 1E6. La tubuline sert ici de contrôle de charge protéique.

Mécanisme de maturation protéolytique des protéines ORF2g/c du HEV

Afin de caractériser le mécanisme de maturation des formes ORF2g/c dans la voie de sécrétion et de déterminer le rôle des PCs de type kexin-like dans ce processus, nous avons utilisé les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-ORF2i/g/c P3H2. L'anticorps P1H1 reconnaît l'extrémité Nt de la forme ORF2i, qui est absente dans les formes ORF2g/c **(Figure 48A, panel haut)**, rendant cet anticorps capable de détecter spécifiquement la forme ORF2i, qui n'est pas glycosylée dans les lysats cellulaires et les surnageants de culture **(Figure 48B)**. Si les PCs interviennent dans le clivage des formes ORF2g/c, leur inhibition entrainerait un décalage de l'extrémité Nt de ces formes au profit de la Glutamine 24 (Q24), qui se trouve directement en aval du peptide signal **(Figure 46)**. Dans cette situation la majorité de l'épitope reconnu par le P1H1 **(12 des 14 résidus ; Bentaleb et al., 2022 ; Annexe 2)** serait accessible sur les formes glycosylées non maturées ORF2g\*: l'anticorps P1H1 serait alors capable de détecter des formes glycosylées **(Figure 48A, panel bas)**.



**Figure 48 :** Reconnaissance par les anticorps des différentes formes de la protéine ORF2, en présence ou non d'inhibiteurs pharmacologiques de PCs. (A) Représentation schématique des protéines ORF2i/g/c et des sites de reconnaissances des anticorps P1H1 et P3H2 utilisés pour différencier les différentes formes de la protéine ORF2, en présence (« + CMK / D6R / SSM3 ») ou non d'inhibiteurs pharmacologiques de PCs de type Kexin-like. SP = peptide signal ; PC = proprotéine convertase. Les glycanes sont représentés en noir. (B) Immunoprécipitation des différentes formes de la protéine ORF2, à l'aide des anticorps P1H1 et P3H2, dans les lysats cellulaires ou les surnageants de culture.

Ces anticorps ont été utilisés dans des expériences d'IP afin d'évaluer l'effet de trois inhibiteurs pharmacologiques de Furin/PCs Kexin-like (decanoyl-RVKRcholorométhylkétone [CMK], hexa-D-arginine [D6R] et SSM3 trifluoroacétate [SSM3] ; Cheng et al., 2020) sur la maturation protéolytique des formes ORF2g/c sécrétées dans le surnageant de cellules traitées. Les lysats cellulaires de cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec les inhibiteurs ou non pendant trois jours ont été soumis à des WB anti-ORF2 avec l'anticorps 1E6, anti-intégrine- $\alpha V$  (un substrat clivé par la furine ; Lehmann et al., 1996) et anti-tubuline- $\beta$  (Figure 49). Dans ces expériences, l'immunoprécipitation de l'ORF2g\* par l'anticorps P1H1 a été utilisé comme read-out de l'inhibition de la maturation protéolytique des formes glycosylées de la protéine ORF2 (Figure 48A). Dans les cellules traitées, nous avons observé une immunoprécipitation dose-dépendante de l'ORF2g\* par l'anticorps P1H1 (Figure 49A, Figure 49B et Figure 49C), indiquant que les inhibiteurs de Furin/PCs de type Kexin-like, inhibent la maturation protéolytique des formes ORF2g/c. Il est intéressant de noter que les molécules CMK et SSM3, capables d'entrer dans la cellule, induisaient une inhibition marquée de la maturation des formes ORF2g/c et de la pro-intégrine- $\alpha$ V. Le D6R, qui n'est pas capable d'entrer dans la cellule, induisait un effet moins marqué sur la maturation protéolytique des formes ORF2g/c.

Analysées ensemble, ces données indiquent que la furine ou une PC de type kexin-like est responsable de la maturation protéolytique des protéines ORF2g/c.



**Figure 49 :** Effet des inhibiteurs de Furin/proprotéines convertases de type Kexin-like, sur la maturation protéolytique des protéines ORF2g/c. (A-C) A 7 j.p.e, les cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées avec les concentrations indiquées de Decanoyl-RVKR-chloromethylketone [CMK], hexa-D-arginine [D6R] et SSM3 trifluoroacétate [SSM3] ou avec le solvent des trois molécule (DMSO). Puis les lysats cellulaires ont été analysés par WB avec l'anticorps anti-ORF2 1E6, un anticorps anti-intégrine- $\alpha$ V et un anticorps anti-tubuline- $\beta$ . Des immunoprécipitations à l'aide des anticorps P1H1 et P3H2 ont été réalisées dans les surnageants de culture et les protéines ORF2 révélées à l'aide de l'anticorps 1E6. La pro intégrine- $\alpha$ V (ProInt $\alpha$ V) correspond à la forme non maturée de l'intégrine- $\alpha$ V. L'ORF2g\* correspond aux formes ORF2g/c non maturées immunoprécipitées avec l'anticorps P1H1. Les poids moléculaires (kDa) sont indiqués sur la droite.

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer l'implication de la furine/PCs de type Kexin-like, dans la maturation protéolytique des protéines ORF2g/c. Pour cela, nous avons électroporé les cellules de carcinome de colon LoVo avec l'ARN de la souche p6 de HEV-3 et procédé de la même façon qu'avec les inhibiteurs pharmacologiques : la maturation protéolytique des formes ORF2g/c a été analysée dans les surnageants de culture par le biais d'immunoprécipitations à l'aide de l'anticorps P1H1, 6 j.p.e. Au niveau cellulaire, des WB ont été réalisés avec l'anticorps 1E6, anti-Furine et anti-tubuline- $\beta$ (Figure 50A). La même expérience a été réalisée en parallèle avec des cellules PLC3/HEVp6. Les cellules LoVo présentent la caractéristique de n'exprimer ni la furine, ni les autres PCs de type Kexin-like (Takahashi et al., 1993). Bien que le taux d'électroporation était moindre en cellules LoVo comparativement aux cellules PLC3, nous avons observé après immunoprécipitation avec l'anticorps P1H1 des surnageants de culture, la détection de la forme ORF2g\*, là où elle n'était pas détectable dans les cellules PLC3, où la furine et PCs apparentées sont exprimées (Figure 50A). Ces résultats indiquent que la furine ou une PC de type Kexin-like, est impliquée dans la maturation protéolytique des protéines ORF2g/c.



**Figure 50 : Implication de la furine dans le processus de maturation protéolytique des protéines ORF2g/c.** (A) Les cellules LoVo/HEV-p6 ont été lysées et les surnageants de culture récoltés 6 j.p.e. Des immunoprécipitations à l'aide de l'anticorps P1H1 ont été réalisées dans les surnageants de culture et la protéine ORF2 détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysats, la protéine ORF2, la furine et la tubuline- $\beta$  ont été détectées. La pro intégrine- $\alpha$ V (ProInt $\alpha$ V) correspond à la forme non maturée de l'intégrine- $\alpha$ V. L'ORF2g\* correspond aux formes ORF2g/c non maturées immunoprécipitées avec l'anticorps P1H1. Les poids moléculaires (kDa) sont indiqués sur la droite. (B) A 7 j.p.e, les cellules PLC3/HEV-p6 ont été transfectées avec des siRNA ciblant la furine (siFur), des siRNA contrôle (siCTL) ou non transfectées (NT). Après trois de transfection, les cellules ont été réalisées dans les surnageants de culture et la protéine ORF2 détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysats, la protéine ORF2 détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysáts de culture récoltés. Les culture récoltés. Les prois 1E6. Dans les lysáts de transfectées avec des siRNA ciblant la furine (siFur), des siRNA contrôle (siCTL) ou non transfectées (NT). Après trois de transfection, les cellules ont été lysées et les surnageants de culture récoltés. Des immunoprécipitations à l'aide des anticorps P1H1 et P3H2 ont été réalisées dans les surnageants de culture et la protéine ORF2 détectée avec l'anticorps 1E6. Dans les lysats, la protéine ORF2, la furine, l'intégrine- $\alpha$ V et la tubuline- $\beta$  ont été détectées. La pro intégrine- $\alpha$ V (ProInt $\alpha$ V) correspond à la forme non maturée de l'intégrine- $\alpha$ V. L'ORF2g\* correspond aux formes ORF2g/c non maturées immunoprécipitées avec l'anticorps P1H1. Les poids moléculaires (kDa) sont indiqués sur la droite.

Enfin, nous avons cherché à identifier la PC impliquée dans le processus de maturation des protéines ORF2g/c. La furine étant la PC la plus représentée au sein de la voie de sécrétion et la plus décrite dans les processus de maturation protéolytique de glycoprotéines virales, son implication a été analysée par transfection de siRNA dans les cellules PLC3/HEV-p6 (Figure 50B). Les cellules PLC3/HEV-p6 ont été transfectées avec des siRNA ciblant la furine (siFur) ou contrôle (siCTL) ou non transfectées (NT). L'efficacité de l'extinction a été contrôlée par WB à l'aide d'un anticorps dirigé contre la furine et l'impact sur la maturation protéolytique des protéines ORF2g/c de la même manière que précédemment. Comme dans les cellules traitées avec les inhibiteurs pharmacologiques, nous avons détecté la protéine ORF2g\* après immunoprécipitation

avec l'anticorps P1H1 dans les surnageants de culture, dans la condition siFur, indiquant que la furine est impliquée dans la maturation protéolytique des formes glycosylées ORF2g/c, après translocation réticulaire Sec61-dépendante de la protéine ORF2 totale. A ce stade, nous ne pouvons pas exclure l'implication d'une autre PC de type Kexin-like à un niveau moindre que la furine dans ce processus.

## Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique de la forme ORF2i de la protéine de capside ORF2 du HEV

#### a) Rationnel

L'étude menée au sein du laboratoire qui a permis de mettre en évidence que les sérine 34 (Ser34) et 102 (Ser102) constituaient l'extrémité Nt de l'ORF2g et de l'ORF2c, respectivement, a également permis de mettre en évidence la leucine 14 (Leu14) comme extrémité Nt de la forme ORF2i (Figure 46 et Figure 51A) (Montpellier et al., 2018). Cette Leu14 est située au milieu du peptide signal de l'ORF2. La protéine ORF2i pourrait ainsi être générée de différentes façons, (i) soit par une activité protéasique d'origine virale portée par l'un des domaines de l'ORF1 dont la fonction est peu connue, (ii) soit par un mécanisme de clivage protéolytique réalisé par une protéase cellulaire. La première option a été explorée dans le cadre de mon stage de 2<sup>e</sup> année de Master et les résultats obtenus n'allaient pas dans ce sens. Nous avons alors décidé d'explorer l'hypothèse de l'intervention d'une protéase cellulaire dans le processus de maturation protéolytique permettant de générer la forme ORF2i, associée aux particules virales. Le fait que cette protéine soit ancrée par son extrémité Nt dans les membranes de la voie de sécrétion avec la queue Ct faisant face du cytosol (Hervouet et al., 2022), et que son extrémité Nt se trouve au milieu du peptide signal, suggère qu'une protéase capable de cliver ses substrats dans les plans membranaires, telle qu'une protéase intramembranaire (i-CLIP), pourrait être impliquée dans ce processus.

Les protéases intramembranaires comme la préséniline (PS) et la signal peptide peptidase (SPP) sont les membres de cette famille les plus caractérisées. La PS est la sousunité catalytique du macrocomplexe  $\gamma$ -sécrétase, impliqué dans le clivage des précurseurs amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. La SPP fonctionne de façon autonome et est notamment responsable de la maturation protéolytique de la protéine Core du HCV. De plus, ces protéases ne reconnaissent pas de séquence consensus particulière au niveau de leurs substrats. Dans ce projet, nous avons cherché à identifier l'i-CLIP impliquée dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Durant l'exposé des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, le terme « i-CLIPs » désigne uniquement la PS et la SPP.

#### b) Résultats obtenus

### Preuve expérimentale de l'implication des i-CLIPs dans la maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2i du HEV

Dans un premier temps, nous avons cherché à démontrer expérimentalement l'implication d'une i-CLIP dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique capable d'inhiber à la fois la PS et la SPP, le composé L (Figure 51B).

PAGQPSG-27

```
Α
```

В

```
Signal peptide
       F V F P ML P A P
```

1- MCPRVVLLLF

Molécule / Cible	SPP	Préseniline
Composé L	+	+
Composé N	-	+

ORF2i

Figure 51 : Représentation schématique de la séquence primaire de l'extrémité Nt de la protéine ORF2 et inhibiteurs d'i-CLIPs utilisés. (A) Représentation schématique de la séquence primaire des 27 premiers résidus d'acides aminés de la protéine ORF2. Encadré vert = peptide signal ; En rouge = Extrémité Nt de la protéine ORF2i. (B) Inhibiteurs d'i-CLIPs, ciblant la PS et/ou la SPP utilisés dans le cadre du projet. « + » = inhibe la protéase ; « - » = n'inhibe pas la protéase.

Pour cela, des cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées à 7 j.p.e pendant trois jours avec des concentrations croissantes du composé L (Figure 52A). Les cellules ont ensuite été soit lysées pour réaliser des WB (Figure 52B, « Cells »), soit fixées pour réaliser des immunofluorescences (Figure 52D). Les surnageants de culture ont également été récoltés pour réaliser des IPs à l'aide de l'anticorps anti-ORF2i P1H1 (Figure 52B, « SN »), ou pour déterminer les titres infectieux extracellulaires (Figure 52F).

En WB, au niveau intracellulaire, nous avons observé que le composé L n'induisait aucune différence de profil de détection ou d'intensité au niveau des panels GRP78, Notch-1 total (Notch) ou ORF2intra, indiquant que le traitement n'induit pas de stress cellulaire, ne module pas le niveau d'expression de la protéine Notch-1 totale et n'affecte pas la maturation de l'ORF2i détectée au niveau intracellulaire (ORF2intra), respectivement (Figure 52B). De manière intéressante, nous avons également observé une absence de détection du domaine intracellulaire de la protéine Notch-1 (NICD), qui est un produit du clivage de la forme totale par la PS, indiquant qu'aux concentrations de composé L utilisées, la PS est inactive. De façon complémentaire, nous avons voulu nous assurer de la capacité du composé L à inhiber la SPP. Pour cela, nous avons transfecté des cellules PLC3 avec un plasmide codant la protéine Core du HCV (PLC3/HCV-Core), puis traité ces

cellules avec 1µM ou 60µM de composé L. La maturation protéolytique de la protéine Core a été analysée en WB **(Figure 52F)**. Lorsque l'activité de la SPP est inhibée, la protéine Core n'est plus maturée et est dégradée par un mécanisme dépendant de TRC8 **(Figure 52E).** En WB, la forme de pleine longueur présente un poids moléculaire plus important que la forme maturée, visualisable sur gel par un léger shift de migration vers des poids moléculaires plus importants, avec une intensité de détection diminuée **(Figure 52E)**. Dans les cellules traitées avec le composé L, nous avons observé une augmentation du poids moléculaire auquel la protéine Core est détectée, ainsi qu'une diminution de l'intensité de détection, par rapport à la condition contrôle, quelle que soit la concentration de composé L utilisée. Ceci indique qu'aux concentrations utilisées, le composé L inhibe bien la SPP **(Figure 52F)**.

Dans les surnageants de culture de cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec des concentrations croissantes du composé L **(Figure 52B, « SN »)**, nous avons observé, après IP avec l'anticorps P1H1, une augmentation dose-dépendante de la détection de la protéine ORF2i, indiquant probablement que l'inhibition des i-CLIPs favorise la sécrétion et/ou la détection des particules virales. La détection par IP de la protéine ORF2i dans les surnageants de cellules traitées ne semblait donc pas être le meilleur read-out pour caractériser l'effet du composé L.

Dans un second temps, nous avons cherché à analyser l'impact de l'inhibition des i-CLIPs avec le composé L sur la morphologie des usines virales du HEV (Figure 52C). Pour ce faire, nous avons réalisé des co-marquages avec les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-ORF2i/g/c 1E6 en immunofluorescence indirecte sur des cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec le composé L. Comme attendu, dans la condition contrôle (DMSO), nous avons observé une accumulation périnucléaire de type « pépite » de la protéine ORF2i (Figure 52C). Par contre dans les cellules traitées, l'accumulation périnucléaire de type « pépite » disparaissait de manière dose-dépendante au profit d'un marquage plus diffus dans le cytosol (Figure 52C), associée à une diminution drastique et dose-dépendante des titres infectieux extracellulaires (Figure 52D). Ces résultats indiquent que l'inhibition des i-CLIPs avec le composé L provoque une altération de la morphologie des usines virales du HEV associée à une réduction drastique de la sécrétion des particules virales infectieuses, sans toutefois induire de diminution de la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture. Ceci pourrait s'expliquer par une modification de l'exposition d'épitopes sur la protéine ORF2i à la surface des particules virales, qui

module à la fois la reconnaissance des particules par l'anticorps P1H1 et leur entrée dans la cellule hôte. De plus, ces résultats apportent la preuve expérimentale qu'une i-CLIP est impliquée dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i.



**Figure 52**: Impact du composé L sur l'expression de la protéine ORF2, l'inhibition de la PS et de la SPP, la morphologie des usines virales et l'infectiosité du HEV. (A) Stratégie expérimentale. A 7 j.p.e, les cellules PLC3/HEVp6 ont été traitées pendant 3 jours avec des concentrations croissantes du composé L puis des lysats cellulaires ont été générés et analysés en WB à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6, de l'anticorps Notch-1 total, de l'anticorps anti-Notch-1 clivé (NICD), de l'anticorps anti-GRP78 et de l'anticorps anti-tubuline-*β* (B). Des cellules ont également été fixées afin de réaliser des expériences d'immunofluorescence indirecte à l'aide des anticorps anti-ORF2 1E6 et P1H1. Barre d'échelle =  $20\mu$ M (C). Les surnageants ont également été récoltés afin de déterminer les titres infectieux extracellulaires (D). Les particules virales extracellulaires ont été utilisées pour infecter des cellules Huh-7.5 pendant 3j. Puis des immunofluorescences ont été réalisées avec l'anticorps 1E6. Les résultats sont exprimés en titres infectieux relatifs. (E) Représentation schématique de la maturation protéolytique de la protéine Core du HCV, en absence ou en présence d'inhibiteurs de la SPP. (F) Impact de l'inhibition de la SPP par le composé L sur la maturation protéolytique de la protéine Core du HCV, après 16h de traitement. Les cellules ont exé lysées et un WB a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-Core.

## Identification de l'iCLIP impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2i du HEV

Les i-CLIPs ne reconnaissent pas des séquences consensus précises au niveau de leurs substrats mais c'est la topologie des substrats vis-à-vis des membranes cellulaires qui est importante. En ce sens, la SPP va reconnaitre des substrats ancrés dans les membranes cellulaires par leur extrémité Ct, leur extrémité Nt faisant face au compartiment cytosolique (topologie de type II). La PS, quant à elle va préférer des substrats présentant la topologie inverse : l'extrémité Nt ancrée dans les membranes cellulaires et l'extrémité Ct faisant face au cytosol (topologie de type I) (Figure 25A et **Figure 25B)**. Nous avons montré précédemment, que la protéine ORF2i était ancrée par son extrémité Nt dans les membranes de la voie de sécrétion (Hervouet et al., 2022 ; Annexe 2 et figure 37). Ces données suggèrent que la PS peut être l'i-CLIP impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i. C'est pourquoi nous avons ensuite traité des cellules PLC3/HEV-p6 à 6 j.p.e avec une gamme de concentration croissante du composé N, un inhibiteur spécifique de la PS, et ce une fois par jour pendant trois jours du fait de la courte demi-vie du composé (1/d ; Figure 53A). Puis, les cellules ont été fixées afin de réaliser des expériences d'immunofluorescence indirecte (Figure 53B) ou lysées afin de réaliser des WB (Figure 54A). Les particules virales extracellulaires et intracellulaires ont également été extraites afin de déterminer les titres infectieux intracellulaires et extracellulaires (Figure 55A).

Des co-marquages en immunofluorescence indirecte ont été réalisés à partir des cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec différentes concentrations de composé N, à l'aide des anticorps anti-ORF2 1E6 et P1H1, afin d'analyser l'impact du composé N sur la morphologie des usines virales du HEV (Figure 53B). Comme attendu, nous avons observé une accumulation périnucléaire de type « pépite » de la protéine ORF2i dans la condition contrôle (DMSO) (Figure 53B). Dans les cellules traitées avec le composé N, l'accumulation périnucléaire de type « pépite » de la protéine ORF2i disparaissait de manière dose-dépendante au profit d'un marquage plus diffus dans le cytosol (Figure 53B). Ces résultats indiquent que le traitement de cellules PLC3/HEV-p6 avec le composé N, un inhibiteur de PS, affecte la morphologie des usines virales du HEV, comme nous l'avions observé avec le composé L.



cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées à 7 j.p.e avec des concentrations croissantes du composé N tous les jours pendant trois jours. Puis une partie des cellules a été fixée pour réaliser des expériences d'immunofluorescence indirecte, une autre utilisée pour générer des lysats cellulaires qui ont été analysés en WB et une autre utilisée pour extraire les particules virales extracellulaires afin de déterminer les titres infectieux intracellulaires. Les surnageants ont été récoltés et soumis à des immunoprécipitations à l'aide des anticorps P1H1 et P3H2 ou utilisés pour déterminer les titres infectieux extracellulaires. (B) Des immunofluorescences indirectes ont été réalisées sur les cellules fixées précédemment avec les anticorps anti-ORF2i/g/c 1E6 et anti-ORF2i P1H1. Rouge = ORF2i/g/c ; Vert = ORF2i ; Bleu = DAPI. Barre d'échelle = 20µM.

Puis, de façon identique au composé L **(Figure 52B)**, nous avons analysé le profil de détection de la protéine ORF2 en WB dans les lysats cellulaires **(Figure 54A)** puis après IP avec les anticorps anti-ORF2i P1H1 et anti-ORF2i/g/c P3H2 des surnageants de culture traités avec 0,5% de Triton X-100, afin de délipider les particules **(Figure 54B)**. Au niveau des lysats cellulaires, nous avons observé que le composé N n'induisait pas de différences de profil de détection des protéines GRP78, Notch-1 total (Notch) et ORF2i intracellulaire (ORF2intra) **(Figure 54A)**. Ceci indique que le composé N n'induit pas de stress cellulaire, n'affecte pas le niveau d'expression de la forme totale de Notch-1, et le traitement avec le composé N n'affecte pas la maturation intracellulaire de la protéine ORF2i aux concentrations testées, respectivement. De manière intéressante, le composé N induisait une diminution dose-dépendante de la détection du domaine intracellulaire de la protéine Notch-1 (NICD), indiquant que le composé inhibe l'activité de la PS, à un niveau moindre que le composé L, aux concentrations testées. Il est important de noter que cette différence d'inhibition de la protéine Notch peut être corrélée au développement clinique plus avancé (phase III) du composé N par rapport au composé L (préclinique). En effet, l'inhibition marquée de la protéine Notch par les GSIs était probablement à l'origine des effets secondaires observés lors des essais cliniques. La concentration à laquelle la maturation protéolytique de la protéine ORF2i est inhibée, mise en regard de celle nécessaire pour inhiber la maturation de la protéine Notch-1, *in vitro* est un facteur essentiel.

Ensuite, nous avons analysé l'impact du composé N sur la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture cellulaire en réalisant des IPs avec l'anticorps P1H1 (Figure 54B). Aux concentrations testées, nous n'avons pas observé de différences de profil ou d'intensité de détection de la protéine ORF2i, excepté à la concentration de 10µM où l'intensité de détection était plus faible. La même observation a été faite pour la détection des formes ORF2g/c après immunoprécipitation avec l'anticorps P3H2 (panel « IP P3H2 + WB anti-ORF2). Analysés ensemble, ces résultats suggèrent que le composé N affecte la morphologie des usines virales, sans affecter la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture jusqu'à la concentration de 1µM, comme observé pour toutes les concentrations du composé L. Le composé N n'inhibant pas l'activité de la SPP (Figure 54C) et étant spécifique de la PS (Figure 54A), nos résultats indiquent que la PS serait l'i-CLIP impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i.



**Figure 54 : Impact du composé N sur l'expression de la protéine ORF2, l'inhibition de la PS et de la SPP.** (A) A 7 j.p.e, les cellules PLC3/HEV-p6 ont été traitées tous les jours pendant 3 jours avec des concentrations croissantes du composé N puis des lysats cellulaires ont été générés et analysés en WB à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6, de l'anticorps Notch-1 total, de l'anticorps anti-Notch-1 clivé (NICD), de l'anticorps anti-GRP78 et de l'anticorps anti-tubuline- $\beta$ . (B) Les surnageants issus des mêmes cultures ont été traités avec 0,5% de Triton X-100 avant d'être soumis à des immunoprécipitations à l'aide des anticorps P1H1 et P3H2. La détection de la protéine ORF2 a été réalisé par WB à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6. (C) Analyse de l'impact du composé N sur l'inhibition de la SPP et de ce fait sur la maturation protéolytique de la protéine Core du HCV, dans des cellules PLC3 transfectées avec un plasmide codant la protéine Core du HCV, après 16h de traitement. Les cellules ont ensuite été lysées et un WB a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-Core.

Si la PS est l'i-CLIP impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i, son inhibition pharmacologique avec le composé N devrait induire une réduction significative des titres infectieux intracellulaires et extracellulaires. En effet, ceux-ci ont été déterminés après trois jours de traitement de cellules PLC3/HEV-p6 et comparés, en parallèle, à ceux obtenus avec la ribavirine (RBV), un inhibiteur de réplication du HEV utilisé en clinique **(Figure 55A)**. Dans les cellules traitées avec le composé N, nous avons observé une diminution drastique et dose-dépendante des titres infectieux intracellulaires et extracellulaires, de manière semblable aux cellules traitées avec les différentes concentrations de RBV. Ces résultats indiquent que l'inhibition spécifique de la PS affecte significativement l'infectiosité virale, probablement par le biais de l'inhibition de la maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Nous avons calculé les valeurs d'IC<sub>50</sub> intracellulaires et extracellulaires du composé N vis-à-vis de la souche p6 de HEV-3 après 3 jours de traitement, celles-ci sont de 350 nM et 690 nM, respectivement (**Figure 55B**). Le composé N, qui est en développement clinique avancé, constitue donc une molécule à fort potentiel antiviral.



**Figure 55 : Impact du composé N, un inhibiteur de préséniline, sur l'infectiosité du HEV.** (A) Impact du composé N sur les titres infectieux extra- et intra-cellulaires. Des cellules PLC3/HEV-p6 ont traitées tous les jours pendant trois jours avec les concentrations indiquées du composé N et de ribavirine (RBV), puis les particules virales intra- et extra-cellulaires ont été extraites et appliquées sur des cellules Huh-7.5 afin de déterminer les titres infectieux. Après trois jours, les cellules ont été fixées et des marquages anti-ORF2 1E6 réalisés. Chaque cellule positive correspond à une FFU. Les résultats ont été exprimés en FFU/mL. (B) Détermination des IC50 au niveau extra- (gauche) et intra-cellulaires (droite) à partir de cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec le composé N. IC50 = Concentration inhibitrice 50.

Nous avons ensuite voulu contrôler que la réduction des titres infectieux induite par le composé N (Figure 55) ne soit pas due à un effet sur la réplication du génome viral (Fig. 56). Pour cela, nous avons utilisé la lignée PLC3 exprimant stablement un réplicon (unité autonome de réplication couplée à une activité rapportrice) de la souche p6 appelée PLC3/HEV-replicon-ORF2s. Ce réplicon est composé de la séquence codant la réplicase virale ORF1, d'une séquence codant un gène de résistance à la puromycine ainsi que la séquence codant les 321 derniers résidus de la protéine ORF2 (qui présente l'épitope reconnu par l'anticorps 1E6) (Figure 56A). Les cellules exprimant ce réplicon ont été sélectionnées par l'ajout de puromycine dans le milieu de culture. Dans ces cellules PLC3/HEV-replicon-ORF2s, la réplication HEV peut être évaluée par RT-qPCR ou par immunofluorescence/WB en utilisant l'anticorps 1E6 qui reconnaît la protéine ORF2s (pour « short »). En immunofluorescence ou WB, l'intensité de fluorescence ou de détection de la protéine ORF2s est proportionnel au niveau de réplication du génome viral. Nous avons donc traité ces cellules PLC3/HEV-replicon-ORF2s avec les différentes concentrations de composé N ou de RBV, puis évalué la réplication virale par immunofluorescence (Figure 56B) et RT-qPCR (Figure 56B). En immunofluorescence, nous avons observé une diminution dose-dépendante de l'intensité de fluorescence dans les cellules traitées avec la RBV, utilisée comme contrôle positif de l'inhibition de la réplication. A l'inverse, dans les cellules traitées avec le composé N, aucune différence n'a été observée (Figure 56B). Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR et ont montré une absence d'effet du composé N sur la réplication du génome viral (Figure 56B). Ainsi, nos résultats indiquent que l'inhibition de l'infectiosité virale induite par le composé N est indépendante d'un effet sur la réplication virale.



**Figure 56 : Impact du composé N sur la réplication virale.** (A) Représentation schématique de la construction utilisée pour générer la lignée stable PLC3/HEV-replicon-ORF2s. Ces cellules ont été traitées avec différentes concentrations de composé N et de RBV pendant 3j puis une partie des cellules a été fixée pour réaliser des immunofluorescences (B) et l'autre utilisée pour extraire les ARN intracellulaires (C). (B) Les cellules fixées ont été analysées en microscopie confocale. Rouge = ORF2 ; Bleu = DAPI. (C) Les ARN intracellulaires extraits ont été analysés en RT-qPCR à l'aide d'une sonde ciblant la région ORF1.

Nous avons pu montrer le potentiel antiviral du composé N dans des cellules d'hépatocarcinome humain, la lignée PLC3 **(Figure 55)**. Nous avons donc ensuite cherché

à confirmer l'activité antivirale du composé N dans un modèle pré-clinique *ex vivo*, que sont les hépatocytes primaires humains (PHHs) **(Figure 57)**. Pour cela, un jour après ensemencement (D0), des PHHs ont été infectés avec des particules virales intracellulaires et traités avec le composé N ou la RBV (**Figure 57A**). Les PHHs nécessitant du milieu frais chaque jour, nous avons ajouté un quart de milieu frais avec ou sans drogue dans chacun des puits les deux jours suivants (D-1 et D-2). Le troisième jour (D-3), les surnageants de culture ont été récoltés et utilisés pour analyser l'impact des drogues sur la sécrétion des protéines ORF2g en WB **(Figure 57B)** et sur les titres infectieux extracellulaires **(Figure 57C)**.

Comme précédemment, nous avons observé que le composé N n'affectait pas le profil de détection de la protéine ORF2g dans les surnageants de PHHs **(Figure 57B)** là où nous n'observions plus de signal associé à la protéine ORF2g dans les cellules traitées avec la RBV qui inhibe la réplication et donc la production des protéines virales et leur détection au niveau extra- et intracellulaire. Ces résultats indiquent que le composé N n'impacte pas la sécrétion de la protéine ORF2g, et plus globalement la sécrétion des protéines, dans le surnageant des PHHs.

Ensuite, nous avons analysé l'impact du traitement avec le composé N sur les titres infectieux extracellulaires **(Figure 57C)**. Dans les surnageants de PHHs traités avec le composé N, les titres infectieux extracellulaires étaient significativement réduits par rapport à la condition contrôle, à des niveaux plus importants encore qu'avec la RBV. Ces résultats suggèrent que le composé N inhibe la production des particules virales en PHHs, comme observé en cellules d'hépatome humain **(Figure 55)**. De manière importante, l'inhibition observée était plus importante que celle observée dans la condition traitée avec la RBV, qui est la molécule utilisée actuellement en clinique pour lutter contre l'infection par le HEV. Ces résultats obtenus en cellules primaires confirment l'effet antiviral puissant du composé N et apportent la preuve de concept de l'activité antivirale du composé N en modèle préclinique.



**Figure 57 : Impact du composé N sur la production de la protéine ORF2 et des particules virales en hépatocytes primaires humains infectés par le HEV.** (A) Stratégie expérimentale. Un jour après ensemencement (D-0), les hépatocytes primaires humains (PHHs) ont été infectés avec des particules virales intracellulaires et traités avec les composés/solvant correspondants. Aux jours 1 et 2 (D-1 et D-2), du milieu frais et les composés/solvants ont été ajoutés au milieu existant. Au jour 3 (D-3), les surnageants ont été récupérés puis analysés en WB et les titres infectieux ont été déterminés. D = jour. (B) Des WB à l'aide de l'anticorps anti-ORF2 1E6 ont été réalisés sur les surnageants récoltés. (C) Les surnageants contenant les particules virales extracellulaires ont été appliqués sur des cellules Huh-7.5 pendant trois jours pour déterminer les titres infectieux extracellulaires puis des immunofluorescences ont été réalisées à l'aide de l'anticorps 1E6. Les résultats sont exprimés en titres infectieux relatifs. Les cellules traitées avec la RBV ont été utilisées comme contrôle positif de l'inhibition des titres infectieux.

Suite à l'obtention de cette preuve de concept, nous avons initié deux collaborations afin d'évaluer l'efficacité du composé N dans des modèles animaux d'infection par le HEV :

- La première collaboration a été établie avec le laboratoire du Pr Philip Meuleman (Université de Gand, Belgique). L'objectif de cette collaboration est d'évaluer l'efficacité du composé N dans un modèle murin au foie humanisé, infecté par le HEV-1 ou le HEV-3 (souris uPa-SCID au foie humanisé, comme décrit dans Sayed et al., 2017).
- La seconde collaboration a été établie avec l'équipe du Pr Johan Neyts (Rega Institute, KU Leuven, Belgique). L'objectif de cette collaboration est d'évaluer l'efficacité du composé N dans un modèle de rat immunodéprimé (Hsd:RH-Foxn1<sup>rnu</sup>), infecté par une souche de HEV de rat, la souche LA-B350 (comme décrit dans Zhang et al., 2023).
Les résultats des expériences réalisées dans le cadre de ces collaborations sont attendus prochainement.

### Mode d'action du composé N : validation de la cible virale

Précédemment, nous avons pu montrer l'efficacité antivirale du composé N vis-àvis de l'infection par le HEV dans des modèles in vitro et préclinique de PHHs. Le composé N étant un inhibiteur spécifique de la PS, il est important de démontrer le mode d'action de ce composé vis-à-vis du HEV. Nous avons montré que la PS était probablement responsable de la maturation protéolytique de la protéine ORF2i mais l'inhibition des titres infectieux induite par le composé N et l'altération de la morphologie des usines virales sont-elles réellement attribuables à une action du composé N sur l'extrémité Nt de la protéine OR2i ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une construction chimérique générée par le Dr Kévin Hervouet au sein du laboratoire. Cette construction fait intervenir les trente-six premiers résidus de l'extrémité Nt de la protéine ORF2 (comprenant le peptide signal et l'ARM) ainsi que l'ectodomaine de la glycoprotéine CD4 (Figure 57A). Cette construction a été transfectée dans les cellules H7-T7-IZ et l'impact des différents composés analysé en immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps dirigée contre l'ectodomaine de la protéine CD4 (Figure 57B). Lorsque la maturation protéolytique de la protéine ORF2i a lieu, le peptide signal de cette construction est inefficace et l'ARM va induire une localisation nucléaire de cette protéine. En quantifiant les ratios d'intensité de fluorescence nucléaire/cytosolique (Fn/c), la valeur devrait alors devrait être comprise entre 0,7 et 1 (Figure 57A, gauche). Si l'inhibition de la PS affecte bien l'extrémité Nt de la protéine ORF2i, le clivage en amont de la Leu14 n'aura pas lieu et le peptide signal de la protéine chimérique sera alors fonctionnel. La protéine sera alors adressée à la voie de sécrétion. La protéine présentera de ce fait une localisation cytoplasmique majoritaire et la valeur de Fn/c chutera drastiquement (Figure 57A, droite).

En effet, dans la condition contrôle (DMSO), la protéine chimérique présentait une localisation majoritairement nucléaire associée à une valeur de Fn/c de 1 **(Figure 57B)**. De manière intéressante, dans les cellules traitées avec le composé L, qui inhibe à la fois la PS et la SPP, la protéine chimérique montrait une localisation majoritairement cytoplasmique aux deux concentrations testées, avec des valeurs de Fn/c inférieures à 0,3

(Figure 57B). Ceci indique que l'impact de l'inhibition des i-CLIPs sur le cycle infectieux du HEV pourrait être attribué à un effet sur l'extrémité Nt de la protéine ORF2i. Pour aller plus loin, nous avons traité les cellules exprimant la construction chimérique avec le composé N et avons également observé une localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine chimérique, de façon dose-dépendante, avec des valeurs de Fn/c inférieures à 0,4 (Figure 57B).

Les résultats obtenus ici suggèrent que la PS agit directement sur l'extrémité Nt de la protéine ORF2i. De façon complémentaire, le composé N ne modifiait pas la localisation subcellulaire de l'ORF2s qui est dépourvue de l'extrémité Nt de l'ORF2 **(Figure 56)**, confirmant que la préséniline agit sur l'extrémité Nt de la protéine ORF2.

Néanmoins, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ces observations. En ce sens, nous avons initié des expériences d'identification de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i par marquage Nt (à l'aide du TMPP, qui se fixe sur l'extrémité aminoterminale des protéines) suivi par une analyse en spectrométrie de masse, à partir de surnageants de cellules PLC3/HEV-p6 traitées ou non avec le composé N. Ces analyses devraient permettre de mettre en évidence une modification de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i, au profit d'une forme plus longue de la protéine, lorsque la PS est inhibée par le composé N.

Nous prévoyons également de compléter ces données en caractérisant le phénotype de la mutation du résidu qui se trouve directement en amont de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i.

Les données obtenues permettront de valider la cible virale et le mécanisme d'action du composé N.

Α



Figure 57 : Impact du composé N sur la localisation subcellulaire de la chimère ORF2/CD4. (A) Représentation de la protéine chimérique exprimée, comprenant l'extrémité Nt de la protéine ORF2 (peptide signal + ARM) suivi de l'ectodomaine de la glycoprotéine CD4 et de sa localisation subcellulaire, en absence (à gauche) et en présence (à droite) d'inhibiteurs de préséniline, le composé L ou le composé N. (B) Les cellules H7-T7-IZ ont été transfectées avec la construction codant la protéine chimérique ORF2/CD4 pendant 24h. Après 8h de transfection, les cellules ont été traitées pendant 16h avec les concentrations indiquées du composé L ou N. Puis, les cellules ont été fixées et des immunofluorescences indirectes à l'aide de l'anticorps anti-CD4 ont été réalisées. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale et les ratios d'intensité de fluorescence noyau/cytoplasme (Fn/c) ont été déterminés à l'aide du logiciel Fiji.

### Mode d'action du composé N : validation de la cible cellulaire

Nous avons montré que la PS était impliquée dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i et que l'inhibition de ce processus, par le composé N notamment, induisait une altération de la morphologie des usines virales et une réduction drastique des titres infectieux en cellules PLC3 et en PHHs. Afin de confirmer que l'inhibition de la PS est bien responsable des effets observés, nous prévoyons de transfecter des cellules PLC3/HEV-p6 avec des siRNA ciblant les deux isoformes de la PS, PS-1 et PS-2 puis d'analyser l'impact de cette transfection sur la morphologie des usines

virales en immunofluorescence et sur les titres infectieux. Cette approche permettra de confirmer les résultats obtenus avec le composé N et de renforcer la caractérisation du mécanisme d'action de ce composé dans le contexte de l'infection par le HEV.

Pour conclure, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont permis de mettre en évidence le rôle des i-CLIPs et plus précisément de la préséniline dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i, qui est la forme associée aux particules infectieuses. Nous avons pu valider que la cible de la PS était bien l'extrémité Nt de la protéine ORF2i. Par la suite, nous allons confirmer le rôle de la préséniline dans ce processus par la transfection de siRNA. Nous avons montré que l'inhibition de la préséniline par le composé N induit une altération de la morphologie des usines virales et une réduction drastique des titres infectieux, sans impacter la réplication virale et le niveau de détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de culture. Ces résultats suggèrent que la protéine ORF2i produite dans ces conditions présente probablement une conformation différente qui impacte négativement l'infectiosité des particules virales. Pour confirmer cela, nous avons initié une caractérisation des particules virales produites en présence de N. Enfin, nous avons validé l'activité antivirale du composé N dans un modèle préclinique d'hépatocytes primaires humains. Ces résultats seront confirmés prochainement dans des modèles *in vivo*.

Ces données ont permis d'identifier la préséniline comme un facteur d'hôte incontournable pour la production de la forme ORF2i (qui forme les capsides virales) et comme cible thérapeutique prometteuse. En ce sens, le composé N, qui est en phase III de développement clinique, représente une stratégie thérapeutique prometteuse pour lutter contre l'infection par le HEV.

## **Discussion et perspectives**

### I) Objectif #1 – Annexe 1 : Caractérisation du trafic nucléocytoplasmique de la protéine de capside ORF2 du HEV

Dans le cadre de mon premier objectif de thèse, nous avons pu mettre en évidence qu'au cours du cycle infectieux du HEV, la protéine ORF2 était importée de manière précoce dans le noyau des cellules infectées par le biais d'un mécanisme Importine- $\alpha$ 1dépendant. Nous avons montré que l'Importine- $\alpha$ 1 reconnaît comme NLS un motif riche en résidus arginine (ARM) au niveau de l'extrémité Nt de la protéine ORF2. Des inhibiteurs pharmacologiques de l'importine- $\alpha$ 1, comme le gossypol ou l'ivermectine, ont été précédemment caractérisés dans le cadre de pathologies parasitaires, virales ou cancéreuses. En effet, l'ivermectine est une lactone macrocylique disaccharidique qui a un potentiel antiparasitaire, anticancéreux et antiviral. L'ivermectine est notamment capable d'inhiber l'infection par le VIH ou le DENV en interférant avec l'import nucléaire de l'intégrase du VIH et la protéine NS5 du DENV (Wagstaf et al., 2012). Le gossypol est une molécule naturelle extraite de la plante de coton qui a montré un potentiel anticancéreux et antiviral, notamment. Le gossypol a montré sa capacité à inhiber l'import nucléaire de la protéine NS5 du WNV et de la protéine V du virus Hendra (Lopez-Denman et al., 2018 ; Atkinson et al., 2018). Dans le cadre de l'infection par le HEV, nous avons tenté de traiter des cellules PLC3/HEV-p6 avec de l'ivermectine ou du gossypol aux temps précoces de l'infection afin de visualiser l'impact de ces composés sur l'import nucléaire de la protéine ORF2 et sur l'infectiosité virale, mais cette tentative est restée sans succès. En effet, ces composés étaient toxiques aux concentrations testées ou n'étaient pas efficaces à des concentrations plus faibles, dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, une étude néerlandaise a montré la capacité de l'ivermectine à inhiber la réplication du HEV dans plusieurs lignées cellulaires, *in vitro* (Li et al., 2021). Pour autant, nous avons montré que l'inhibition de l'import nucléaire de la protéine ORF2 par la mutation 5R/5A n'affectait pas le niveau de détection des ARN viraux au niveau intracellulaire, suggérant que l'inhibition de l'import nucléaire de la protéine ORF2 n'affecte pas la réplication virale (Hervouet et al., 2022 ; Annexe 1). Ces observations contradictoires pourraient s'expliquer par un effet pléiotrope de l'ivermectine, qui ne cible pas uniquement l'import nucléaire des protéines mais est également capable de moduler l'autophagie en

interagissant avec l'axe PAK/Akt (Dou et al., 2016). Également, de par sa structure chimique, l'ivermectine est capable de former des ionophores de cations (pour le zinc par exemple) (Rizzo, 2020), ce qui pourrait moduler l'autophagie mais aussi inhiber les RdRp de certains virus, par le biais de mécanismes similaires à celui du Remdesivir (te Vertuis et al., 2010 ; Adegboro et al., 2021). Par là même, une étude a montré que les sels de zinc inhibaient la réplication du HEV en ciblant la RdRp virale (Kaushik et al., 2017). Cette activité de l'ivermectine, indépendante de l'inhibition de l'import nucléaire, pourrait être responsable de l'inhibition observée de la réplication du HEV. Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour cibler l'import de la protéine ORF2 dans le cadre d'une approche antivirale.

De manière intéressante, nous avons observé la présence de deux formes de la protéine ORF2 dans le noyau des cellules infectées par le HEV : ORF2ni pour

« nucléaire/infectieuse » et ORF2nc pour « nucléaire/clivée ». L'origine de ces deux formes n'est pour l'heure pas connue. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que cette forme présente le même poids moléculaire et la même extrémité Nt que la forme ORF2i (données non montrées), suggérant que c'est bien la protéine ORF2i qui est transloquée dans le noyau des cellules. La forme ORF2nc serait quant à elle un produit de clivage de la forme ORF2ni, par un mécanisme qui n'est pas connu à ce jour. En ce sens, il serait intéressant d'essayer d'identifier le mécanisme de production de la forme ORF2nc et d'analyser son rôle dans le cycle infectieux du HEV plus globalement. De plus, il serait intéressant d'étudier le devenir de ces formes, de déterminer si elles subissent des modifications post-traductionnelles et de savoir si, après export nucléaire, ces formes sont assemblées pour former du matériel particulaire. En effet, ces aspects ne sont pas caractérisés à ce jour et permettraient de mieux comprendre le cycle infectieux du HEV et l'importance des formes ORF2ni/nc dans celui-ci.

Nous avons montré que la translocation nucléaire de la protéine ORF2 permettait notamment de réguler l'expression de gènes cellulaires impliqués dans l'immunité antivirale. Dès lors, plusieurs questions se posent : (i) comment la protéine ORF2 modulet-elle l'expression des gènes cellulaires ? En se liant directement sur l'ADN ou en interagissant avec une protéine cellulaire ? (ii) Comment cette régulation génique impacte l'immunité anti-HEV ? A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence de domaine de liaison à l'ADN sur la protéine ORF2 et dans nos expériences de fractionnement subcellulaire, nous n'avons pas détecté de protéine ORF2 dans la fraction associée à la chromatine (données non montrées), indiquant que cette régulation pourrait se faire de façon indirecte. Nous avons alors initié un travail en collaboration avec la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut Pasteur de Lille (dirigée par Jean-Michel Saliou) afin d'identifier les partenaires nucléaires de la protéine ORF2, aux temps précoces de l'infection. La régulation génique induite par la translocation nucléaire de la protéine ORF2 impacte les gènes comme CCL2 et CCL20 qui sont des chimiokines impliquées dans le recrutement, la migration et l'infiltration des monocytes/macrophages ainsi que de des lymphocytes T régulateurs (Deshmane et al., 2009 ; Baumforth et al., 2008). Également, l'expression des gènes CXCL1 et CXCL2 se voit diminuée. Les protéines CXCL1 et CXCL2 sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles (Korbecki et al., 2022). Ces résultats indiquent que la localisation nucléaire de la protéine ORF2 vise à interférer avec le recrutement des cellules de l'immunité à médiation cellulaire, notamment. En ce sens, ces résultats vont dans le sens d'autres études qui ont conclu que l'immunité à médiation cellulaire était primordiale pour lutter contre le HEV (Kupke et Werner, 2021 ; Wu et al., 2021 ; Bremer et al., 2021). Les mécanismes moléculaires précis, sous-jacents à ces observations ne sont pour l'heure pas connus, dans le cadre de l'infection par le HEV, et mériteront d'être étudiés.

Après les étapes d'import nucléaire de la protéine ORF2 et de régulation transcriptionnelle, nous avons montré que la protéine ORF2 est exportée du noyau des cellules infectées de façon CRM1-dépendante. Nous avons également observé que l'inhibition de l'export nucléaire de la protéine ORF2 par la mutation des sites NES, affectait drastiquement l'infectiosité virale. En ce sens, l'inhibition pharmacologique de CRM1 pourrait représenter une approche antivirale intéressante. De plus, des molécules inhibitrices spécifiques de CRM1 (SINEs) comme le Selinexor ou le Verdinexor suivent actuellement un développement clinique de phase I/II et ont montré une activité antivirale vis-à-vis d'autres virus, comme le virus de la Grippe ou le VIH (Mathew et Ghildyal, 2017 ; Jans et al., 2019). Le Verdinexor a montré sa capacité à inhiber significativement l'export nucléaire de la protéine ORF2 dans les cellules PLC3/HEV-p6. Il serait également intéressant de tester sa capacité à inhiber l'infectiosité virale. Le cas échéant, le Verdinexor ou un autre SINE pourrait représenter des candidats antiviraux prometteurs.

### II) Objectif #2 – Annexe 2 : Identification et caractérisation des usines virales du HEV

Dans le cadre de mon second objectif de thèse, nous avons développé des anticorps dirigés contre la forme ORF2i de la protéine de capside du HEV et notamment l'anticorps P1H1 qui cible un épitope Nt. Nous avons montré que cet anticorps était capable de reconnaître uniquement la forme ORF2i associée aux particules virales, sans crossréaction avec les formes glycosylées ORF2g/c, présente à la fois dans les surnageants de culture cellulaire et dans le sérum des patients infectés. Dans le cadre des démarches diagnostiques directes visant à détecter les antigènes viraux et notamment la protéine ORF2, les tests commercialisés reconnaissent les différentes isoformes ORF2. Or, il avait été précédemment montré dans le laboratoire que les formes glycosylées ORF2g/c, qui ne sont pas associées aux particules virales et qui sont massivement sécrétées, sont majoritairement reconnues par les kits de détection antigénique utilisés. De plus, ces formes sont hautement stables et détectables dans le sérum des patients après clairance virale (Ankavay et al., 2019; Behrendt et al., 2016). Ceci indique que ces tests ne sont pas capables de discerner une infection active d'une infection résolue récente. Le développement de l'anticorps P1H1 ouvre donc une nouvelle voie à la mise au point d'un test rapide d'orientation diagnostique qui permettrait de cibler la capside virale et donc de mettre en évidence les infections actives. De plus, le faible coût de ce type de test pourrait être intéressant dans les pays en voie de développement.

Au-delà de l'application diagnostique, l'utilisation des anticorps anti-ORF2i a permis d'identifier et de caractériser les usines virales du HEV. Elles sont composées de structures tubulaires et vésiculaires d'origine membranaire, observables en microscopie électronique (EM), et sont enrichies en protéines virales (ORF1, ORF2 et ORF3) et en ARN viral. Nous avons également montré que ces usines virales dérivaient du compartiment endosomal de recyclage (ERC) et que les protéines virales ainsi que l'ARN viral colocalisaient avec les protéines Rab11 et CD71, des marqueurs de l'ERC. Nous avons montré que l'extinction de Rab11 altérait la morphologie des usines virales et affectait l'infectiosité virale de façon indépendante de la réplication. Les structures tubulaires, qui mesurent 20-25nm de diamètre, forment des tubules parfaitement parallèles. De plus, leur diamètre est proche de celui des particules virales intracellulaires observées en EM. Les structures vésiculaires ont, quant à elles, un diamètre compris entre 50 et 250nm et semblent parfois contenir des particules virales. En ce sens, nous avons émisl'hypothèse

que les structures tubulaires pourraient correspondre à des précurseurs de virions contenant des virions assemblés ou pré-assemblés alors que les structures vésiculaires pourraient correspondre à un compartiment plus tardif d'assemblage viral. Une autre hypothèse serait que les structures tubulaires constitueraient une voie sans issue au niveau de laquelle les structures vésiculaires viendraient s'accumuler et fusionner. La présence de ces structures a été analysée dans des cellules électroporées PLC3/HEV-p6 et Huh-7.5/HEV-p6 ainsi que dans des cellules Huh-7.5 infectées, indiquant que ces structures ne sont pas dépendantes d'une lignée cellulaire ou du processus d'électroporation. Il serait cependant intéressant d'analyser la présence de ces structures dans des cellules infectées/électroporées avec d'autres souches/génotypes de HEV ou en cellules primaires.

La nature membranaire des structures vésiculaires et tubulaires identifiées ainsi que le fait qu'elles dérivent de l'ERC, suggèrent l'implication du cytosquelette dans la biogenèse des usines virales du HEV. En effet, les précurseurs de particules virales pourraient être acheminés au sein de la cellule par des effecteurs moléculaires, reliés aux microtubules, aux filaments intermédiaires ou aux microfilaments d'actine. De nombreux virus exploitent le cytosquelette cellulaire au niveau de plusieurs étapes de leur cycle viral. De manière intéressante, les usines virales du DENV ou le virus de la peste africaine (ASFV) sont localisées dans les régions périnucléaires, à proximité du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Zhang et al., 2021). Celles-ci induisent également une déformation du noyau cellulaire, de façon similaire à ce que vous avons décrit dans le cadre de l'infection par le HEV (Zhang et al., 2021 ; Bentaleb et al., 2022). Il a été montré que dans ces cas précis, les usines virales impliquent une réorganisation des filaments intermédiaires de vimentine et utilisent les microtubules comme support pour ce réarrangement (Zhang et et al., 2021). Plus en détails, des protéines virales sont capables d'induire le clivage ou le désassemblage des filaments intermédiaires de vimentine afin d'induire leur relocalisation, grâce aux microtubules, au niveau des régions périnucléaires pour former des cages de vimentine autour des usines virales (Figure 58). Par là même, il a été montré que la protéine ORF3 interagit avec les microtubules et pourrait donc être impliquée dans la régulation de ce processus, dans le cadre de l'infection par le HEV (Kannan et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'implication du cytosquelette et notamment des filaments intermédiaires de vimentine dans la biogenèse des usines virales ainsi que dans le cycle infectieux du HEV plus largement.

Nous avons montré par le biais de l'extinction de la protéine Rab11, l'importance de l'intégrité de l'ERC pour produire des particules virales infectieuses. En effet, l'extinction de Rab11 induit une diminution des titres infectieux d'environ 60%, ce qui suggèrent que l'ERC pourrait être une voie de production des particules virales non exclusive. Jusqu'à lors, il était communément admis que les particules virales étaient produites par le biais d'un mécanisme d'exocytose depuis la voie des MVB (Nagashima et al., 2014). Néanmoins, les résultats obtenus ici suggèrent que deux voies de production des particules virales pourraient co-exister, la voie des MVB et la voie dépendante de l'ERC. Des analyses complémentaires devront être réalisées, notamment avec d'autres génotypes de HEV et en cellules primaires, afin de corroborer ces observations. Néanmoins, d'un point de vue évolutif, il semblerait plus efficace et avantageux pour le virus de disposer de deux voies de production de ses particules infectieuses.



Figure 58 : Représentation schématique de l'implication des filaments intermédiaires de vimentine et des microtubules dans la biogenèse des usines virales. (A) Mécanisme de réarrangement dynamique des filaments intermédiaires de vimentine pendant la réplication et l'assemblage viral. Les filaments de vimentine forment des cages autour des usines virales, à proximité du MTOC. Dans certains cas, les cages de vimentine peuvent être dégradées pour promouvoir l'assemblage viral ou la sécrétion des particules virales. (B) Modèle moléculaire du réarrangement des filaments de vimentine et de leur relocalisation au niveau des régions périnucléaires, autour des usines virales. Le DENV induit une phosphorylation de la vimentine au niveau de la sérine 38 par la CaMKII et au niveau de la sérine 71 par ROCK. L'ASFV induit une phosphorylation de la vimentine au niveau de la sérine 82 par CaMKII. Ces phosphorylations de la vimentine induisent un désassemblage de la vimentine et sa relocalisation dans les régions périnucléaires grâce au réseau de microtubules et grâce à une interaction avec la dynéine, un moteur moléculaire, impliqué dans le transport vers l'extrémité négative des microtubules. Ceci peut peut-être inhibé en surexprimant la sous-unité p50 de la dynactine, qui va inhiber l'activité de la dynéine. Tiré de Zhang et al., 2021.

### III) Objectif #3 – Annexe 3 : Étude du mécanisme d'adressage de la protéine de capside ORF2i aux usines virales du HEV

Dans le cadre de mon troisième objectif de thèse, nous avons mis en évidence l'importance du trafic médié par le complexe adapteur AP-1 dans l'adressage de la protéine de capside ORF2i du HEV aux usines virales ainsi que dans la production des particules virales. Nous avons montré que la colocalisation et l'interaction entre le complexe adapteur AP-1 et la protéine ORF2i étaient conservées entre la souche p6 de HEV-3 et la souche Sarr55 de HEV-1. De plus, nous avons montré que l'inhibition du complexe adapteur AP-1 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique ou à l'aide d'un siRNA affecte drastiquement cette colocalisation/interaction et impacte négativement l'infectivité virale, soulignant l'importance de l'interaction AP-1/ORF2i dans la production de particules virales infectieuses, en lignées d'hépatome humain et en hépatocytes primaires humains. L'interaction entre le complexe AP-1 et des protéines virales a été mis en évidence chez de nombreux virus appartenant à des familles bien distinctes. Par exemple, le complexe AP-1 interagit avec la protéine Nef du HIV, la protéine CD2v du ASFV ou la protéine ORF9p du virus de la varicelle (Bresnahan et al., 1998 ; Pérez-Núñez et al., 2015 ; Lebrun et al., 2019). Le complexe AP-1 est capable de reconnaître des motifs consensus sur les cargos protéiques qu'il transporte. Ils sont de deux types : les motifs riches en tyrosine (YXXØ) ou les motifs dileucine ([DE]XXXL[LI]) (Park and Guo, 2014). En analysant la séquence primaire de la protéine ORF2i, nous avons identifié un motif LLXXXD hautement conservé dans le domaine cytosolique de la protéine. Ce motif est situé dans une région désordonnée et exposée de l'ORF2 (données non présentées), conformément aux caractéristiques connues des substrats du complexe AP-1. Nous avons muté ce motif et sa caractérisation a permis de mettre en évidence un phénotype intéressant mais pour l'heure, certains résultats obtenus restent difficiles à expliquer (données non présentées). Ce mutant nécessite d'être plus amplement caractérisé.

De manière intéressante, une étude japonaise a mis en évidence que la protéine résidente du TGN, TGOLN2/TGN46, était retrouvée à la surface des particules virales enveloppées, suggérant que la biogenèse des particules virales est initiée à partir de vésicules intracellulaires provenant du TGN (Nagashima et al., 2014 ; Das et al., 2023). Comme le complexe AP-1 est capable de reconnaître des cargos ancrés dans les membranes du TGN, nos résultats vont dans le sens de ces données. Néanmoins, nous n'avons pas pu formellement montrer la localisation de la protéine ORF2i au niveau du TGN, probablement du fait du caractère dynamique de son trafic subcellulaire.

Une étude suisse a montré que la protéine ORF3 est palmitoylée au niveau de huit résidus cystéine localisés au niveau Nt de la protéine et qu'elle est exposée du côté cytosolique des membranes intracellulaires (Gouttenoire et al., 2019). Les résultats obtenus au laboratoire ainsi qu'une autre étude ont montré que la protéine virale ORF3 est également retrouvée au niveau de l'ERC (Chandra et al., 2008 ; Bentaleb et al., 2022). Comme les protéines ORF2i et ORF3 présentent la même topologie vis-à-vis des membranes intracellulaires et interagissent étroitement, nous ne pouvons pas exclure que la protéine ORF3 soit également adressée aux usines virales du HEV par le biais d'un mécanisme AP-1-dépendant ou que le complexe ORF2i/ORF3 soit transporté de cette façon. Le fait que la localisation subcellulaire de la protéine ORF3 soit également affectée suite à l'inhibition du complexe AP-1 renforce cette hypothèse. En plus d'éventuelles modifications post-traductionnelles des cargos, des protéines cytosoliques particulières recrutées comme protéines accessoires peuvent se lier à AP-1 afin de faciliter le recrutement du cargo. C'est le cas notamment des protéines de famille des PACS (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein) et particulièrement de PACS-1 (Wan et al., 1998 ; Tu et al., 2020). Ainsi, la protéine ORF2i pourrait être importante pour garantir la localisation subcellulaire de la protéine ORF3, comme PACS-1 pourrait le faire dans d'autres cas. Dans ce cas, l'inhibition de l'interaction ORF2i/AP-1 altèrerait la distribution subcellulaire de la protéine ORF3 ainsi que l'assemblage et/ou la sécrétion des particules virales. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet vont dans ce sens et semblent conforter cette hypothèse. Une autre possibilité aurait été que l'inhibition du complexe AP-1 affecte directement la protéine ORF3 et non la protéine ORF2i. La caractérisation de virus n'exprimant pas la protéine ORF3 (△ORF3) a montré que la protéine ORF3 était nécessaire pour la sécrétion des particules virales mais pas pour l'étape d'assemblage viral. Ceci était caractérisé par une diminution des titres infectieux extracellulaires exclusivement (Emerson et al., 2006). Dans ce travail, nous observons une diminution d'environ 70% des titres infectieux extra- et intra-cellulaires dans les cellules traitées avec A5 ou transfectées par le siRNA ciblant AP1  $\gamma$ 1, indiquant que l'étape d'assemblage viral est affectée. En ce sens, nos observations montrent que le phénotype observé ne peut pas être attribué à un effet sur la protéine ORF3 mais bien à un effet sur la protéine ORF2i.

Plus largement, l'interaction ORF2i/AP-1 pourrait avoir une importance plus grande encore que l'adressage de la protéine ORF2i aux usines virales ou que la production des particules virales du HEV. Le complexe AP-1 est impliqué dans le transport de nombreuses protéines cellulaires et l'interaction ORF2i/AP-1 pourrait affecter l'adressage de certaines protéines cellulaires. Notamment, l'interaction ORF2i/AP-1 pourrait promouvoir l'infection virale, interférer avec le recrutement de facteurs de restriction (comme ZAP, PRMT5/WDR77 ou GBP1, entre autres) ou permettre au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Glitscher et al., 2021 ; Ju et al., 2023 ; Yu et al., 2021). Par exemple, dans le contexte de l'infection par le HIV, l'interaction Nef/AP-1 interfère avec la localisation subcellulaire de protéines cellulaires en induisant notamment une réduction de la quantité de molécules du CMH de classe I ou de glycoprotéine CD4 détectables à la surface cellulaire (Iijima et al., 2012 ; Tavares et al., 2017). Ce mécanisme est probablement impliqué dans l'échappement du HIV à la réponse immunitaire en inhibant la présentation des antigènes viraux. Ceci devrait attirer notre attention afin de caractériser plus amplement l'impact de l'interaction ORF2i/AP-1 dans le contexte de l'infection par le HEV, au niveau de la cellule hôte. La caractérisation de cette interaction pourrait potentiellement permettre d'identifier de nouveaux facteurs d'hôtes impliqués dans la promotion de l'infection virale tout comme d'identifier de nouveaux facteurs de restriction ou encore de mieux comprendre les mécanismes d'échappements immunitaires mis en place par le HEV, afin de mettre en évidence de nouvelles cibles pour la mise en place de nouvelles stratégies antivirales.

### IV) Objectif #4 - Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des différentes formes de la protéine de capside ORF2 du HEV

Dans le cadre de ce quatrième projet de thèse, nous avons pu identifier les protéases cellulaires impliquées dans les processus de maturation protéolytique à l'origine de la formation des formes glycosylées ORF2g/c et de la forme ORF2i, qui est associée aux particules virales.

# Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c de la protéine de capside ORF2 du HEV

Dans cette partie de projet, nous avons pu identifier la protéase cellulaire impliquée dans la maturation protéolytique des formes ORF2g/c. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARN interférence, notamment, ont permis d'identifier la furine, une proprotéine convertase (PCs), comme étant la protéase impliquée dans le clivage des formes ORF2g, dont l'extrémité Nt est la Ser34, et ORF2c, dont l'extrémité est la Ser102. Ces extrémités Nt se trouvent directement en aval de séquences consensus de clivage reconnues par les PCs de type Kexin-like. Ces données permettent d'ajouter le HEV à la longue liste des virus dont une glycoprotéine est maturée par la furine.

De nombreuses données suggèrent que l'activité de certaines PCs de type Kexinlike est redondante. En ce sens, la furine, PC5 et PACE4 seraient capables de cliver les mêmes substrats (Seidah et al., 2008). Ces protéases présentent également une localisation au niveau des compartiments de la voie de sécrétion, empruntée par les formes ORF2g/c. Les résultats obtenus ici ont permis de montrer l'implication de la furine dans la maturation protéolytique des formes ORF2g/c sans toutefois pouvoir exclure le rôle d'une autre PC de type Kexin-like, comme PC5 ou PACE4 dans ce processus. Pour cela, nous pourrions réaliser des expériences d'extinction de ces protéases, comme pour la furine, afin d'analyser la présence ou non de formes plus longues de protéines ORF2 glycosylées, détectables après immunoprécipitation avec l'anticorps P1H1, dans les surnageants de culture cellulaire. Une autre stratégie pour analyser l'implication de ces protéases seraient de les réexprimer seules ou de façon combinée dans les cellules LoVo (qui sont dépourvues de ces protéases ; Takahashi et al., 1993) et de procéder comme décrit précédemment. Ces données permettraient de mieux comprendre encore les mécanismes de maturation protéolytique des formes ORF2g/c. Au laboratoire, nous avions montré que les protéines ORF2g/c ne formaient pas de matériel particulaire, néanmoins il serait intéressant d'analyser l'importance de la maturation protéolytique des formes ORF2g/c dans le cycle infectieux du HEV. Une étude américaine a montré que les formes glycosylées n'affectaient pas l'entrée ni l'attachement des particules virales et de ce fait ne modulaient pas l'infectiosité virale (Yin et al., 2018). Dans le cadre de ce travail, nous avons analysé l'impact du traitement avec des inhibiteurs pharmacologiques de PCs ou de l'extinction de la furine dans des cellules PLC3/HEV-p6 sur les titres infectieux (données non présentées). Les résultats obtenus montraient que l'inhibition de la maturation protéolytique des formes ORF2g/c n'affecte pas l'infectiosité virale non plus. Par la suite, nous pourrions également réaliser des tests de compétition avec des concentrations croissantes de formes glycosylées issues de surnageants de culture cellulaire traités ou non avec des inhibiteurs pharmacologiques de PC et analyser l'activité d'anticorps neutralisants vis-à-vis de l'infection. Par exemple, nous pourrions utiliser l'anticorps monoclonal neutralisant 9F7 ciblant la protéine ORF2, dont l'activité a été caractérisée (Zhao et al., 2015 ; Yin et al., 2018).

Les formes ORF2g/c servent de leurre immunologique vis-à-vis de la réponse immunitaire humorale, rendant les particules virales enveloppées moins reconnues et moins sensibles aux anticorps neutralisants dans des tests de neutralisation conventionnels (Takahashi et al., 2010). Il serait donc intéressant d'étudier l'importance de la maturation protéolytique des formes glycosylées dans ce processus. De plus, une étude américaine sur un virus analogue, le virus de l'hépatite A (HAV), a montré que les anticorps neutralisants n'étaient pas capables de reconnaître les particules virales enveloppées mais étaient capables d'inhiber l'infection lors d'une étape post-entrée (Feng et al., 2013). Un mécanisme similaire pourrait exister dans le cadre de l'infection par le HEV, et suggère que l'activité des anticorps neutralisants peut être plus complexe qu'une activité vis-à-vis de la particule virale. De même, les formes glycosylées ORF2g/c pourrait avoir des rôles immunomodulateurs additionnels qui pourraient être affectés par l'inhibition de la maturation protéolytique des formes ORF2g/c. Cet axe mériterait d'être étudié dans des systèmes d'études plus complexes et plus relevants, comme les cocultures in vitro ou les modèles animaux. En ce sens, des études ont montré que les glycoprotéines virales sécrétées pouvaient interférer avec la production d'interféron médiée par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Webster et al., 2016; Assil et

al., 2019). En effet, les pDC sont la source majeure d'interféron en réponse à une infection virale (Swiecki et Colonna, 2015). L'ARN viral serait reconnu par les pDC suite à un contact physique avec la cellule infectée afin de déclencher la production d'interféron (Webster et al., 2016). Il serait alors intéressant d'analyser (i) l'impact des formes ORF2g/c sur la régulation de ce processus et (ii) l'impact de l'inhibition de leur maturation protéolytique sur ce processus. Le premier point est en cours de développement dans le cadre d'une collaboration initiée avec le laboratoire du Dr Marlène Dreux (CIRI, Lyon) et le second mériterait d'être étudié le cas échéant, en utilisant par exemple des cellules PLC3/HEV-p6 n'exprimant pas la furine, afin de produire majoritairement des formes ORF2g/c non maturées, dans le but de mieux comprendre le rôle des formes glycosylées dans l'interférence avec l'immunité de l'hôte, ainsi que le rôle de leur maturation protéolytique, dans le cycle infectieux du HEV.

### Caractérisation des mécanismes de maturation protéolytique de la forme ORF2i du HEV

Après avoir identifié la furine comme étant la protéase impliquée dans la maturation protéolytique des formes ORF2g/c, nous avons ensuite cherché à identifier la protéase impliquée dans la maturation protéolytique de la forme ORF2i. La protéine ORF2i est associée aux particules infectieuses et son extrémité Nt, la Leu14 a été identifiée au sein du laboratoire (Montpellier et al., 2018). La Leu14 se situe au milieu du peptide signal de la protéine ORF2. Comme la protéine ORF2i est associée aux membranes de la voie de sécrétion au niveau de leur face cytosolique, nous avons émis l'hypothèse qu'une protéase intramembranaire (i-CLIP) pourrait être impliquée dans ce processus. Les i-CLIPs clivent leurs substrats au niveau des plans membranaires. A l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques bien caractérisés, nous avons pu mettre en évidence le rôle de la préséniline, qui est la sous-unité catalytique du macrocomplexe  $\gamma$ -sécrétase, dans le processus de maturation de la protéine ORF2i. L'inhibition pharmacologique de la préséniline induit une diminution drastique des titres infectieux et une altération morphologique des usines virales sans toutefois affecter la réplication virale ou la détection de la protéine ORF2i dans les surnageants de cellules PLC3/HEV-p6 traitées avec ces inhibiteurs. Ceci suggère que des particules virales sont probablement produites dans les surnageants de culture sans toutefois être infectieuses. Il pourrait être intéressant de caractériser la nature des particules virales produites dans ces conditions

(densité, taille, exposition des épitope, etc). Pour cela, nous pourrions réaliser des gradients de densité d'iodixanol afin de déterminer si les inhibiteurs de préséniline affectent les propriétés physico-chimiques des particules virales puis observer ces particules virales en microscopie électronique. Si les inhibiteurs de préséniline n'affectent pas les propriétés physico-chimiques des particules virales, l'inhibition des titres infectieux observée pourrait s'expliquer par une exposition différente des épitopes de la protéine ORF2i à la surface des particules virales.

Le fait que la morphologie des usines virales soit altérée suggère également que l'adressage intracellulaire de la protéine ORF2i est affecté par les inhibiteurs de préséniline. Il serait alors intéressant de mieux caractériser cet aspect. Notamment, il serait d'intérêt de définir si la forme ORF2i non clivée est capable d'interagir avec le complexe adapteur AP-1 afin d'être adressée aux usines virales. Pour répondre à cela nous pourrions réaliser des expériences de co-immunoprécipitation ou de PLA. Si l'interaction s'avérait affectée, cela suggérerait que le(s) site(s) d'interaction avec le complexe AP-1 présent sur la protéine ORF2i sont masqués par le traitement avec les inhibiteurs de préséniline. Lorsque nous aurons identifié l'extrémité Nt de la protéine ORF2i en présence de ces inhibiteurs, nous pourrons réaliser des modélisations AlphaFold2 de son repliement afin d'observer si le(s) motif(s) d'interaction avec le complexe AP-1 est/sont accessible(s). Toutefois, il est possible qu'un autre mécanisme, qui reste à être identifié, soit impliqué dans ce phénomène.

Par ailleurs, il serait intéressant de confirmer l'activité antivirale du composé N vis-à-vis d'autres génotypes/souches de HEV. Il serait par exemple intéressant de confirmer les résultats obtenus avec une autre souche de HEV-3, comme la souche japonaise 83-2 et une souche de HEV-1, qui est le génotype associé à la pathologie la plus sévère chez l'Homme. Enfin, des données récentes semblent indiquer que les souches de HEV retrouvées chez le rat sont transmissibles à l'Homme, nous pourrions alors tester le composé N dans ce contexte. Si le composé N inhibe l'infectiosité de ces différentes souches, nous obtiendrons alors une preuve de concept robuste de l'activité antivirale du composé, positionnant cette molécule comme un candidat thérapeutique prometteur. Ces analyses seront réalisées dans les semaines/mois à venir et seront complétées par des analyses *in vivo*, chez le rat nude athymique (collaboration avec le Pr J. Neyts, KU Leuven ; Zhang et al., 2023) pour les souches de rat et chez la souris au foie humanisé (collaboration avec le Pr P. Meuleman, Univ. Gand ; Sayed et al., 2017) pour les souches

de HEV-1 et HEV-3. Ces analyses sont primordiales et valideraient l'activité antivirale du composé N le cas échéant, dans des modèles précliniques.

Il serait aussi intéressant de confirmer le rôle de la préséniline dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i, par une approche différente de l'inhibition pharmacologique. En ce sens, nous prévoyons d'utiliser l'approche par interférence ARN. Si des résultats semblables à ceux obtenus avec les inhibiteurs pharmacologiques sont observés vis-à-vis des titres infectieux et de l'altération de la morphologie des usines virales notamment, nous pourrons alors confirmer l'implication de la préséniline dans ce processus et obtenir la preuve de concept que le fait de cibler la préséniline constitue une approche à visée antivirale intéressante, dans le cadre de l'infection par le HEV. Par là même, si la caractérisation du composé N n'aboutit pas, nous pourrions envisager d'autres moyens de cibler la préséniline, comme la stratégie antisens, approche qui a déjà été développée pour lutter contre le VIH (Saoudi et Goyenvalle, 2021). Cette approche fait intervenir des siRNA et mRNA, notamment, complémentaires d'un ARNm cible, permettant d'inhiber la production d'une protéine cible. Cette approche présente des limites, comme une biodisponibilité limitée, ayant laissé place au développement de nouvelles stratégies dites « vectorisées » qui permettent d'outrepasser ce problème en utilisant des nanoparticules ou des vecteurs viraux (Saoudi et Goyenvalle, 2021). Mais cette approche nécessiterait de nouvelles études pharmacocinétiques et d'évaluation de son innocuité, notamment chez les patients à risque de développer une forme grave d'hépatite E. A contrario, les analyses pharmacocinétiques et d'innocuité ont déjà été réalisées pour le composé N, ce qui présente un réel avantage dans son repositionnement éventuel. Si l'approche pharmacologique via le composé N montre des limites pour un transfert vers la clinique dans le contexte de l'infection par le HEV, l'approche anti-sens pourrait être envisagée mais nécessiterait plus de temps et de moyens pour entrer en phase clinique de développement.

Nous avons démontré que la préséniline est impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Néanmoins, celle-ci existe sous la forme de deux isoformes, PS-1 et PS-2. Il serait donc intéressant de caractériser le rôle précis de ces isoformes dans la maturation de l'ORF2i. Bien que la PS-1 et la PS-2, présentent une localisation subcellulaire et une distribution subcellulaire distincte, elles sont toutes les deux capables de cliver les mêmes substrats, parfois avec une affinité différente (Meckler

et al., 2016 ; Sannerud et al., 2016). L'utilisation de siRNA ciblant PS-1 et/ou PS-2 nous permettra de valider l'implication de la préséniline dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i mais également de déterminer ou non une implication différentielle de ses isoformes dans ce processus. Les données disponibles vis-à-vis du composé N suggèrent que celui-ci est capable d'inhiber les deux isoformes de la protéase. Nous pouvons alors imaginer que les deux isoformes PS-1 et PS-2 pourraient être impliquées dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Néanmoins, des données expérimentales sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Pour compléter le travail réalisé ici, il serait également important de montrer que la préséniline agit spécifiquement au niveau de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i, probablement en inhibant son clivage en amont de la Leu14. Pour cela, nous prévoyons de réaliser une analyse en spectrométrie de masse de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i, par marquage au TMPP, en comparant des cellules traitées avec le composé N à des cellules contrôles, non traitées. Si la préséniline est bien impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine ORF2i, son inhibition devrait induire la production d'une forme d'ORF2i plus longue, dont l'extrémité Nt se situerait avant la Leu14. Par là même, il serait intéressant d'analyser l'importance du résidu se situant directement en amont de la Leu14, la Phe13, dans le processus de maturation protéolytique de la protéine ORF2i. Pour cela, nous avons réalisé une mutation ponctuelle de ce résidu en leucine (mutant F13L, données non présentées). Nous avons choisi une Leu pour remplacer la Phe afin de ne pas affecter la séquence codant la protéine ORF3, qui est chevauchante avec celle codant la protéine ORF2. La caractérisation de ce mutant est en cours. Si la Phe13 est nécessaire à la maturation protéolytique de la protéine ORF2i, nous devrions alors obtenir des résultats semblables à ceux obtenus avec le composé N, ce qui renforcerait d'une certaine façon les données obtenues sur l'activité de la préséniline vis-à-vis de l'extrémité Nt de la protéine ORF2i.

Le traitement de référence actuel pour lutter contre le HEV est basé sur l'utilisation de la ribavirine. Néanmoins, cette molécule est connue pour induire des mutations de résistance et son effet tératogène limite son utilisation chez la femme enceinte qui est à risque de développer une forme grave. Les nouvelles thérapies nécessiteront de pouvoir être utilisées chez les populations à risque et devront limiter l'apparition de mutations de résistance. En ce sens, les données d'essais cliniques de phase III notamment, montrent que le composé N induit peu d'effets secondaires, dont 95% sont de grade 1 ou 2, indiquant que le composé est bien toléré par les patients (Gounder et al., 2023). De plus, afin de déterminer si le composé N induit des mutations de résistance, nous pourrons cultiver le HEV en culture cellulaire pendant plusieurs semaines en présence de différentes concentrations de composé N puis séquencer le virus devenu résistant pour voir si des mutations sont observables dans son génome et les localiser, comparativement à des conditions contrôles : une où le composé est absent, une où les cellules sont traitées avec la ribavirine et une où les cellules sont traitées avec le sofosbuvir. De manière complémentaire, nous pourrions également tester l'impact du composé N sur des cellules PLC3/HEV-p6 exprimant les mutations connues pour être induites par la ribavirine ou par le sofosbuvir et observées en clinique. Si le composé N s'avérait efficace sur ces variants, cela renforcerait l'intérêt pour cette molécule dans le cadre d'un repositionnement pour lutter contre l'infection par le HEV, y compris chez les patients chroniques présentant une résistance au traitement actuel.

## **Conclusion** générale

Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu caractériser le trafic nucléocytoplasmique et identifier les sites d'import et d'export nucléaire de la protéine ORF2 du HEV. L'import nucléaire de la protéine ORF2 est médié par un motif riche en résidus arginine (nommé ARM) alors que l'export nucléaire est médié par trois motifs d'export nucléaire nommés NES9, NES10 et NES12. Nous avons également pu montrer que ce trafic nucléo-cytoplasmique servait probablement à réguler la réponse immunitaire de l'hôte aux temps précoces de l'infection (Figure 59). Nous avons également montré que l'ARM pouvait réguler la translocation réticulaire de la protéine ORF2, afin de produire de manière différentielle les formes ORF2g/c au niveau luminal, et la forme ORF2i au niveau de la face cytosolique des membranes de la voie de sécrétion. En ce sens, nous avons montré l'implication de la furine, une proprotéine convertase de la voie de sécrétion, dans la maturation protéolytique des formes glycosylées et massivement sécrétées ORF2g/c. La protéine ORF2i, est quant à elle produite au niveau des membranes de la voie de sécrétion avant d'être adressée aux usines virales, dérivant de l'ERC, par le biais d'un mécanisme AP-1-dépendant (Figure 59). De manière intéressante, nous avons identifié la préséniline, qui est la sous-unité catalytique du complexe  $\gamma$ -sécrétase, comme étant impliquée dans la maturation protéolytique de la forme ORF2i, qui est associée aux particules infectieuses. Ce processus a lieu au niveau des plans membranaires de la voie de sécrétion (Figure 59). En utilisant comme base le développement d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant la préséniline réalisé dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et de certains cancers, nous avons identifié un composé intéressant, le composé N, qui suit un développement clinique avancé et présente une activité antivirale vis à vis du HEV. Le composé N représente ainsi un candidat thérapeutique potentiel prometteur.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ma thèse permettent de mieux comprendre les mécanismes d'adressage subcellulaire et de maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2, et ouvrent la voie au développement de nouvelles thérapies pour lutter contre le HEV.



<u>Figure 59 :</u> Schéma présentant les mécanismes d'adressage subcellulaire et de maturation protéolytique de la protéine de capside ORF2 du HEV. AP-1 : complexe adapteur AP-1 ; ERC : Endosomal recycling compartment ou compartiment endosomal de recyclage.

## Annexes

Annexe 1 – "An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecycle and interactions with the host cell"

PLoS Pathogens, 2022, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798

# PLOS PATHOGENS



## OPEN ACCESS

**Citation:** Hervouet K, Ferrié M, Ankavay M, Montpellier C, Camuzet C, Alexandre V, et al. (2022) An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecycle and interactions with the host cell. PLoS Pathog 18(8): e1010798. <u>https://doi.org/10.1371/journal. ppat.1010798</u>

Editor: Alexander Ploss, Princeton University, UNITED STATES

Received: August 27, 2021

Accepted: August 6, 2022

Published: August 25, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798

**Copyright:** © 2022 Hervouetetal. Thisis an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its <u>Supporting</u> information files. RESEARCH ARTICLE

# An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis Evirus lifecycle and interactions with the host cell

Kévin Hervouet<sup>1©</sup>, Martin Ferrié<sup>1©</sup>, Maliki Ankavay<sup>1,2©</sup>, Claire Montpellier<sup>1</sup>, Charline Camuzet<sup>1</sup>, Virginie Alexandre<sup>1</sup>, Aïcha Dembélé<sup>1</sup>, Cécile Lecoeur<sup>1</sup>, Arnold Thomas Foe<sup>1</sup>, Peggy Bouquet<sup>3</sup>, David Hot<sup>3</sup>, Thibaut Vausselin<sup>1</sup>, Jean-Michel Saliou<sup>3</sup>, Sophie Salomé-Desnoulez<sup>3</sup>, Alexandre Vandeputte <sup>3</sup>, Laurent Marsollier<sup>4</sup>, Priscille Brodin<sup>1,3</sup>, Marlène Dreux<sup>5</sup>, Yves Rouillé<sup>1</sup>, Jean Dubuisson<sup>1</sup>, Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>1</sup>, Laurence Cocquerel<sup>1</sup>

1 University of Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR 9017-CIIL- Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France, 2 Division of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Microbiology, Lausanne, Switzerland, 3 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014 - US41 - PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, Lille, France, 4 Université d'Angers, Nantes Université, INSERM, Immunology and New Concepts in ImmunoTherapy, INCIT, UMR 1302, Angers, France, 5 CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm-U1111, CNRS-UMR5308, ENS-Lyon, Lyon, France

• These authors contributed equally to this work.

\* laurence.cocquerel@cnrs.fr

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection is the most common cause of acute viral hepatitis worldwide. Hepatitis E is usually asymptomatic and self-limiting but it can become chronic in immunocompromised patients and is associated with increased fulminant hepatic failure and mortality rates in pregnant women. HEV genome encodes three proteins including the ORF2 protein that is the viral capsid protein. Interestingly, HEV produces 3 isoforms of the ORF2 capsid protein which are partitioned in different subcellular compartments and perform distinct functions in the HEV lifecycle. Notably, the infectious ORF2 (ORF2i) protein is the structural component of virions, whereas the genome-free secreted and glycosylated ORF2 proteins likely act as a humoral immune decoy. Here, by using a series of ORF2 capsid protein mutants expressed in the infectious genotype 3 p6 HEV strain as well as chimeras between ORF2 and the CD4 glycoprotein, we demonstrated how an Arginine-Rich Motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region controls the fate and functions of ORF2 isoforms. We showed that the ARM controls ORF2 nuclear translocation likely to promote regulation of host antiviral responses. This motif also regulates the dual topology and functionality of ORF2 signal peptide, leading to the production of either cytosolic infectious ORF2i or reticular non-infectious glycosylated ORF2 forms. It serves as maturation site of glycosylated ORF2 by furin, and promotes ORF2-host cell membrane interactions. The identification of ORF2 ARM as a unique central regulator of the HEV lifecycle uncovers how viruses settle strategies to condense their genetic information and hijack cellular processes. Funding: This work was supported by grants from the French agency ANRS-Maladies infectieuses émergentes (ECTZ61515, AAP2015-2 CSS4), Pasteur Institute of Lille (#Diag-HepE), Région Hauts-de-France (#Diag-HepE) and Insermtransfert (#actiVHE). The PLBS platform used in this work was supported by the ANR (ANR-10-EQPX-04-01) and Feder (12001407 [D-AL] EquipEx ImagInEx BioMed). K.H., M.A. and T.V. were supported by a fellowship from the ANRS-Maladies infectieuses émergentes (ECTZ61515, AAP2015-2 CSS4). M.F. was supported by a fellowship from the Pasteur Institute of Lille and Région Hauts-de-France. M.A. is currently supported by the Fonds National Suisse (FNS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Author summary

Hepatitis E virus (HEV) is the major cause of acute viral hepatitis worldwide. Although infection with HEV is usually self-resolving, it can cause up to 30% mortality in pregnant women in the third trimester. There is no specific treatment nor universal vaccine to fight against HEV. In our study, we focused on the HEV ORF2 capsid protein which is produced as different forms that perform distinct functions in the HEV lifecycle. The infectious ORF2i form is the structural component of virions, while the other forms likely act as an immune decoy. Herein, we deciphered the molecular determinants of ORF2 multifunctionality. We identified an Arginine-Rich Motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region that controls the subcellular localization, the fate and functions of ORF2 forms. It also promotes ORF2-host cell interactions. Our observations highlight the ORF2 ARM as a unique central regulator of ORF2 addressing that finely controls the HEV lifecycle.

### Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of acute viral hepatitis worldwide and is an emerging problem in industrialized countries. This virus causes about 20 million infections annually [1]. While HEV infection is asymptomatic for most patients, some human populations including pregnant women and immunocompromised patients have higher risk to develop severe forms and chronic infections, respectively. HEV strains infecting humans have been classified into 4 main distinct genotypes (gt) belonging to a single serotype [2]. Gt1 and gt2 that infect humans only, are primarily transmitted through contaminated drinking water and are responsible for waterborne hepatitis outbreaks in developing countries. In contrast, gt3 and gt4 are zoonotic and are largely circulating in industrialized countries. They are mainly transmitted by contact with swine and consumption of inadequately heated pork products [3]. There is no specific treatment nor universal vaccine to fight against HEV.

HEV is a quasi-enveloped [4,5], positive-sense RNA virus expressing three open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2 and ORF3 [6]. ORF1 encodes the ORF1 non-structural polyprotein that is the viral replicase [7]. ORF2 encodes the ORF2 viral capsid protein and ORF3 encodes a small protein that is involved in virion morphogenesis and egress [8,9]. Since studying the HEV lifecycle has long been hampered by the absence of efficient systems to amplify HEV, many steps of the HEV lifecycle remain poorly understood [10]. By combining the gt3 p6 strain [11] and a highly transfectable subclone of PLC/PRF/5 cells (PLC3 cells), we previously described an efficient HEV cell culture system [12]. This model notably enabled the pioneering demonstration that, during its lifecycle, HEV produces at least 3 forms of the ORF2 capsid protein: infectious ORF2 (ORF2i), glycosylated ORF2 (ORF2g), and cleaved ORF2 (ORF2c). 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. Importantly, we showed that a fraction of the ORF2intra form is translocated into the nucleus of infected cells [13]. Nuclear localization of ORF2 was also described by Lenggenhager et al. in naturally infected human hepatocytes [14], but the significance of ORF2 nuclear localization remains to be elucidated. The ORF2g and ORF2c proteins (herein referred to as ORF2g/c) are highly glycosylated and secreted in large amounts in culture supernatant (i.e., about 1000x more than ORF2i [15]) and are the most abundant antigens detected in patient sera [12]. These proteins likely act as a humoral immune decoy that inhibits antibody-mediated neutralization [15]. How the different forms of ORF2 are

generated during the HEV lifecycle has not yet been fully investigated. However, their sequence and post-translational modifications suggest that they might be produced either by a distinct addressing into the secretory pathway and the nucleus [12,13], and/or by a differential translation process [15].

Here we investigated the mechanisms by which the ORF2 forms are produced and differentially addressed to cell compartments. We demonstrated that HEV has set up a nucleo-cytoplasmic transport mechanism of its capsid protein to modulate cell host immune responses. In addition, we found that during the HEV lifecycle, a fine-tuning of ORF2 partitioning occurs between cytosolic, reticular and nuclear compartments. Importantly, we identified a stretch of 5 amino acid residues (herein referred to as ARM, Arginine-Rich Motif) in the N-terminal region of the ORF2 protein that drives nuclear translocation and tightly modulates the stoichiometry between the different ORF2 forms, especially by regulating the functionality of the ORF2 signal peptide and interactions with the host cell.

### Results

# The ORF2 protein transits through the nucleus in the early phase of replication and infection

We and others previously showed that the ORF2 protein is translocated into the nucleus of infected cells of patient liver biopsies [14] and in cell culture system [13]. Here, we first analyzed by immunofluorescence the ORF2 expression in PLC3 cells electroporated with the infectious gt3 p6 strain (PLC3/HEV-p6), and the infectious gt1 Sar55 strain (PLC3/HEV-Sar55) at different time points post-electroporation (p.e.) (Fig 1A and 1B). ORF2 staining and quantification of nuclear/cytosolic fluorescence ratio showed that ORF2 displays a nuclear localization at early time points p.e. (*i.e.*, 18h) that decreases over time. A similar subcellular localization was observed in PLC3 cells electroporated with another gt3 strain (HEV83-2, Fig 1C) and Huh-7.5 cells infected with HEV-p6 particles (Fig 1D). Note that in these cells, the ORF2 expression was delayed but displayed a similar profile. In addition, at 6 days (6d) post-infection (p.i.) Huh-7.5 cells displayed different ORF2 populations likely corresponding to newly infected cells (Fig 1D). Taken together, these results indicate that nuclear translocation of ORF2 takes place at early time points and is then followed by a nuclear export process, indicating that HEV has developed mechanisms for ORF2 nuclear import and export.

# The ORF2 protein displays an Arginine-Rich Motif (ARM) that functions as a Nuclear Localization Signal(NLS)

To decipher the molecular mechanisms of ORF2 nuclear import, we first analyzed its amino acid (aa) sequence with the NLSTradamus prediction program [16]. We identified a potential Nuclear Localization Signal (NLS) corresponding to a conserved Arginine-Rich Motif (ARM, 5 arginine residues: RRRGRR) in the N-terminal region of ORF2, downstream of its signal peptide (SP) (Fig 2A and S1 Fig). We next generated a series of ORF2 mutants in the p6 strain that are depicted in Fig 2A. We characterized their expression and subcellular localization (Fig 2B and 2C, S2 and S3 Figs), and their impact on the HEV lifecycle (Fig 2D) in PLC3/HEV-p6 cells.

The replacement of arginine by alanine residues (3R/3A, 2R/2A and 5R/5A mutants) led to a drastic reduction of ORF2 nuclear localization compared to the wt protein (Fig 2B and 2C Nuclear extract, and S2 Fig), indicating that the ARM is likely a functional NLS. Interestingly, the reduced nuclear localization of these mutants was associated with an accumulation of ORF2 in the Golgi apparatus (S3 Fig) and a reduced association with cellular membranes (Fig

### PLOS PATHOGENS



Fig 1. Kinetics of the subcellular localization of ORF2 protein. PLC3 cells electroporated with HEV-p6 (A), HEV-Sar55 (B) and HEV83-2 (C) RNA and Huh-7.5 cells infected with HEV-p6 (D) were fixed at the indicated timepoints post-electroporation (p.e.) (A-C) or post-infection (p.i.) (D). Indirect immunofluorescence analysis was performed using the 1E6 anti-ORF2 antibody. Cells were analyzed by confocal microscopy (magnification x40). Scale bar, 20  $\mu$ m. Nuclear/cytosolic fluorescence intensity quantification was done using ImageJ software (mean ± S.D.,  $n_2$ 30 cells, Friedman with Nemenyi test). <sup>\*</sup> p < 0.05, <sup>\*---</sup>p < 0.0001. Mock electroporated PLC3 cells (PLC3), cells electroporated with a replication-deficient HEV83-2 strain (PLC3/HEV83-2-GAD) and non-infected Huh-7.5 cells were used as controls.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g001



**Fig 2. ORF2 contains an Arginine-Rich Motif (ARM) that is important for its nuclear localization.** (A) Schematic sequence alignment of HEV-p6 ORF2wt and ARM/SP mutants. (B) Subcellular localization of HEV-p6 ORF2wt and ARM/SP mutants. PLC3 cells were electroporated with wt and mutant HEV-p6 RNAs. At 18 h.p.e, cells were processed for indirect immunofluorescence using the 1E6 anti-ORF2 antibody (Ab) and analyzed by confocal microscopy (magnification x63). Red=ORF2; Blue=DAPI. Scale bar, 20 $\mu$ m. Nuclear/cytosolic fluorescence intensity quantification was done using ImageJ software (mean  $\pm$  S.D., *n* 2: 30 cells, Kruskal-Wallis with Conover's test). *<sup>-</sup>p* < 0.05, *<sup>----</sup>p* < 0.0001. (C) Subcellular fractionation of PLC3/HEV-p6 expressing ORF2wt and ARM/SP mutants at 10 d.p.e. Fractionation was done using a subcellular protein fractionation kit for cultured cells. ORF2 proteins were detected by WB with 1E6 Ab. Glycosylated ORF2 (ORF2g), cleaved ORF2 (ORF2c), intracellular ORF2 (ORF2intra), nuclear ORF2intra (ORF2ni), nuclear and cleaved

ORF2intra (ORF2nc) are indicated. ORF3 protein in cell lysates was detected with a rabbit anti-ORF3 Ab. Tubulin, ER marker Calnexin (CNX) and the transcription factor SP1 used as a nuclear marker, were also detected to check the quality of fractionation. 2E2 and 4B2 are conformation-specific anti-ORF2 antibodies. Molecular mass markers are indicated on the right (kDa). (D) Infectious titer determination and HEV RNA quantification in PLC3/HEV-p6 expressing ORF2wt or mutant proteins. Extra- and intracellular viral particles were extracted at 10 d. p. e and used to infect naïve Huh-7.5 cells for 3 days. Cells were next processed for indirect immunofluorescence. ORF2-positive cells were counted and each positive cell focus was considered as one FFU. Results were expressed in FFU/ml (n = 4). Extra- and intracellular viral RNAs were quantified at 10 d. p. e by RT-qPCR ( $n \ge 5$ ) (mean  $\pm$  S.D., Kruskal-Wallis with Conover's test). "p < 0.05, "p < 0.01, "p < 0.0001. (E) PLC3/HEV-p6-sR/5A, PLC3/HEV-p6-PSG/3R and PLC3 mock cells were processed for proximity ligation assay using antibodies to ORF2 and Importin-c1 at 18 h.p.e. Stacks of images corresponding to the total volume of the cells were acquired, and maximum intensity projections of the stacks were generated. For each condition, 12 fields of cells were analyzed (total cell number  $\frac{1}{2}$ 65). Scaled regions of interest of a representative field (left) and quantification of spot/cell (right) are shown (mean  $\pm$  S.D., Kruskal-Wallis with Conover's test). "p < 0.0001.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g002

 $\underline{2C}$ , Membrane extract), indicating that these mutated proteins are likely soluble in the Golgi lumen. Mutations did not affect the stability or folding of ORF2, as demonstrated by blotting total extracts and immunoprecipitations with conformation-specific anti-ORF2 antibodies (Fig2C, total extract, IP 2E2 and IP 4B2). Some ORF2 forms with an apparent higher molecular weight were observed in the soluble fraction of 3R/3A and 5R/5A mutants, and an increase of ORF2g/c secretion were observed for the three mutants (Fig 2C), suggesting that ARM mutations induced a higher translocation into the secretory pathway likely associated to an improved functionality of ORF2 SP. Quantification of intracellular RNAs showed that replication was not altered in these mutants (Fig 2D) and S4 Fig). In addition, ARM mutations did not affect ORF3 expression (Fig 2C). However, these mutants no longer produced infectious viral progeny (Fig 2D). Thus, our results suggest that the ARM drives the ORF2 nuclear translocation and plays important functions in the HEV lifecycle, notably in the assembly of infectious particles.

We also generated mutants for which Pro25, Ser26 and Gly27 residues were replaced by 3 arginine residues (PSG/3R mutant), and alternatively SP was fully or partially deleted ( $\Delta$ SP and  $\Delta$ SP1 mutants, respectively) (Fig 2A). The PSG/3R mutant showed an increased nuclear localization (Fig 2B and 2C Nuclear extract and S2 Fig) but was impaired in ORF2g/c secretion (Fig 2C, Supernatant), as observed for the SP deletion mutants, indicating that the addition of arginine residues strengthens the NLS function of ARM but inhibits the functionality of ORF2 SP. The PSG/3R mutant expressed the ORF3 protein but displayed lower intracellular replication levels and was no longer infectious (Fig 2D). The increased nuclear localization of this mutant is therefore likely responsible for the reduction of HEV RNA replication and assembly of infectious particles.

The full ( $\Delta$ SP) or partial ( $\Delta$ SP1) deletion of the ORF2 SP led to a total inhibition of ORF2 secretion (Fig 2C, Supernatant), as expected due to the absence of reticular translocation. Although  $\Delta$ SP1 ORF2 expression or stability was reduced (Fig 2C), both SP deletion mutants still exhibited a nuclear localization (Fig 2B and S2 Fig), indicating that the nuclear translocation process is independent of the reticular translocation. Because ORF2 and ORF3 are overlapping in the HEV genome, and ORF3 is essential to particle secretion, the SP deletion mutants did not express the ORF3 protein (Fig 2C) and displayed reduced extracellular titers (Fig 2D). Intracellular titers were also lowered in SP mutants (Fig 2D), indicating that the ORF2 SP likely plays an important role in replication or assembly of infectious particles.

Lastly, the highly conserved Gly31 residue (S1 Fig) was also mutated (Fig2A, G/A mutant). This mutant displayed a subcellular distribution similar to that of wt, and expressed the ORF3 protein. Although to a lesser extent than wt, G/A mutant produced intracellular particles, but showed reduced extracellular RNA and infectious levels. This indicates that the G/A mutation affects particle secretion.

We next carried out a comparative study of NLS sequences in viral proteins and their importin. We found that the ORF2 ARM is similar to the Epstein-Barr nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) arginine-rich NLS (RRVRRR) that interacts with Importin- $\alpha$ 1 [17]. Interestingly, ORF2 and Importin- $\alpha$ 1 co-localized in the nucleus of infected cells with a Pearson correlation coefficient (PCC) of 0.670, and the mutation of arginine residues drastically reduced this colocalization (S5 Fig). In addition, we performed a proximity ligation assay (PLA) using ORF2 and Importin- $\alpha$ 1 antibodies in PLC3/HEV-p6-wt, PLC3/HEV-p6-5R/5A, PLC3/HEV-p6-PSG/3R and PLC3 mock cells (Fig 2E). In cells expressing ORF2 wt or the PSG/3R mutant, many dots were observed whereas in mock cells or cells expressing the 5R/5A mutant, very few fluorescent dots were observed. Taken together, our results indicate that ORF2 likely interacts with Importin- $\alpha$ 1 thanks to its ARM that serves as a functional NLS. In addition, these results suggest that the ARM is involved in the fine-tuning of the addressing and stoichiometry of the ORF2 protein between the nuclear, cytosolic and reticular pathways. This stoichiometry is likely essential to the HEV lifecycle.

### **ORF2** nuclear translocation modulates host gene expression

Our results demonstrated that ORF2 localizes in the nucleus (ORF2ni) and the ARM is pivotal for nuclear translocation. Our results also suggested that ORF2ni is readily detected as early as 18 h.p.e. in PLC3/HEV-p6 and PLC3/HEV-Sar55 cells while its nuclear targeting is transient and starts to decrease after 48h (Fig 1A and 1B). This observation prompted us to address the impact of early nuclear translocation of ORF2 on the regulation of host genes. We performed a transcriptomic analysis by microarrays (Agilent SurePrint Technology) in PLC3/HEVp6-wt, PLC3/HEV-p6-5R/5A, PLC3/HEV-p6- $\Delta$ ORF3 and PLC3 mock cells at 18 h.p.e. (S6 Fig). PLC3/HEV-p6-ΔORF3 express an ORF3-null mutant of HEV-p6 (S6C and S7A Figs). Interestingly, in PLC3/HEV-p6-wt and PLC3/HEV-p6- $\Delta$ ORF3 cells, we observed a significant inhibition of expression of 7 genes related to the TNF $\alpha$ , IL-17 and NF- $\kappa$ B-mediated signaling as well as inflammatory responses (*i.e.*, NOD-like receptor-induced response) (S6 Fig). In contrast, no gene expression inhibition was observed in PLC3/HEV-p6-5R/5A cells, reflecting the importance of ORF2 nuclear translocation in the observed inhibition. In addition, while some reports suggested that ORF3 expression modulates the host responses [18-23], no marked difference was observed when comparing  $\Delta ORF3$  mutant to wt. Of note, kinetics of ORF2 nuclear localization in cells expressing the  $\Delta$ ORF3 mutant was similar to wt (S7B Fig), indicating that the nucleo-cytoplasmic transport of ORF2 is an ORF3-independent process.

Altogether our results suggest that the ORF2 ARM, which notably regulates ORF2 nuclear translocation, is a pivotal viral determinant for the modulation of host pathways and, especially, genes of the NF-KB-induced signaling upon infection. Further studies will be required to define precisely the impact of this HEV-driven host regulation on immune cell responses.

### Nuclear export of the ORF2 protein

The observation that ORF2 nuclear targeting is transient and decreases with time (Fig 1) then prompted us to investigate the mechanisms of ORF2 nuclear export. We treated PLC3/HEV-p6 (Fig 3A), PLC3/HEV83-2 and HEV-p6 infected Huh-7.5 (S8A Fig) cells with nuclear export inhibitors, Leptomycin B (LepB) and Verdinexor (Verd). These compounds are irreversible (LepB) and reversible (Verd) inhibitors of the ubiquitous transport receptor chromosome maintenance protein 1 (CRM1/Exportin 1), which recognizes hydrophobic leucine-rich export signals [24]. Treated cells displayed a highly significant nuclear accumulation of ORF2, as compared to control cells (Figs <u>3A</u> and <u>S8A</u>). Co-localization studies revealed that ORF2 partially or transiently colocalizes with CRM1 in untreated cells whereas they significantly



**Fig 3.** Nuclear export of the ORF2 protein. (A) Analysis of ORF2 nuclear export in inhibitors treated-PLC3/HEV-p6 cells. Cells were treated at 32 h.p. with 20nM of Leptomycin B (LepB), 100nM of Verdinexor (Verd) or diluent (EtOH or DMSO, respectively) for 16h. Cells were processed for indirect immunofluorescence with the 1E6 anti-ORF2 Ab and analyzed by confocal microscopy (magnification x63). Red = ORF2; Blue = DAPI. (B) Schematic representation of HEV-p6 ORF2 protein sequence highlighting the three studied NES motifs (i.e., NES9, NES10 and NES12). (C) Subcellular localization of ORF2 NES mutants at 48 h.p.e. Red = ORF2; Blue = DAPI. In A and C, the scale bars correspond to 20 $\mu$ m, and nuclear/cytosolic fluorescence intensity quantification was done using ImageJ software (mean ± S.D.,  $n_2$ 30 cells, Kruskal-Wallis with Conover's test). p < 0.05, -p < 0.001, --p < 0.0001. (D) Subcellular fractionation of PLC3/HEV-p6 expressing ORF2wt and NES mutants at 4 d.p.e. Fractionation was done using a subcellular protein fractionation kit for cultured cells. ORF2

proteins were detected by WB with 1E6 Ab. Glycosylated ORF2 (ORF2g), cleaved ORF2 (ORF2c), intracellular ORF2 (ORF2intra), nuclear ORF2intra (ORF2ni), nuclear and cleaved ORF2intra (ORF2nc) are indicated. ORF2 and ORF3 proteins in total cell lysates were detected with 1E6 Ab and a rabbit anti-ORF3 Ab, respectively. Tubulin, ER marker Calnexin (CNX) and the transcription factor SP1 used as a nuclear marker, were also detected to check the quality of fractionation. 2E2 and 4B2 are conformation-specific anti-ORF2 antibodies. Molecular mass markers are indicated on the right (kDa). (E) Infectious titer determination in PLC3/HEV-p6 expressing ORF2wt or NES mutants. Extra- and intracellular viral particles were extracted at 10 d.p.e and used to infect naïve Huh7.5 cells for 3 days. Cells were next processed for indirect immunofluorescence. ORF2-positive cells were counted and each positive cell focus was considered as one FFU. Results were expressed in FFU/ml. (F) HEV RNA quantification in PLC3/HEV-p6 expressing ORF2wt or NES mutants. Extra- and intracellular viral RNAs were quantified at 10 d.p.e by RT-qPCR. In E and F, n = 6, mean  $\pm$  S.D., Kruskal-Wallis with Conover's test. -p < 0.0001.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g003

colocalize upon treatment with nuclear export inhibitors (<u>S8B Fig</u>). In addition, PLA experiments with anti-ORF2 and anti-CRM1 showed that ORF2 likely interacts with CRM1 (<u>S8C Fig</u>). These results indicate that ORF2 undergoes a nuclear export to the cytoplasm by a CRM1-dependent mechanism.

CRM1 recognizes hydrophobic leucine-rich export signals. By analyzing the ORF2 sequence, we identified at least 12 potential nuclear export signals (NES) into the ORF2 sequence. We replaced the hydrophobic residues in these motifs by alanine residues and characterized the generated mutants as described above. Most mutations did not affect ORF2 partitioning, whereas mutations of three conserved motifs ( $\underline{S9}-\underline{S11}$  Figs), named NES9, NES10 and NES12 (Fig 3B) led to a highly significant accumulation of ORF2 inside the nucleus (Fig 3C and 3D) and colocalization with CRM1 (S8B Fig), as observed for cells treated with nuclear export inhibitors (Fig 3A and S8B Fig). Although intracellular replication was not altered by NES mutations (Fig 3F), NES9 and NES10 mutants were no longer infectious, and the NES12 mutant exhibited highly reduced intracellular and extracellular titers (Fig 3E). By immunoprecipitation with conformation-specific anti-ORF2 antibodies, we found that NES9 and NES10 mutants were misfolded whereas NES12 mutant was properly folded (Fig 3D, IP 2E2 and IP 4B2). These results indicate that NES9 and NES10 motifs are functional NES but their mutation affect ORF2 protein folding and thus particle assembly. In contrast, the reduced infectious particle assembly of NES12 mutant is likely due solely to its differential subcellular localization (S7C Fig), and not to a defect in viral replication or ORF2 folding. Of note, the NES12 mutant showed a reduced interaction with CRM1 (S8C Fig).

Thus, HEV has set up a nuclear export system for its ORF2 capsid protein. This mechanism involves CRM1 which likely recognizes three conserved NES on the ORF2 sequence. Moreover, these results suggest again that a fine balance between the nuclear, cytosolic and reticular pathways is likely essential to the HEV lifecycle.

### Translocation and maturation of the glycosylated ORF2 forms

Next, we investigated the mechanisms of translocation and maturation of the highly secreted and glycosylated ORF2g/c isoforms. First, we treated PLC3/HEV-p6 and Mock cells with Mycolactone, an inhibitor of Sec61 translocon, the membrane embedded protein complex responsible for the translocation of newly synthetized polypeptides into the ER lumen [25]. Interestingly, we observed a dose-dependent reduction of ORF2g/c secretion in Mycolactone-treated PLC3/HEV-p6 cell supernatants (Fig 4A), indicating that reticular translocation of the ORF2g/c forms is Sec61-dependent.

Previously, we demonstrated that the first residues of ORF2i, ORF2g and ORF2c proteins are Leu14, Ser34 and Ser102, respectively [12,13] (Fig 3B). Therefore, the first 20 aa of the ORF2i protein are not present in the ORF2g/c isoforms. Furthermore, the ORF2i protein is



**Fig 4. Translocation and maturation of the glycosylated ORF2 forms.** (A) Dose-response inhibition of ORF2g/c secretion in mycolactone-treated cells. At 7 d.p.e., PLC3/HEV-p6 and mock cells were treated for 24h with the indicated concentrations of mycolactone (in nM) or maximal volume of the vehicle, ethanol (indicated as 0 nM). Supernatants (SN) and lysates (Cells) were collected and ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 Ab. Tubulin served as control protein loading. (B) Schematic representation of ORF2i/g/c proteins and recognition sites of P1H1 and P3H2 antibodies used to discriminate the different ORF2 forms. SP, signal peptide. PC, proprotein convertase. Glycans are in black. (C) Immunoprecipitation of ORF2 proteins in SN and lysates of PLC3/HEV-p6 cells by P1H1, P3H2 and isotype control (CTL) antibodies immobilized on magnetic beads. ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 Ab. (D-F) At 7 d.p.e., PLC3/HEV-p6 cells were treated with the indicated concentrations of

Decanoyl-RVKR-chloromethylketone (CMK), hexa-D-arginine amide (D6R) and SSM3 trifluoroacetate (SSM3) (in  $\mu$ M) or DMSO diluent (indicated as 0  $\mu$ M). (G) At 7 d.p.e., PLC3/HEV-p6 and PLC3 mock cells were transfected with siRNA targeting furin (siFur) or non-targeting siRNA (siCTL) or left non-transfected (NT). (D-G) At 72h post-treatment or post-transfection, supernatants (SN) and lysates (Cells) were collected. SN were immunoprecipitated with P1H1 and P3H2 antibodies and ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 Ab. ORF2intra,  $\alpha$ V-Integrin (Int $\alpha$ V) and Tubulin (Tub) were detected in cell lysates. In G, furin (Fur) was also detected in cell lysates.  $\alpha$ V-pro-integrin (Proint $\alpha$ V) corresponds to the non-maturated  $\alpha$ V-integrin. ORF2g<sup>-</sup> corresponds to the ORF2g immunoprecipitated by the P1H1 Ab. Molecular mass markers are indicated on the right (kDa).

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g004

not glycosylated whereas ORF2g/c proteins are highly glycosylated [13] (Fig4B). Thanks to these features, we generated a murine monoclonal antibody (P1H1) that recognizes the N-terminus of ORF2i (Fig4B). P1H1 specifically immunoprecipitates the ORF2i protein without cross-reacting with the highly secreted and glycosylated ORF2g/c proteins (Fig4C, SN). We also generated the P3H2 antibody that recognizes the different isoforms of ORF2. Both antibodies recognize the intracellular ORF2 form (Fig4C, Cells).

These antibodies were used to evaluate the effects of three furin inhibitors and related proprotein convertases (PC) on ORF2g/c maturation. PC cleave the multibasic motifs R/K-X<sub>n</sub>-R/ K (where  $X_n$  corresponds to a 0-, 2-, 4-, 6-amino-acid spacer) in the precursor proteins [26]. The presence of ARM and RRR motif upstream of the ORF2g/c N-termini (Fig 3B), respectively, suggests that a PC might be involved in the maturation of these ORF2 forms. Therefore, we treated PLC3/HEV-p6 cells with three potent furin/PC inhibitors (decanoyl-RVKR-chloromethylketone [CMK], hexa-D-arginine amide [D6R], and SSM3 trifluoroacetate [SSM3]) [27] and immunoprecipitated ORF2 proteins in cell supernatants with P1H1 and P3H2 antibodies. Intracellular contents were probed by WB for ORF2intra, cleavage of cellular aV-pro-integrin (a substrate of intracellular furin) and tubulin (Fig 4D-4F). In these experiments, immunoprecipitation of ORF2g by P1H1 antibody was used as a read-out of the inhibition of ORF2g maturation (Fig 4B, ORF2g<sup>--</sup>). In treated cells, we observed a dose-dependent immunoprecipitation of ORF2g<sup>--</sup> by P1H1 (Fig4D-4F), indicating that furin/PC inhibitors abrogated ORF2g maturation. Of note, the cell-permeable CMK and SSM3 inhibitors showed a strong inhibition of ORF2g and  $\alpha$ V-pro-integrin maturation, whereas the cell membrane impermeable D6R inhibitor showed a moderate effect on ORF2g maturation. Together, these results indicate that a furin/PC present in the secretory pathway is likely involved in the ORF2g/c maturation process.

Finally, PLC3/HEV-p6 and PLC3 mock cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting furin (siFur), or non-targeting siRNA (siCTL) or non-transfected (NT) (Fig 4G). The efficacy of furin silencing was controlled by WB and its effect on ORF2g/c maturation was analyzed as above. As in cells treated with PC inhibitors, we observed an immunoprecipitation of ORF2g<sup>--</sup> by P1H1 upon furin silencing (Fig 4G), indicating that furin is responsible for ORF2g/c maturation.

### The ORF2 ARM is the regulator of ORF2 addressing

To further analyze the molecular mechanisms by which ORF2 is differentially addressed to the cytosolic, nuclear or reticular pathways, we next generated chimeric and mutant constructs between ORF2 and the CD4 glycoprotein, as a reporter protein. Therefore, we used a heterologous expression system for the further experiments. The constructs were expressed in Huh-7 cells stably expressing the T7 RNA-polymerase (H7-T7-IZ cells) [28]. We selected the 5R/5A and PSG/3R mutations for their marked phenotype (Fig 2) and generated an ARM-deleted mutant ( $\Delta$ ARM, deletion of Gln24 to Arg33, Fig 5). The full-length ORF2wt, ORF2<sup>5R/5A</sup> and

### PLOS PATHOGENS





https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g005

 $ORF2^{PSG/3R}$  proteins displayed a similar pattern and phenotype as observed in the infectious system (Fig 2), by immunofluorescence and WB (Fig 5). The effect of the 5R/5A mutation or the ARM deletion on the ORF2 secretion, membrane association and nuclear localization confirmed that the ARM located downstream of the SP negatively regulates ORF2 reticular translocation but is important for nuclear translocation and membrane association. Conversely, the PSG/3R mutation showed an increased nuclear localization and membrane association, whereas ORF2 secretion was fully blocked, confirming that positively charged residues negatively regulate the functionality of ORF2 SP but mediate nuclear translocation and membrane association.

Next, to define the impact of ARM on another SP, we exchanged the ORF2 SP by the one of CD4 that is a functional model SP [29] (Fig 5, Chimeras C1). Interestingly, the chimera C1 displayed a subcellular distribution similar to that of ORF2wt but was no longer secreted (Fig 5C, SN), indicating that the ARM inhibits the functionality of CD4 SP. Indeed, the mutation  $(C1^{5R/5A})$  or deletion of ARM  $(C1^{\Delta ARM})$  restored secretion of the chimera C1. The observation that ORF2wt is secreted in the presence of the ARM whereas it is not with the CD4 SP, suggests the existence of an interplay between ORF2 SP and ARM. The chimera  $C1^{PSG/3R}$  showed an increased nuclear localization and membrane association, whereas its secretion was abolished (Fig 5), confirming that positively charged residues downregulate the functionality of CD4 SP and mediate nuclear translocation and membrane association. It should be noted that the chimera  $C1^{PSG/3R}$  showed a marked reticular staining (Fig 5A). As described below, we hypothesized that the CD4 SP might disturb the maturation of ORF2i and anchors the protein into the membrane on the cytosolic side.

We also generated an additional group of ORF2 constructs in which the SP of ORF2 was partially deleted (C2) ( $\underline{S12 \, Fig}$ ). The characterization of these constructs confirmed that ARM mediates ORF2 nuclear translocation and membrane association independently of the reticular translocation.

In order to specifically study the impact of ARM on the functionality of the ORF2 SP independently of the ORF2 ectodomain, CD4 chimeras containing the SP (CD4<sup>SPORF2</sup>), the N-terminus (Chimeras C4) or the ARM of ORF2 (Chimeras C5) were also generated and characterized as previously (Fig 6). Thanks to the CD4<sup>SPORF2</sup> construct, we confirmed that the SP of ORF2 is a functional SP, as illustrated by its subcellular pattern (Fig 6A) and its efficient secretion (Fig 6D). Interestingly, the chimera C4 showed an intracellular distribution different from that of CD4wt, with a significant nuclear localization (Fig 6A and 6B). In addition, WB analysis revealed a major decrease in C4 secretion as well as the appearance of a 40kDa band in the soluble fraction (Fig 6D). This band corresponds to the non-N-glycosylated CD4 ectodomain, which contains 2 N-glycosylation sites, indicating that the CD4 ectodomain is poorly translocated into the ER lumen when fused to ORF2 N-terminus. The same observations were made for the chimera C4<sup>PSG/3R</sup>. In contrast, the 5R/5A mutations restored the secretion but abolished the nuclear translocation of C4 (C45R/5A, Fig 6A, 6B and 6D). Characterization of the chimeras C5, which contain only the ORF2 ARM, showed results similar to the chimeras C4 (Fig 6B-6D). However, unlike C4, the chimera C5 was no longer secreted (Fig 6D), supporting the hypothesis of an interplay between ORF2 SP and ARM. Moreover, the chimera C5 displayed a reticular staining in addition to nuclear staining (Fig 6C). This observation is in line with our hypothesis that the CD4 SP does not undergo the same maturation as ORF2 SP, and anchors the protein into the membrane with a cytosolic orientation.

Taken together, these results demonstrate that the ORF2 ARM on its own is capable of regulating the functionality of ORF2 or CD4 SP, as well as the nuclear translocation of the protein that carries it.


done using the subcellular protein fractionation kit for cultured cells. CD4 proteins were detected by WB with a rabbit polyclonal anti-CD4 Ab. Tubulin, Calnexin (CNX) and Lamin B1 were also detected to control the quality of fractionation. Molecular mass markers are indicated on the right (kDa).

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g006

#### The ORF2 ARM regulates the topology of ORF2 SP

Positively charged residues, such as arginine residues, are known to function as determinants of membrane protein topology, which is reflected in a statistical rule of membrane topology, i.e. the positive-inside rule of membrane proteins [30]. Notably, positive charges determine the orientation of the signal sequences and contribute to membrane spanning of the SP H-segment translocating through the translocon [30]. Since our results suggest that the ARM regulates the SP functionality and membrane association of ORF2, we next analyzed the topology of our different ORF2 and CD4 constructs by immunofluorescence (Figs 7 and 8). We used a low concentration of digitonin that selectively permeabilizes the plasma membrane. Triton X-100-permeabilized cells were analyzed in parallel as a control. The differential detection of two epitopes on the ER-membrane associated Calnexin (CNX) was used as a control of permeabilization. We observed that the ORF2wt, the chimera C1 and the PSG/3R mutants displayed a staining in both Triton X-100 and Digitonin-permeabilized cells whereas the  $\Delta$ ARM and 5R/ 5A constructs showed a labelling only in Triton X-100 permeabilized cells (Fig 7). These accessibility differences in association with the secretion efficiencies (Figs 5C and 6D), which reflect the reticular translocation, allowed us to infer the membrane orientation of each construct as well as the SP topology (Figs 7 and 8). Thus, in the presence of the ARM, the ORF2 SP likely adopts a double topology (ORF2wt) whereas the CD4 SP is not functional (C1) and sticks the protein to the cytosolic side of membranes. The ORF2 SP and CD4 SP are fully functional when the ARM is deleted ( $\Delta$ ARM) or mutated (5R/5A) whereas they are nonfunctional when the ARM is coupled to the PSG/3R mutations. The same observations were done for the C4 and C5 chimeras (Fig8).

Thus, our findings demonstrate that the ORF2 SP and the ARM act together to direct the fate of ORF2 capsid protein. Thanks to the ARM, the ORF2 SP is likely able to adopt a dual topology leading to either reticular translocation or membrane integration to the cytosolic side.

#### Discussion

In the present study, we analyzed a series of mutants of the HEV ORF2 capsid protein to gain insight into how a same primary sequence can generate several ORF2 isoforms with distinctive sequences, post-translational modifications, subcellular localizations and functions in the HEV lifecycle. Several important conclusions can be drawn from our analyses. The first is that the ORF2 protein early transits through the nucleus during infection to control specific cellular functions i.e. antiviral responses of the infected cell. We identified the determinants of the ORF2 nuclear import and export. Notably, an ARM in the N-terminal region of ORF2 mediates nuclear import. Importantly, we showed that the mutation of this motif abolishes ORF2 nuclear translocation but also affects ORF2 addressing into membrane, cytosolic and reticular compartments, which was deleterious for the HEV lifecycle. This brings us to the second important finding, the ARM is pivotal in the fine-tuning of the partitioning and stoichiometry of the ORF2 protein between the nuclear, cytosolic and reticular pathways that are essential to the HEV lifecycle. The last significant finding in this study is the manner by which the SP and ARM cooperate to control the fate of ORF2 protein. Indeed, in addition to mediate the targeting of ORF2 to the ER membrane, the SP is likely able to adopt a reverse signal-anchor



**Fig 7. The ORF2 ARM regulates the topology of ORF2 SP.** A schematic representation of differential permeabilization process with Triton X-100 and Digitonin is shown. Representative images of the differential detection of two epitopes on the ER-membrane associated Calnexin (CNX) used to assess the permeabilization conditions are shown. H7-T7-IZ cells were transfected with pTM plasmids expressing wt, mutant or chimeric ORF2 proteins. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed, permeabilized with either Triton X-100 or Digitonin, and processed for ORF2 staining (in red). Nuclei are in blue. Representative confocal merge ORF2/DAPI images are shown (magnification x63). Blue dots observed in some pictures are DAPI-stained transfected plasmids. A schematic representation of each construct is shown on the left and its predicted topology on the right. Blue and red asterisks correspond to 5R/5A and PSG/3R mutations, respectively. Scale bar, 20µm.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g007

topology. This topology inversion would be driven by flanking charged residues of ARM according to the positive-inside rule [31,32] and leads to the anchoring of the ORF2i protein to the cytosolic side of membranes.

Previously, we [12] and others [15] demonstrated that HEV produces several isoforms of the ORF2 capsid protein. The ORF2i protein is the structural component of infectious particles. It is likely derived from the assembly of the ORF2 intra form present in the cytosolic compartment. The ORF2i and ORF2intra proteins are not glycosylated and display the same sequence starting at Leu14 corresponding to the middle of the SP, indicating that an intramembrane protease might be involved in their maturation. Further investigation is required to identify this intramembrane protease. In contrast, ORF2g/c proteins are highly glycosylated and secreted, but are not associated with infectious material. We identified the first residues of ORF2g/c as Ser34 and Ser102, respectively [12,13]. The nature of the sequences upstream of the ORF2g/c N-termini, experiments using PC inhibitors and siRNA transfection indicate that Furin is involved in their maturation [33]. Interestingly, the ARM is right upstream of the N-



**Fig 8. The ORF2 ARM is also able to control the topology of CD4 SP.** A schematic representation of differential permeabilization process with Triton X-100 and Digitonin is shown. Representative images of the differential detection of two epitopes on the ER-membrane associated Calnexin (CNX) in the used permeabilization conditions are shown. H7-T7-IZ cells were transfected with pTM plasmids expressing CD4wt or chimeric C4 and C5 proteins. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed, permeabilized with either Triton X-100 or Digitonin, and processed for CD4 staining (in green). Nuclei are in blue. Representative confocal CD4/DAPI merge images are shown. Blue dots observed in some pictures are DAPI-stained transfected plasmids. A schematic representation of each construct is shown on the left and its predicted topology on the right. Blue and red asterisks correspond to 5R/5A and PSG/3R mutations, respectively. Scale bar, 20µm.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g008

terminus of ORF2g, indicating that this motif also serves as a recognition site for ORF2g maturation.

We demonstrated that early during replication and infection, the ORF2 protein from different strains transits through the nucleus likely to control antiviral responses of the infected cell. Although we identified the determinants of nuclear import and export in the ORF2 sequence, further studies are now required to identify the cellular partners of nuclear ORF2 and define precisely the impact of ORF2 host regulation on immune cell responses. A previous study demonstrated the significance of ORF2 N-terminal arginine residues in the inhibition of TBK1-mediated IRF3 phosphorylation [34]. Although they did not take into account the effect of arginine residues on ORF2 partitioning, their results are in line with our observations on ORF2 interference with the host innate immunity. Based on our findings, we propose a model of ORF2 production. Firstly, when engaged with the translocon, the ORF2 SP initially inserts head-on in an  $N_{exo}/C_{cyt}$  orientation (Fig 9A). Two mechanisms can then take place. In one side, ORF2 SP inverts orientation to  $N_{cyt}/C_{exo}$  to integrate the ER membrane as cleavable signal. The C-terminal end of signal is exposed to the



**Fig 9. Model of ORF2 addressing regulation by ARM.** (A) The signal recognition particle (SRP) recognizes the hydrophobic signal peptide (SP) of the ORF2 nascent chain as it emerges from a translating ribosome. The ribosome-nascent chain-SRP complex is targeted to the membrane and interacts with the SRP receptor, resulting in the release of the SP and docking of the ribosome-nascent chain complex to the Sec61 translocon. The ORF2 SP initially inserts head-on in an  $N_{exo}/C_{cyt}$  orientation, then inverts its orientation to  $N_{cyt}/C_{exo}$ . (B) The C-terminal end of SP is exposed to ER lumen and is cleaved by signal peptidase, generating a new N-terminus. Translation then resumes, and the nascent ORF2 protein is translocated into the ER lumen where it is glycosylated and likely undergoes maturation by the proprotein convertase furin. This pathway generates the ORF2g/c forms. (C) For a fraction of ORF2 nascent polypeptide chains, the ARM leads the ORF2 SP to retain its  $N_{exo}/C_{cyt}$  orientation and integrates as reverse signal-anchor, according to the positive-inside rule. The ORF2 protein anchored to the cytosolic side of membrane is likely processed by an intramembrane protease to generate the ORF2i/ORF2 intra protein that is translocated into the nucleus and assembles into viral particles.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.g009

ER lumen and cleaved by signal peptidase, liberating the ORF2 ectodomain in the ER lumen where it undergoes glycosylation and protease maturation. This pathway leads to the production of ORF2g/c proteins that are abundantly secreted and likely serve as immunological baits (Fig 9B). On the other side, ORF2 SP does not invert, keeps a  $N_{exo}/C_{eyt}$  orientation and serves as a reverse signal anchor. Next, the ORF2 protein anchored to the cytosolic side of membranes is likely processed by an intramembrane protease (Fig 9C). This pathway leads to the production of the ORF2 intra protein that is early translocated into the nucleus to play immunomodulatory functions and/or is then assembled into viral particles in the cytosolic compartment. Of note, the dual topology was exclusively observed for the ORF2 and CD4 constructs containing both ORF2 SP and ARM (ORF2wt and chimera C4), reflecting the specific interplay between ORF2 SP and ARM and no involvement of other sequence determinant in this process.

Due to the size constraint of their extracellular phase, viruses are under strong pressure to minimize the size of their genome. Overlapping genes represent an adaptive strategy developed by many viruses to condense a maximum amount of information into short nucleotide sequences. This gene overlap strategy is used by HEV for the ORF2 and ORF3 expression [35] and ORF4 in gt1 [36]. Here, our study enabled the pioneering demonstration that HEV also developed a master strategy to condense multiple information into only five amino acid residues of its capsid protein. This strategy is likely also exploited by other pathogens. Thus, the ORF2 ARM is a central regulator of the HEV lifecycle that controls (i) the ORF2 nuclear localization and hereby controls cellular functions promoting regulation of host antiviral responses, (ii) the functionality of ORF2 SP leading to the production of either viral particles or humoral immune decoys, (iii) maturation of glycosylated ORF2 protein by furin, and (iv) membrane association that is likely essential to particle assembly. Hence, ARM controls the fate and function of ORF2 capsid protein isoforms and is likely a key player in the hijacking of cellular processes.

# Materials and methods

#### **Cell cultures**

PLC3 [12] and Huh-7.5 [37] cells were cultured as previously described [13]. The Huh-7-derived H7-T7-IZ cells stably expressing the T7 RNA polymerase ([28]; kindly provided by Ralf Bartenschlager, University of Heidelberg, Germany) were maintained in a medium supplemented with 50  $\mu$ g/ml of Zeocin. They were used for the transfection of the T7 promoterdriven pTM expression vectors.

#### **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 template [11]. Mutants of the ORF2 ARM or NES sites were generated by site directed mutagenesis. Individual mutations were introduced by sequential PCR steps, as described previously [13], using the Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, NEB), then digestions with restriction enzymes and ligation were performed. All the mutations were verified by DNA sequencing. The primers used for the generation of ORF2 mutants are listed in S1 Table. The ORF3-null mutant of HEV-p6 (HEV-p6- $\Delta$ ORF3) was generated as described in [38].

The plasmid pSK-HEV-2 carrying the DNA of the full-length genome of gt1 Sar55 strain (GenBank accession number AF444002) was kindly provided by X-J. Meng. The plasmid

encoding the full-length gt3 HEV83-2 clone (GenBank accession number AB740232) was kindly provided by K. Ishii as well as T. Wakita.

Capped genomic HEV RNAs were prepared with the mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) and delivered to PLC3 cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell apparatus (Bio-Rad) [12].

The plasmids pTM-ORF2 (kindly provided by J. Gouttenoire, University of Lausanne, Switzerland) [14] and pTM/CD4 have been previously described [14,39]. The pTM/CD4 contains the DNA sequence coding for the secreted ectodomain of CD4 (aa 1–371). The primers used for the generation of ORF2/CD4 chimeras/mutants are listed in S1 Table. For some constructs, PCR amplifications were performed by multiple heat pulses [40]. The pTM plasmids were transfected into H7-T7-IZ cells using ViaFect Transfection Reagent (Promega) following the manufacturer's recommendations.

### Antibodies

Primary antibodies used in this study are listed in <u>Table 1</u>. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch.

#### Indirect immunofluorescence

Immunostainings were performed as previously described [13]. For selective permeabilization experiments, cells were fixed with 2% of PFA, washed twice with PBS and permeabilized for 30 min at 4°C with either 0.01% of Digitonin (Sigma) in buffer containing 20 mM HEPES pH6.9, 0.3 M sucrose, 0.1 M KCl, 2.5 mM MgCl2 and 1 mM EDTA or 0.5% Triton X-100 in PBS. Cells were next stained with buffers containing Digitonin.

The nuclei were stained with DAPI and cell outlines with CellMask Green (Invitrogen). Cells were analyzed with a LSM 880 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using Plan Apochromat 63xOil/1.4N.A. and EC Plan Neofluar 40xOil/1.4N.A. objectives. The images were processed using ImageJ software.

Target	Clone / Species / Isotype	Reference	Supplier	Antibody registry reference
HEV ORF2	1E6 / Mouse / IgG2b	MAB8002	Millipore	AB-827236
HEV ORF2	2E2 / Mouse / IgG1	MAB8003	Millipore	AB-571017
HEV ORF2	4B2 / Mouse / IgG1	MAB8006	Millipore	AB-11212267
HEV ORF2	P1H1 / Mouse / IgG3	Patent # PCT/EP2019/068338 [41]	Home-made	x
HEV ORF2	P3H2 / Mouse / IgG3	[41]	Home-made	x
HEV ORF3	Rabbit	Graff <i>et al.</i> [ <u>38]</u>	S. Emerson (NIH)	x
CD4	Rabbit	ab133616	Abcam	AB-270883
Importin a-1	Goat	ab6036	Abcam	AB-30524
Importin a-1	Rabbit	PA5-83544	Invitrogen	AB-2790697
CRM1	Rabbit	#46249	Cell Signaling	AB-2799298
γ-Tubulin	Mouse / IgG1	#T-5326	Sigma-Aldrich	AB-532292
CNX-N	Rabbit mAb	ab92573	Abcam	AB-10563673
CNX-C	Rabbit	ab22595	Abcam	AB-2069006
SP1	Rabbit	#PA5-29165	Thermofisher	AB-2546641
GM130	Mouse / IgG1	#610822	BD Biosciences	AB-398141
Lamin B1	Rabbit	ab16048	Abcam	AB-443298
αV-integrin	Rabbit	ab124968	Abcam	AB-11129746
Furin	MON-152 / Mouse / IgG1	ALX-803-017-R100	Enzo Life Sciences	AB-2051436

Table 1. Primary antibodies used for Western-blot, immunoprecipitation and indirect immunofluorescence experiments.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798.t001

# Quantification of nuclear/cytosolic fluorescence intensity ratios

Cells were co-stained with CellMask Green (Invitrogen) and analyzed using ImageJ software with a method adapted from McCloy *et al.* [42]. The regions of interest (ROI) were drawn around the whole cells and the nuclei. Area, integrated density and mean gray values were measured. For each cell, the nuclear/cytosolic fluorescence intensity ratio was calculated by the following formula: exact fluorescence intensity of nucleus/(exact fluorescence intensity of whole cell—exact fluorescence intensity of nucleus).

The exact fluorescence was = the corrected total cell fluorescence (CTCF)—the mean of the integrated density of non-infected cells. CTCF was calculated by the following formula: CTCF = integrated density - (area of selected electroporated cells x mean of background fluorescence around the cells).

#### Pearson's correlation coefficient (PCC) determination

Colocalization studies were performed by calculating the PCC using the JACoP plugin of ImageJ software. For each calculation, at least 30 cells were analyzed.

#### Virus production and intracellular viral particles preparation

PLC3 cells were electroporated with HEV-p6 RNAs as previously described [12]. Intracellular viral particles were prepared by osmotic shock, as previously described [13].

#### Infectious titer determination

Infectious titers in focus forming unit (FFU/mL) were determined as described previously [13] by using Huh-7.5 cells. ORF2-positive cells were quantified using an InCell 6000 confocal analyzer (GE Healthcare) and the Columbus image analysis software (Perkin Elmer).

## Chemicals and viability assay

Leptomycin B (Cell Signaling), Verdinexor (AdooQ Biosciences), Gossypol (Tocris), Mycolactone A/B toxin [43], Decanoyl-RVKR-chloromethylketone [CMK] (Sigma), hexa-D-arginine amide [D6R] (Sigma) and SSM3 trifluoroacetate (Tocris) were used in this study. Doseresponse curves of PLC3 cells treated with the different drugs are shown in <u>S13 Fig</u>. Cell viability was assessed using a CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega).

# **RNA** extraction and quantification

HEV RNA and cellular gene RNA levels were quantified by RT-qPCR as described in S1 Text.

#### Western blotting analysis

Western blotting analyses were performed as described previously [12]. Target proteins were detected with specific antibodies (Table 1) and corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies.

#### **Immunoprecipitations**

Anti-ORF2 antibodies were bound to magnetic Dynabeads M-270 Epoxy beads (Thermofisher) overnight at 37°C following the manufacturer's recommendations. Beads were washed and then incubated for 1h at RT with cell lysates or heat-inactivated supernatants. Beads were washed and then heated at 80°C for 20 min in Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 MAb.

### **Proximity ligation assay (PLA)**

Electroporated PLC3 cells cultured on glass coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min, methanol for 5min and permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 30 min. Proximity ligation assay was performed using Duolink *in situ* detection kit (Sigma), as recommended by the manufacturer, with mouse anti-ORF2 1E6 MAb and rabbit anti-Importin- $\alpha$ 1 MAb or rabbit anti-CRM1 MAb (Table 1). Images were acquired by confocal microscopy, as described above. For each condition, twelve fields were acquired. For each field, a stack of images corresponding to the total volume of the cells was acquired. Maximum-intensity projection images were generated using Zen software. Representative images were assembled and dots were counted using ImageJ software. For each field, the mean number of spots per cell was calculated by dividing the number of spots by the number of nuclei.

#### Silencing experiments

PLC3/HEV-p6 and PLC3 mock cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) pools (Horizon) targeting furin (ON-TARGETplus human Furin, gene 5045, siRNA SMART-pool) or with a nontargeting siRNA control (siCTL) by using RNAiMax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The knockdown effects were determined at 72h post-transfection by western-blotting and immunoprecipitation.

#### Subcellular extraction

Extractions were performed with the Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo scientific) following the manufacturer's recommendations. The cytoplasmic extracts were ultra-centrifugated at 100 000 g during 1h at 4°C. Anti- $\beta$ -tubulin (cytoplasmic), anti-Calnexin (membranous) and anti-SP1 or anti-Lamin B1 (nuclear soluble) antibodies were used to control the quality of extractions.

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the software RStudio version 1.2.5001 combined with R version 3.6.1. For all statistical tests, reported p values were two-sided. A test was declared statistically significant for any p value below 0.05. For comparing more than three groups of unpaired data, ANOVA or its non-parametric equivalent test, the Kruskal-Wallis test, was used. ANOVA was preferred when the distributions in each group followed a normal distribution, and the assumption of equality of the variances between each group was verified. When tests showed a significant difference between the groups, post hoc tests were performed. The Dunnett test (dunnettTest function with default option) followed an ANOVA, and the Conover's test (kwManyOneConoverTest function with pvalues adjusted by the Benjamini-Hochberg procedure) followed the Kruskal-Wallis test. Each group was compared to a reference. For the kinetic experiments, the Friedman test was preferred because of a lack of normality and homogeneity of variance and the post hoc Nemenyi test (frdManyOneNemenyiTest function from the package PMCMRplus) was used. For comparing two groups with unpaired data the Student's t test was used when gaussian distributions and homogeneity of variances were observed. If variances between groups were different, the Welch's correction was applied to the t test. And in case of a lack of normality of data, the Mann-Whitney's U test was chosen.

### Supporting information

S1 Text. Legends of supporting figures, supporting materials and methods, and supporting references.

(DOCX)

S1 Fig. Conservation of the Arginine-Rich Motif (ARM) in the ORF2 sequence. (TIF)

S2 Fig. Effect of 5R/5A, PSG/3R and  $\Delta$ SP mutations on the kinetics of ORF2 subcellular localization.

(TIF)

S3 Fig. Colocalization analysis of ORF2 with the Golgi marker 130 (GM130) in PLC3/ HEV-p6 cells expressing ORF2wt or ARM/SPmutants. (TIF)

S4 Fig. Controls of RNA and infectious titers

(TIF)

S5 Fig. Colocalization analysis of ORF2 with the Importin-α1 in PLC3/HEV-p6 cells expressing ORF2wt and ARM/SP mutants. (TIF)

**S6 Fig. ORF2 nuclear translocation modulates host gene expression.** (TIF)

S7 Fig. Effect of  $\Delta ORF3$  and NES12 mutations on the kinetics of ORF2 subcellular localization.

(TIF)

S8 Fig. Nuclear export, colocalization and interaction of ORF2 with the exportin CRM1 in cells expressing ORF2wt or NES mutants. (TIF)

**S9 Fig. Conservation of the Nuclear Export Signal 9 (NES9) in the ORF2 sequence.** (TIF)

**S10** Fig. Conservation of the Nuclear Export Signal 10 (NES10) in the ORF2 sequence. (TIF)

**S11 Fig.** Conservation of the Nuclear Export Signal 12 (NES12) in the ORF2 sequence. (TIF)

S12 Fig. Addressing of C2 constructs. (TIF)

S13 Fig. Dose-response curves of PLC3 cells treated with the different drugs used in this study.

(TIF)

**S1 Table.** Primers of use to generate ORF2/CD4 chimeras/mutants. (DOCX)

**S2 Table.** Primers used for RT-qPCR of cellular genes. (DOCX)

S1 Data. Excel spreadsheet containing, in separate sheets, the underlying numerical data and statistical analysis for Figs <u>1</u> and <u>2B, 2D Top, 2D Bottom and 2E, 3A, 3C, 3E and 3F, 5B and 6B, S2, S3, S4, S5, S6A Left, S6A Right, S6D, S7, S8A, S8B, S8C, S12, and S13 Figs. (XLSX)</u>

S2 Data. Compressed file containing figures of the unprocessed gels used in Figs <u>2C</u>, <u>3D</u>, <u>4A, 4C, 4D–4F and 4G</u>, <u>5C</u> and <u>6D</u>, <u>S7A</u> and <u>S12C</u> Figs. (ZIP)

#### Acknowledgments

We thank Olivia Beseme for her technical contribution. We thank Suzanne U. Emerson (NIH, USA), Jérôme Gouttenoire (University of Lausanne) and Ralph Bartenschlager (University of Heidelberg) for providing us with reagents. We thank François-Loïc Cosset (University of Lyon) for critical reading of the manuscript.

## **Author Contributions**

- **Conceptualization:** Kévin Hervouet, Martin Ferrié, Maliki Ankavay, David Hot, Jean Dubuisson, Cécile-Marie Aliouat-Denis, Laurence Cocquerel.
- Data curation: Laurence Cocquerel.
- Formal analysis: Kévin Hervouet, Martin Ferrié, Maliki Ankavay, Cécile Lecoeur, David Hot, Thibaut Vausselin, Laurence Cocquerel.
- Funding acquisition: Laurence Cocquerel.
- Investigation: Kévin Hervouet, Martin Ferrié, Maliki Ankavay, Claire Montpellier, Charline Camuzet, Virginie Alexandre, Aïcha Dembélé, Arnold Thomas Foe, Peggy Bouquet, Jean-Michel Saliou.
- Methodology: Kévin Hervouet, Martin Ferrié, Maliki Ankavay, Claire Montpellier, Laurence Cocquerel.
- Project administration: Laurence Cocquerel.
- **Resources:** Sophie Salomé-Desnoulez, Alexandre Vandeputte, Laurent Marsollier, Priscille Brodin, Marlène Dreux, Yves Rouillé.
- Supervision: Laurence Cocquerel.
- Validation: Kévin Hervouet, Martin Ferrié, Maliki Ankavay, Claire Montpellier, Cécile Lecoeur, Thibaut Vausselin, LaurenceCocquerel.
- Visualization: Laurence Cocquerel.
- Writing original draft: Laurence Cocquerel.
- Writing review & editing: Cécile-Marie Aliouat-Denis, Laurence Cocquerel.

#### References

- Horvatits T, zur Wiesch JS, Lütgehetmann M, Lohse AW, Pischke S. The Clinical Perspective on Hepatitis E. Viruses. 2019; 11: 617–19. <u>https://doi.org/10.3390/v11070617</u> PMID: <u>31284447</u>
- Wang S, Cheng X, Dai X, Dong C, Xu M, et al. Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. Virus research. 2013; 176: 101–106. <u>https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.013</u> PMID: <u>23742853</u>

- Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirsand Transmission Routes. Viruses. 2016;8:270. <u>https://doi.org/10.3390/v8100270</u> PMID: 27706110
- Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature. 2013; 496: 367–371. <u>https://doi.org/10.1038/</u> <u>nature12029 PMID: 23542590</u>
- 5. Yin X, Li X, Feng Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. Viruses. 2016;8. <u>https://doi.org/10.3390/v8080229</u> PMID: <u>27548201</u>
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. Virology. 1991; 185: 120–131. <u>https://doi.org/10.</u> 1016/0042-6822(91)90760-9 PMID: 1926770
- LeDesma R, Nimgaonkar I, Ploss A. Hepatitis E Virus Replication. Viruses. 2019; 11:719–17. <u>https://doi.org/10.3390/v11080719</u> PMID: <u>31390784</u>
- 8. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2018; 15: 96–110. <u>https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150</u> PMID: <u>29162935</u>
- Yang Y-L, Nan Y-C. Open reading frame 3 protein of hepatitis E virus: Multi-function protein with endless potential. World J Gastroentero. 2021;27:2458–2473. <u>https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i20.2458</u> PMID: <u>34092969</u>
- Wißing MH, Brüggemann Y, Steinmann E, Todt D. Virus–Host Cell Interplay during Hepatitis E Virus Infection. Trends Microbiol. 2020; 29: 309–319. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.07.002</u> PMID: <u>32828646</u>
- 11. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, Mather K, Torian U, 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. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00146-12</u> PMID: <u>22398290</u>
- Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier J-C, Saliou J-M, et al. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. Gastroenterology. 2018; 154: 211–223.e8. <u>https://doi.org/10.1053/i.gastro.2017.09.020</u> PMID:28958858
- Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou J-M, Wychowski C, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. Sci Rep. 2019; 9: 6243. <u>https://doi.org/10. 1038/s41598-019-42737-2</u> PMID: <u>31000788</u>
- Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M, Bawohl M, Honcharova-Biletska H, et al. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. J Hepatol. 2017;67:471–479. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002</u> PMID:28412294
- 15. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 2018; 3: 201721345–6. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115</u> PMID: <u>29669922</u>
- Ba ANN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics. 2009; 10:202. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202</u> PMID: <u>19563654</u>
- Nakada R, Matsuura Y. Crystal structure of importin-α bound to the nuclear localization signal of Epstein-Barrvirus EBNA-LP protein.Protein Science. 2017;26:1231–1235.<u>https://doi.org/10.1002/ pro.3173</u> PMID: <u>28383161</u>
- Dong C, Zafrullah M, Mixson-Hayden T, Dai X, Liang J, et al. Suppression of interferon-α signaling by hepatitis E virus. Hepatology. 2012; 55: 1324–1332. <u>https://doi.org/10.1002/hep.25530</u> PMID:\_ <u>22183878</u>
- Lei Q, Li L, Zhang S, Li T, Zhang X, et al. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type linterferon via impairment of multiple signaling pathways. Sci Rep. 2018; 8: 1–10. <u>https://doi.org/ 10.1038/s41598-018-26975-4</u> PMID: <u>29872132</u>
- Wang M, Huang Y, He M, Peng W-J, Tian D-Y. Effects of hepatitis E virus infection on interferon production via ISG15. World J Gastroentero. 2018;24:2173–2180. <u>https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i20.2173</u> PMID: <u>29853735</u>
- He M, Wang M, Huang Y, Peng W, Zheng Z, et al. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF-κBSignaling via TRADD and RIP1. Sci Rep. 2016; 1–13. <u>https://doi.org/ 10.1038/srep27597</u> PMID: <u>27270888</u>
- 22. Nan Y, Ma Z, Wang R, Yu Y, Kannan H, et al. Enhancement of Interferon Induction by ORF3 Product of Hepatitis E Virus. J Virol. 2014;88:8696–8705. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.01228-14</u> PMID: <u>24850742</u>
- 23. Xu J, Wu F, Tian D, Wang J, Zheng Z, Xia N. Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-κappa B signaling induced by tumor necrosis factor-α in human A549 lung epithelial cells. PLoS ONE. 2014;9:e100787. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100787</u> PMID: 24959724

- Mathew C, Ghildyal R. CRM1 Inhibitors for Antiviral Therapy. Front Microbiol 2017; 8: 10995–20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01171 PMID: 28702009
- 25. Demangel C, High S. Sec61 blockade by mycolactone: A central mechanism in Buruli ulcer disease. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization. 2018; 110: 237–248. https://doi.org/10.1111/boc.201800030 PMID: 30055020
- 26. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov. 2012; 11: 367–383. <u>https://doi.org/10.1038/nrd3699</u> PMID: <u>22679642</u>
- Cheng Y-W, Chao T-L, Li C-L, Chiu M-F, Kao H-C, et al. Furin Inhibitors Block SARS-CoV-2 Spike Protein Cleavage to Suppress Virus Production and Cytopathic Effects. Cell Reports. 2020; 33: 108254. <u>https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108254</u> PMID: <u>33007239</u>
- Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. PLoS Pathog. 2012; 8: e1003056. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056</u> PMID: <u>23236278</u>
- Lumangtad LA, Bell TW. The signal peptide as a new target for drug design. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2020; 30: 127115–8. <u>https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127115</u> PMID: <u>32209293</u>
- **30.** von Heijne G. Membrane-protein topology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006; 7:909–918. <u>https://doi.org/10.1038/nrm2063</u> PMID: <u>17139331</u>
- Nilsson J, Persson B, von Heijne G. Comparative analysis of amino acid distributions in integral membrane proteins from 107 genomes. Proteins. 2005; 60: 606–616. <u>https://doi.org/10.1002/prot.20583</u> PMID: <u>16028222</u>
- 32. von Heijne G. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. Nature. 1989;341. <u>https://doi.org/10.1038/341456a0</u> PMID: <u>2677744</u>
- **33.** Izaguirre G. The Proteolytic Regulation of Virus Cell Entry by Furin and Other Proprotein Convertases. Viruses. 2019; 11: 837–19. <u>https://doi.org/10.3390/v11090837</u> PMID: <u>31505793</u>
- Lin S, Yang Y, Nan Y, Ma Z, Yang L, Zhang Y-J. The Capsid Protein of Hepatitis E Virus Inhibits Interferon Induction via Its N-terminal Arginine-Rich Motif. Viruses. 2019; 11: 1050–17. <u>https://doi.org/10. 3390/v11111050</u> PMID: <u>31717991</u>
- **35.** Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. J Virol. 2006; 80: 5919–5926. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00046-06</u> PMID: <u>16731930</u>
- Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. Meng X-J, editor. PLoS Pathog. 2016; 12: e1005521. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005521</u> PMID:\_ <u>27035822</u>
- Blight KJ, Mckeating JA, Rice CM. Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. J Virol. 2002; 76: 13001–13014. <u>https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13001-13014.2002</u> PMID: <u>12438626</u>
- Graff J, Nguyen H, Yu C, Elkins WR, Claire MS, 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. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6680-6689.2005</u> PMID: <u>15890906</u>
- Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. Charged Residues in the Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Glycoproteins Play a Major Role in the Processing, Subcellular Localization, and Assembly of These Envelope Proteins. J Virol. 2000; 74: 3623–3633. <u>https://doi.org/10.1128/</u> jvi.74.8.3623-3633.2000 PMID: <u>10729138</u>
- 40. Orpana AK, Ho TH, Stenman J. Multiple Heat Pulses during PCR Extension Enabling Amplification of GC-Rich Sequences and Reducing Amplification Bias. Anal Chem. 2012; 84:2081–2087. <u>https://doi.org/10.1021/ac300040j</u> PMID: <u>22220596</u>
- Bentaleb C, Hervouet K, Montpellier C, Camuzet C, Burlaud-Gaillard J, et al. The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for Hepatitis E Virus. bioRxiv. 2021; 2021.10.14.464345. <u>https://doi.org/10.1101/2021.10.14.464345</u>
- 42. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2phase overrides the SAC and decouples mitotic events. Cell Cycle. 2014; 13: 1400–1412. <u>https://doi.org/10.4161/cc.28401</u> PMID: <u>24626186</u>
- Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, et al. Impact of Mycobacterium ulcerans Biofilm on Transmissibility to Ecological Niches and Buruli Ulcer Pathogenesis. PLoS Pathog. 2007; 3: e62–13. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030062</u> PMID: <u>17480118</u>

Annexe 2 – "The Endocytic Recycling Compartment Serves as a Viral Factory for Hepatitis E Virus"

Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, https://doi.org/10.1007/s00018-022-04646-y

**ORIGINAL ARTICLE** 



# The endocytic recycling compartment serves as a viral factory for hepatitis E virus

Cyrine Bentaleb<sup>1</sup> · Kévin Hervouet<sup>1</sup> · Claire Montpellier<sup>1</sup> · Charline Camuzet<sup>1</sup> · Martin Ferrié<sup>1</sup> · Julien Burlaud-Gaillard<sup>2,3</sup> · Stéphane Bressanelli<sup>4</sup> · Karoline Metzger<sup>1</sup> · Elisabeth Werkmeister<sup>5</sup> · Maliki Ankavay<sup>1,7</sup> · Nancy Leon Janampa<sup>2</sup> · Julien Marlet<sup>2</sup> · Julien Roux<sup>6</sup> · Clarence Deffaud<sup>6</sup> · Anne Goffard<sup>1</sup> · Yves Rouillé<sup>1</sup> · Jean Dubuisson<sup>1</sup> · Philippe Roingeard<sup>2,3</sup> · Cécile-Marie Aliouat-Denis<sup>1</sup> · Laurence Cocqu©el<sup>1</sup>

Received: 26 August 2022 / Revised: 4 November 2022 / Accepted: 23 November 2022 / Published online: 3 December 2022 © The Author(s) 2022

#### Abstract

Although hepatitis E virus (HEV) is the major leading cause of enterically transmitted viral hepatitis worldwide, many gaps remain in the understanding of the HEV lifecycle. Notably, viral factories induced by HEV have not been documented yet, and it is currently unknown whether HEV infection leads to cellular membrane modeling as many positive-strand RNA viruses. HEV genome encodes the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 protein involved in virion egress. Previously, we demonstrated that HEV produces different ORF2 isoforms including the virion-associated ORF2i form. Here, we generated monoclonal antibodies that specifically recognize the ORF2i form and antibodies that recognize the different ORF2 isoforms. One antibody, named P1H1 and targeting the ORF2i N-terminus, recognized delipidated HEV particles from cell culture and patient sera. Importantly, AlphaFold2 modeling demonstrated that the P1H1 epitope is exposed on HEV particles. Next, antibodies were used to probe viral factories in HEV-producing/infected cells. By confocal microscopy, we identified subcellular nugget-like structures enriched in ORF1, ORF2 and ORF3 proteins and viral RNA. Electron microscopy analyses revealed an unprecedented HEV-induced membrane network containing tubular and vesicular structures. We showed that these structures are dependent on ORF2i capsid protein assembly and ORF3 expression. An extensive colocalization study of viral proteins with subcellular markers, and silencing experiments demonstrated that these structures are derived from the endocytic recycling compartment (ERC) for which Rab11 is a central player. Hence, HEV hijacks the ERC and forms a membrane network of vesicular and tubular structures that might be the hallmark of HEV infection.

**Keywords** Hepatitis E virus  $\cdot$  ORF2 capsid protein  $\cdot$  Antibodies  $\cdot$  Infectious particles  $\cdot$  AlphaFold2  $\cdot$  Viral factories  $\cdot$  Electron microscopy  $\cdot$  Endocytic recycling compartment  $\cdot$  Rab11

Cyrine Bentaleb and Kévin Hervouet contributed equally to this work as first authors, Claire Montpellier, Charline Camuzet and Martin Ferrié contributed equally to this work as second authors, Cécile-Marie Aliouat-Denis and Laurence Cocquerel contributed equally to this work as last authors.

Laurence Cocquerel laurence.cocquerel@cnrs.fr

- <sup>1</sup> University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Pasteur Institute of Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France
- <sup>2</sup> Inserm U1259, Morphogénèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites (MAVIVH), Université de Tours and CHRU de Tours, 37032 Tours, France
- <sup>3</sup> Université de Tours et CHRU de Tours, Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique, Tours, France

#### Abbreviations

aa	Amino acid
ARM	Arginine-rich motif
CTL	Control
EEA1	Early endosome antigen-1

- <sup>4</sup> Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-Sur-Yvette, France
- <sup>5</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014-US41-PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie and Santé, Lille, France
- <sup>6</sup> BIOTEM, Apprieu, France
- <sup>7</sup> Present Address: Division of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Microbiology, Lausanne, Switzerland

FHD	Eps15 homology domain
eHEV	Enveloped HEV
FM	Electron microscony
ER	Endonlasmic reticulum
FRC	Endoputio-recycling compartment
FRGIC	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate
LIGIC	compartment
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for
LUCIU	transport
GA	Golgi apparatus
gt	Genotype
HD	Heat-denatured
HEV	Hepatitis E virus
IAV	Influenza A virus
IF	Immunofluorescence
IG	Immunogold
IP	Immunoprecipitation
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
MICAL-L1	Molecule interacting with CasL-like1
MOC	Mander's overlap coefficient
MTOC	Microtubule-organizing center
MVB	Multivesicular bodies
NT	Non-transfected
ORF	Open-reading frame
ORF2c	Cleaved ORF2
ORF2g	Glycosylated ORF2
ORF2i	Infectious ORF2
PACSIN2	Protein Kinase C and Casein Kinase Sub-
	strate in Neurons 2
p.e.	Post-electroporation
PMP70	70-KDa peroxisomal membrane protein
qIP	Immunoprecipitation followed by RT-qPCR
siRNA	Small-interfering RNA
SN	Supernatant
TGN	Trans Golgi network
TRE	Tubular-recycling endosome
TrF	Transferrin
TX	Triton X-100
WB	Western blotting

### Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of acute viral hepatitis worldwide. Five distinct genotypes (gt), belonging to a single serotype, infect humans. HEV gt1 and gt2 are restricted to humans and are responsible for waterborne outbreaks in developing countries with low sanitary conditions. HEV gt3, gt4 and gt7 are zoonotic and cause sporadic zoonotic foodborne hepatitis in industrialized countries and United Arab Emirates [1–4]. Although HEV causes a mostly asymptomatic self-limited disease, gt1-infection can lead to fulminant liver failure, particularly

in pregnant women, and gt3-infection can lead to chronic disease in immunosuppressed patients. There is no specific treatment nor universal vaccine against HEV [5].

HEV is found as a non-enveloped virus in bile and feces or as a quasi-enveloped virus (eHEV) in blood and cell culture supernatant. Its RNA genome encodes three proteins: the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 protein involved in virion egress [6]. Previously, we demonstrated that, during the HEV lifecycle, HEV produces several forms of the ORF2 capsid protein [7]: (i) the infectious ORF2i form (also named ORF2c [8]) is the structural component of infectious particles that are likely derived from the assembly of the intracellular ORF2i form, (ii) the glycosylated ORF2g form (also named ORF2s [8]) that is not associated with infectious material but secreted in large amounts (i.e., about 1000 × more than ORF2i [8]) and is the most abundant antigen detected in patient sera [7] and in plasma of HEV-infected human liver chimeric mice [9], and (iii) the ORF2c form that is a cleaved form of ORF2g found in some patient sera and cell culture supernatant [7]. ORF2g and ORF2c (herein referred to as ORF2g/c) likely act as humoral decoys that inhibit antibody-mediated neutralization [8]. Recently, we demonstrated that a 5 amino acid arginine-rich motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region is a unique central regulator of ORF2 addressing that

finely controls the HEV lifecycle [10]. Indeed, the ARM controls ORF2 nuclear translocation, promoting regulation of host antiviral responses. This motif also regulates the dual topology and functionality of ORF2 signal peptide, leading to the production of either cytosolic infectious ORF2i or reticular non-infectious glycosylated ORF2 forms. Furthermore, the ARM likely serves as a cleavage site of the glycosylated ORF2 protein. Finally, it promotes ORF2 membrane association that is likely essential for particle assembly [10].

Recent breakthroughs have been achieved in developing cell culture models for HEV [11]. However, many gaps remain in the knowledge of the HEV lifecycle such as the intracellular location of HEV replication and particle assembly as well as the underlying mechanisms of these processes [12]. It is known that the majority of positive sense single-stranded RNA viruses induce host cell membrane rearrangements to facilitate their viral genome replication and viral particle assembly and to protect from the innate immune response. These membrane rearrangements have been well characterized by confocal and electron microscopy approaches leading to the identification of a broad spectrum of complexity between the host membrane remodeling and viral and cellular actors involved in these arrangements [13]. However, due to a scarcity of robust cell culture models and tools, membrane remodeling and viral factories induced by

HEV have not been documented yet. Here, we generated monoclonal antibodies directed against the ORF2 capsid

#### Table 1 Primary antibodies used in Western blot (WB), immunofluorescence (IF) and immunogold (IG) experiments

Name	Target/Epitope	Host	Isotype	Source	References	Ab Registry	WB	IF	IG
P1H1	ORF2i GQPSGRRRGRRSGG	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P2H1	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG2a	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P2H2	ORF2i AGYPYNYNTTASDQ	Mouse	IgG1	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
P3H2	ORF2i/g/c SRVVIQDYDN- QHEQDR	Mouse	IgG3	This study	n/a	n/a	1/500	1/500	1/100
1E6	ORF2i/g/c GDSRVVIQDYDN- QHEQ DRPTPSPA	Mouse	IgG2b	Millipore	MAB8002	AB_827236	1/2000	1/800	1/100
ORF3	ORF3 ANPPDHSAPLG- VTRPSA PPLPHVVDLPQL- GPRR	Rabbit	pAb	S. Emerson	[15]	n/a	n/a	1/1000	1/100
H52	Hepatitis C Virus E2 glycoprotein	Mouse	IgG1	J. Dubuisson	[16]	n/a	n/a	n/a	n/a
Tub	β-tubulin C-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5201	AB_609915	1/1000	1/100	n/a
MTOC	γ-tubulin N-terminal region	Mouse	IgG1	Sigma	T5326	AB_532292	n/a	1/500	n/a
Calnexin	Human Calnexin	Rabbit		Abcam	ab22595	AB 2069006	n/a	1/1000	n/a
ERGIC53	ERGIC 53 kDa protein	Mouse	IgG1	Enzo Life Sciences Inc	ALX-804-602-C100	AB 2051363	n/a	1/100	n/a
EEA1	Early Endosome Antigen 1	Mouse	IgG1	Transduction Laboratories	610457	AB_397830	n/a	1/500	n/a
Rab5	Rab5	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#3547	AB_2300649	1/1000	1/200	n/a
Rab9a	Rab9a	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#5118	AB_10621426	n/a	1/50	n/a
Rab11	Rab11	Rabbit	(mAb	Cell signaling	#5589	AB_10693925	n/a	1/50	n/a
Rab11a	Rab11a	Rabbit	(pAb)	ThermoFisher	71-5300	AB_2533987	n/a	n/a	1/10
Rab11a	Rab11a	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab128913	AB_11140633	1/20000	n/a	n/a
Rab11b	Rab11b	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab175925	n/a	1/10000	n/a	n/a
5A6	Tetraspanin CD81 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	S. Levy	[17]	AB_627192	n/a	1/300	1/30
CD63	Tetraspanin CD63 Large extracellular loop	Mouse	IgG1	BD Pharmingen	556019	AB_396297	n/a	1/500	n/a
CD71	Transferrin receptor	Mouse	IgG1	Santa Cruz Biotechnology	sc-65882	AB_1120670	n/a	1/100	n/a
CD71	Transferrin receptor	Rabbit	pAb	Abcam	ab84036	AB_10673794	n/a	1/1000	1/100
EHD1	Eps15 homology domain protein 1	Rabbit	(mAb)	Abcam	ab109747	AB_10864800	n/a	1/1000	n/a
MICAL-L1	Molecule Interacting with CasL-like1	Rabbit	IgG	Abcam	ab220648	n/a	n/a	1/100	n/a
PACSIN2	Protein Kinase C and Casein Kinase Sub- strate in Neurons 2	Rabbit	IgG	MyBiosource	MBS7114698	n/a	n/a	1/1000	n/a
PMP70	70-kDa Peroxisomal Membrane Protein	Mouse	IgG1	Sigma	SAB4200181	AB_10639362	n/a	1/1000	n/a
Catalase	Catalase	Rabbit	IgG	Cell signaling	#12980	AB_2798079	n/a	1/800	n/a

 Table 1 (continued)

Name	Target/Epitope	Host	Isotype	Source	References	Ab Registry	WB	IF	IG
TOM-20	Translocase of the outer mitochondrial Membrane	Mouse	IgG1	BD Biosciences	612278	AB_399595	n/a	1/100	n/a
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	Rabbit	(mAb)	Cell signaling	#9091	AB_2687579	n/a	1/200	n/a
V5	GKPIPNPLLGLDST	Mouse	IgG2a	Abcam	ab27671	AB_471093	n/a	1/500	n/a

Graff et al. [15], Flint et al. [16], Oren et al. [17]

protein and used them to probe infectious particles and viral factories in HEV-producing/infected cells.

#### Materials and methods

#### **Generation of monoclonal anti-ORF2 antibodies**

Mice immunization and generation of P1H1, P2H1, P2H2 and P3H2 monoclonal antibodies were performed as described in [14]. Briefly, peptides P1 (GQPSGRR RGRRSGG), P2 (AGYPYNYNTTASDQ) and P3 (SRV-

VIQDYDNQHEQDR) were synthetized and coupled to the protein carrier KLH via a maleimide function by adding a cysteine at the C-terminal position. For the immunization of mice, BIOTEM animal experiments were performed in accordance with the dedicated laws. Institutional Animal Care Committee (IACUC) was DDPP de l'Isère. BIOTEM Ethics committee was the approving committee. Peptides in complete Freund's adjuvant were injected (20 µg) subcutaneously in OF1 mice. Mice were subsequently immunized twice with peptides (40 µg) in incomplete Freund's adjuvant. Peptides were administrated intraperitoneally in mice 3 days before cell fusion between splenocytes and myeloma cell line (NS-1). The selection of secreting hybridomas was performed in hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium. Before being euthanized using the carbon dioxide method, mice were bled to collect immune serum. Screening of sera, hybridomas and subclones was performed by western-blotting and immunofluorescence on PLC3/HEV cells.

#### Antibodies

Primary antibodies used in this study are listed in Table 1. Peroxidase- and fluorochrome-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Gold-conjugated secondary antibodies were from Aurion (Wageningen, The Netherlands).

#### Cells

PLC3 cells are a subclone of PLC/PRF/5 hepatoma cells [7]. PLC3 and Huh-7.5 [18] cells were authenticated by STR profiling and Multiplex Cell Authentication (Multiplexion), respectively, and cultured as previously described [19].

#### Plasmids and transfection

The plasmid pBlueScript SK(+) carrying the DNA of the full-length genome of gt3 Kernow C-1 p6 strain (Gen-Bank accession number JQ679013, kindly provided by S.U Emerson) was used [20]. The ORF3-null mutant (HEV-p6- $\Delta$ ORF3) and the 5R/5A mutant (HEV-p6-5R/5A) of HEVp6 were generated as described in [15] and [10], respectively. The plasmid pBlueScript SK(+)/HEV-p6 expressing a V5-tagged ORF1 (V1 insertion) has been described previously [21].

The plasmid pBlueScript SK(+) carrying the DNA of the p6-V1-Puro replicon was generated from the pBlueScript SK(+)/p6-V1 plasmid [21] in which the ORF3/ORF2 region was replaced by a fragment encoding the resistance gene to puromycin as well as the last 321 amino acid residues of ORF2.

Capped genomic HEV RNAs were prepared with the mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) and delivered to PLC3 or Huh-7.5 cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell apparatus (Bio-Rad) [7]. PLC3/HEV and Huh-7.5/ HEV cells were electroporated with p6 RNA (20  $\mu$ g/4.10<sup>6</sup> cells), whereas PLC3 mock and Huh-7.5 mock were electroporated in the absence of RNA.

#### Western blotting analyses

Samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham). The targeted proteins were detected with specific antibodies (Table 1) and corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies. The detection of proteins was done by chemiluminescence analysis (ECL, Amersham).

#### Immunoprecipitations (IP)

Antibodies were bound to Tosylactivated M-280 Dynabead (Thermo Fisher) overnight at 37 °C following the manufacturer's recommendations. Beads were washed and then incubated for 1 h at room temperature with supernatants (heat-inactivated or Triton-X100-treated), lysates or Triton-X100-treated patient sera. Beads were washed and then heated at 80 °C for 20 min in Laemmli buffer. ORF2 proteins were detected by WB using the 1E6 antibody (Table 1).

# **RT-qPCR** and **qIP**

RNAs were extracted and next converted to cDNA by using a polydT primer and the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Agilent Technologies). qPCR (TaqMan Gene Expression Assay, MGB-FAM-dye, ThermoFisher Scientific) was performed by using the QuantStudio3 Thermocycler (Applied Biosystems) and using primers (5'-GGT GGTTTCTGGGGTGAC-3' (F) and 5'-AGGGGTTGGTTG GATGAA-3' (R)) and a probe (5'-FAM-TGATTCTCAGCC CTTCGC-TAMRA-3') that target a conserved 70-bp region in the ORF2/3 overlap [22]. For cells harboring the subgenomic p6-replicon, qPCR was performed using primers (5'-AAGACATTCTGCGCTTTGTT-3' (F) and 5'-TGACTC CTCATAAGCATCGC-3' (R)) and a probe (5'-FAM-CCG TGGTTCCGTGCCATTGA-3') that target the ORF1 [8].

For qIP experiments, samples were first immunoprecipitated as described above. Next, RNAs were extracted and quantified by RT-qPCR as described above.

#### **Patient samples**

Patient samples were collected in France. 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. According to the French law (Loi Jardé), anonymous retrospective studies do not require institutional review board approval.

# Modeling of the N-terminus of ORF2

We used an inhouse ColabFold implementation of Alpha-Fold2 [23] to generate models of the N-terminus of ORF2. Briefly, we used the ORF2 sequence or only the sequence encompassing up to residue 311 (comprising the shell (S) domain) or up to residue 446 (with the middle (M) domain added), with or without the 13 N-terminal residues (*i.e.* fulllength or OR2i), to query the UniRef30 database (March or June 2021 release) with either HHBlits of MMseqs2 [24]. The resulting sequence alignments typically comprised 180–500 hits with 25–400 sequences aligned to anyresidue Page 5 of 25 615

of the query. These alignments were used as inputs to Alpha-Fold2, and 5 models were generated for each. Resulting models were aligned to the S domain of PDB 3iyo. Molecules A, B and C, the three distinct positions in the T = 3icosahedral HEV capsid, were tried. This allowed displaying our models in the context of the capsid-like particle visualized by low-resolution cryo-electron microscopy (cryo-EM, Electron Microscopy Data Bank entry 5173) [25]. The models and EM map were displayed and rendered with the PyMOL Molecular Graphics System (version 1.8 2015).

### PLC3-replicon

Cells stably harboring a p6 subgenomic replicon were generated by electroporating PLC3 cells with p6-V1-Puro replicon-capped RNAs. Cells were next cultured with 2.5  $\mu$ g/ml of puromycin (Euromedex) for the selection of cells transfected with the ORF1-V5-puro replicon.

#### Indirect immunofluorescence

Cells were grown on coverslips in 24-well plates and fixed at 6 d.p.e. for electroporated cells and 12 d.p.i. for infected cells, with 3% of paraformaldehyde (PFA). After 20 min (min), cells were washed twice with phosphatebuffered saline (PBS) and permeabilized for 5 min with cold methanol and then with 0.5% Triton X-100 (TX) for 30 min. Cells were incubated in PBS containing 10% goat serum for 30 min at room temperature (RT) and stained with the indicated primary antibodies for 30 min at RT followed by fluorochrome-conjugated secondary antibodies 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 880 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a Plan Apochromat 63xOil/1.4 N.A. objective. The images were processed using Fiji software.

For high-resolution confocal analyses, images were acquired with an Airyscan module. Z-stacks acquisition were performed with a 0.15-µm z-interval. The confocal parameters were determined to optimize the dynamic range and avoid intensity saturation, and the same settings were applied for each sample. Images in the three channels were recorded using Zen image collection software (Carl Zeiss Microscopy) and processed for high-resolution reconstruction. 3D volumetric surface constructs were obtained using Imaris software (version 9.5.1; Oxford instruments, Belfast), by applying an intensity threshold for each channel. The images were then processed using Fiji software.

а			r→ORF2i	P	ORF2g		
	1	MCPRVVLLLF	FVFLPMLPAP	PAGQPSGRRR	GRR'SGGAGGG	FWGDRVDSQP	50
	51	FALPYTHPTN	PFAADIVSQS	GAGTRPRQPP	R P L GS A W R DQ	SQRPSAAPRR	100
	101	R'SAPAGAAPL	NRLLRLODGT	PVPDVDSRGA	I L R R Q Y N L S I	SPLISSVASG	150
	201	AVCOVALSIS	EWPOTTTPT	NI HIMATEAS	DVPLLVOPCL		200
	201	L HYRNOGWRS	VETTGVAFFF	ATSGLVMLCI	HGSPVNSVTN	TPYTGALGLI	300
	301	DFALFLEERN	LTPGNTNTRV	SRYTSTARHR	I R R G A D G T A F	LTTTAATREM	350
	351	K DL HF T GT NG	VGEVGRGIAL	TLFNLADTLL	GGLPTELISS	AGGOLFYSRP	400
	401	VVSANGEPTV	KLYTSVENAQ	QDKGITI PHD	I DL GDS R V V I	QDY DNQHE QD	450
	451	<b>R</b> PTPSPAPSR	PFSVLRANDV	LWLSLTAAEY	DQATYGSSTN	PMYVSDTVTF	500
	501	VNVATGAQAV	ARSLDWSKVT	LDGRPLTTIQ	QYSKTFYVLP	L R G K L S F WE A	550
	551	GTTR <mark>AGYPYN</mark>	YNTT AS DQ I L	IENAAGHRVA	ISTYTTSLGA	GPASISAVGV	600
	601	LAPHSALAVL	EDTVDYPARA	HTFDDFCPEC	RTLGLQGCAF	QSTIAELQRL	650
	651	KTEVGKTRES	660 <b>P2</b>		F	'3	
b		SN		С			
WB:	1E6	P1H1 P2H1 P	2H2 P3H2 Tub	· ·	SN-HD		Cells
HEV:	+ -	+ - + - +	- + - + -		~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	Ps: Way C	1 and by by by bar to
ORF2i -				-100 ORF2g		-100 ORF2i	-100
ORF2c	-			0RF2c		-70	-70
	1.756.31			-55	Shorter e	хро	
		Cells		d _	Input IP-P	1H1 IP-P3H2	IP-CTL
HEV:	1E6 + -	<u>P1H1</u> P2H1 P2 + - + - +	- + - + -	SN: J	Patat at all all all	to to to to to to to	+ 0% 2x+ 0% 0. 1 0%
			The second second				
ORF2i —	-		-	-70 ORF2i			-100
		/.		-55 ORF26			-70
			070				
-			Joc T		<b>C1</b>	IP_P1H	11
е	- -	SN-TX 0.5%	IEB 40- ****	T <u>HEV-</u> -	51		
	IPe.	mout cit onthe parts	5 30- T.	E E	F1 F1		\$3
	ORF2g		ss. I	<u> </u>			
	ORF2i		<sup>1</sup> 8 <sup>20</sup>	0052	-100 ORF2	=	-100
	ORF2c		¥ 10-	ORFZI	-70		-70
				HEVs	er	HEVcc HEVse	-r
			aller and and and			HEVOC HEVOC	
			415. U 8. 8'S				
		g	ORF2 (1-605)		ORF2i (14-6	605)	
			1 mm		14	×	
		A	C	P1 A	5	2	
		S.		<b>N</b>		P1	
		P domain		1	3	×	
				2	V A		
		S do	main	<u></u>	and the second	<u>م</u> ر	
			man	C	5	m	
			A A				
			San de		800-5		
		le:	200000			X	
		n	18 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1			A State	
				0 8		2_P1	
		and a	10 Mar 1990				
		2	1. A. A.		26. T.		
			3. 		a star		
				2	- 8-24		
				and the second s	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
			1 m		23		
					1.4		

13

Fig. 1 Generation of monoclonal antibodies that specifically recognize the ORF2i protein. a Sequence of ORF2 proteins. The line corresponds to the signal peptide. N-glycosylation sites are highlighted in yellow. P1, P2 and P3 peptides are highlighted in blue, orange and purple, respectively. The dashed line corresponds to the 1E6 epitope. **b** Detection of ORF2 proteins in supernatants (SN) and lysates (cells) of PLC3/HEV (+) and mock electroporated PLC3 cells (-) by WB. c Immunoprecipitation of ORF2 proteins in heat-denatured (HD, 20 min at 80 °C) SN and lysates of PLC3/HEV cells. An anti-HCV E2 envelope protein antibody (H52) was used as a negative control (CTL). ORF2 proteins were detected by WB with the 1E6 antibody (WB 1E6). d IP of SN treated for 30 min with Triton X-100 (TX-0.1%, TX-1%), or left untreated (TX-0%). Inputs used for IP are shown on the left. ORF2 proteins were detected by WB 1E6. e SN of PLC3/HEV cells was treated with TX-0.5% and immunoprecipitated with the P1H1, P3H2 or isotype control antibodies. Half of the IP was analyzed by WB 1E6 (left panel) and the other half was processed for RNA extraction and HEV RNA quantification (right panel). Results are expressed as percentage of immunocaptured HEV RNA copies compared to the total input. Values are means from three independent experiments (n = 3, mean  $\pm$  S.D., Kruskal–Wallis with Dunn's test), \*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001. f Sera of HEV-infected (HEVser, S1-S3) or non-infected (HEV-) patients were treated with TX-0.5% and immunoprecipitated with P1H1 or isotype control antibodies. IPs on SN of PLC3/HEV cells (HEVcc) were used as controls. ORF2 proteins were detected by WB 1E6. (b-f) Molecular mass markers are indicated on the right (kDa). For clarity and conciseness concerns, blots were cropped. g Models of ORF2 (left) and ORF2i (right) including their N-termini (residues 1-128 and 14-128, respectively. The first residue is labeled. The 606-660 residues located downstream of the P (protruding) domain are not included). Models are displayed in ribbons representation and, for S (shell) and M (middle) domains, colored by expected accuracy from red (most accurate) to blue (least accurate or no defined structure). P (protruding) domain is colored in gray. Arginine side chains upstream residue 128 are displayed as spheres. The P1 epitope is labeled. h The same ORF2i model in the same representation and orientation as in (g, right) has been fitted at the 'A' molecule position in the 12-Å cryo-EM map of a virion-sized recombinant ORF2 icosahedral T = 3 particle (EMDB 5173). Left, cutaway overall view. Right, zoom on the model

# Manders' overlap coefficient (MOC) determination

Colocalization studies were performed by calculating the MOC using the JACoP plugin of Fiji software. For each analysis, at least 30 cells were selected to calculate a MOC mean. A MOC of 1 indicates perfect overlap and 0 no overlap.

# In situ labeling of viral RNA

PLC3 cells electroporated with HEV-p6 (PLC3/HEV) or HEV-p6 expressing a V5-tagged ORF1 (PLC3/HEV-ORF1V5) strains were fixed in 3% PFA for 20 min. Coverslips holding the fixed cells were attached to glass slides with a drop of nail polish, and hydrophobic barriers were drawn around them with the ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (ACD Bio). Next, fixed cells were pre-treated according to the supplier instructions (RNAscope H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Protease Reagents). First, the cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min

at RT and then washed twice with 1PBS. Next, the protease III was diluted 1:15 and incubated for 15 min at RT; slides were washed twice. Then, the RNAscope assay was carried out following the user manual precisely (RNAscope Detection Kit Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 [26, 27]. We used a probe (ref. 1030631-C2, Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne) that targets positive strand of genomic viral RNAs [21]. The RNAs were labeled with fluorophore Opal 520 (Akoya Biosciences). Subsequently, immunofluorescent labeling using either P1H1, anti-ORF3 or anti-Rab11 anti-bodies was performed. Finally, coverslips were mounted and cells were analyzed by confocal microscopy.

# Immunoelectron microscopy

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

# Transferrin endocytosis

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

# **Silencing experiments**

At 3 days p.e., PLC3/HEV cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) pools (Horizon) targeting Rab11a (ON-TARGETplus human Rab11a, gene 8766, siRNA SMARTpool) and Rab11b (ON-TARGETplus human Rab11b, gene 9230, siRNA SMARTpool) (siRab11) or with a nontargeting siRNA control (siCTL) by using RNAiMax



13

Fig. 2 Subcellular structures recognized by anti-ORF2 antibodies. a At 6 days post-electroporation (d.p.e.), PLC3/HEV cells were fixed, permeabilized with cold methanol and TX-0.5% and double-stained with indicated anti-ORF2 and anti-ORF3 antibodies. Red = ORF2; Green = ORF3; Blue = DAPI. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 µm. b Manders' overlap coefficients (MOC) of the ORF2 labeling in the ORF3 labeling (ORF2 in ORF3, dark grey) and MOC of the ORF3 labeling in the ORF2 labeling (ORF3 in ORF2, light grey). c, d PLC3/HEV cells were co-stained with anti-ORF3 and P1H1 (c) or P3H2 (d) antibodies and analyzed by confocal microscopy with a high-resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using Imaris is shown to visualize the ORF2/ORF3 substructures. In the middle, zstacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of ORF2 and ORF3 staining measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the bottom left of each panel. Scale bars show the indicated length. e PLC3 cells were electroporated with the p6 strain expressing either wildtype (PLC3/HEV) or the V5-tagged ORF1 (PLC3/ HEV-ORF1V5) proteins or mock electroporated (PLC3 mock). At 3 d.p.e., cells were processed for immunofluorescence using anti-V5 (V5, red), and P1H1 (ORF2, green) or anti-ORF3 (ORF3, green) antibodies prior to analysis by confocal microscopy. Line graphs show the fluorescence intensities of ORF1V5 and ORF2i or ORF3 staining measured every 70 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. f PLC3/HEV and PLC3 mock cells were grown on coverslips, fixed at 3 d.p.e. and processed for in situ RNAscope hybridization. Cells were stained with a probe targeting HEV genomic RNA (RNA, red) and P1H1 (ORF2, green) or anti-ORF3 (ORF3, green) antibodies. Line graphs show the fluorescence intensities of RNA and ORF2i or ORF3 staining measured every 70 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Nuclei are in blue. Scale bar, 20 µm

reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The knockdown effects were determined at 72 h posttransfection by immunofluorescence, western-blotting, RTqPCR and virus titration.

#### Infectious titers

Huh 7.5 cells were seeded in 96-well plates. The following day, cells were infected with serial dilutions of supernatants or intracellular viral particles from 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/ml. Titers were adjusted to 100% for non-transfected (NT) cells.

#### Intracellular viral particles

Confluent T75 flasks of 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 water at room temperature. Cells were vortexed vigorously for 20 min, and then, 110  $\mu$ l of sterile 10X PBS was added. Samples were clarified by centrifugation 2 min at 14,000 rpm. The supernatants containing intracellular particles were collected and stored at – 80 °C until use.

#### Results

# Generation of monoclonal antibodies that specifically recognize the ORF2i protein

The ORF2 protein sequence contains 660 amino acids (aa) (Fig. 1a). Previously, we demonstrated that the first aa of ORF2i, ORF2g and ORF2c proteins are L<sup>14</sup>, S<sup>34</sup> and S<sup>102</sup>, respectively [7, 19]. The ORF2i protein is not glycosylated, whereas ORF2g/c proteins are N-glycosylated on <sup>137</sup>NLS and <sup>562</sup>NTT sequons [19] (Fig. 1a). We capitalized on these features to design two immunogen peptides (P1 and P2) for obtaining highly specific antibodies of the ORF2i form. The P1 peptide corresponds to the N-terminus of the ORF2i protein that is not present in the ORF2g/c form sequences. The P2 peptide corresponds to 14 aa covering the <sup>562</sup>NTT sequon that is not occupied by N-glycans on the ORF2i protein, in contrast to ORF2g/c proteins. We also designed a P3 peptide for obtaining antibodies recognizing the different forms of ORF2 (Fig. 1a). To verify the specificity between strains/ genotypes, sequence alignments were carried out for each peptide (data not shown). Following mice immunization and hybridoma screening, one clone from P1 immunization (P1H1), two clones from P2 immunization (P2H1 and P2H2) and one clone from P3 immunization (P3H2) were selected and further characterized.

Specificity of generated antibodies was first analyzed in western blotting (WB) experiments with supernatants (SN) and lysates of PLC3 cells electroporated with the gt3 p6 strain (PLC3/HEV cells) and mock electroporated PLC3 cells (Fig. 1b). SN of PLC3/HEV cells contains quasienveloped infectious HEV particles (ORF2i) but also large amounts of ORF2g/c proteins, whereas cells express the intracellular ORF2i form that assembles to form intracellular particles [7, 19]. The 1E6 monoclonal antibody, which recognizes the three forms of ORF2 proteins [7], was used as a control. The P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies showed a highly specific recognition of the ORF2i protein, which often appears as a doublet, without cross-reacting with the ORF2g/c proteins, as compared to the P3H2 and 1E6 antibodies that recognized the three forms (Fig. 1b).

Antibodies were next used in immunoprecipitation (IP) assays against heat-denatured (HD) SN and lysates of PLC3/ HEV cells. In lysates, all antibodies immunoprecipitated the ORF2i protein (Fig. 1c, right panel). In contrast, in SN, no ORF2 proteins were detected in IP-P2H1 and IP-P2H2, whereas the IP-P1H1 showed a highly specific recognition



**Fig. 3** Identification of HEV-induced vesicular and tubular structures in HEV-producing PLC3 cells. **a** Transmission electron microscopy of PLC3/HEV cells cryosections immunogold-labeled with the indicated antibodies. Arrows highlight vesicular and tubular structures. N, nucleus. The asterisk indicates a nuclear deformation. **b** Networks containing both vesicular and tubular structures in PLC3/HEV cells

13

of the ORF2i protein, without cross-reaction with the ORF2g/c proteins (Fig. 1c, left panel), as compared to IP-P3H2 and IP-1E6 that displayed the three forms of ORF2. Thus, P1H1 specifically immunoprecipitates heat-denatured HEV particles.

HEV particles produced in cell culture are wrapped with lipids that mask the ORF2 epitopes. In order to analyze the ability of antibodies to immunoprecipitate non-denatured particles, SN of PLC3/HEV cells was then treated with Triton X-100 (TX), or left untreated (TX-0%) before IP with P1H1 and P3H2 (Fig. 1d). In untreated samples, no ORF2 proteins were detected in IP-P1H1, whereas ORF2g/c proteins were immunoprecipitated by P3H2. In treated samples, the IP-P1H1 showed a highly sensitive and specific recognition of the ORF2i protein, whereas IP-P3H2 displayed the three forms of ORF2. Thereby, P1H1 specifically immunoprecipitates detergent-treated HEV particles.

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

Importantly, we analyzed the ability of P1H1 antibody to recognize particles from infected patient sera (HEVser). For this purpose, IP-P1H1 and IP-CTL were performed on TX-0.5%-treated sera from HEV-infected (S1-S3) and noninfected (HEV-) patients. As shown in Fig. 1f, P1H1 efficiently immunoprecipitated the particle-associated ORF2i form, indicating that the P1H1 antibody captures patient HEV particles.

Finally, in order to visualize how the P1 epitope may be exposed on HEV particles, we modelled the N-terminal part of ORF2. The N-terminus (residues 1–128 for ORF2 and 14–128 for ORF2i) was clearly flexible and found in different places in different models. However, the very first residues, including P1, were often found on the same level as or even above M and P domains (Fig. 1g), that are exposed at the surface of the icosahedral HEV capsid. Indeed, our models with the most extended N-termini, when placed in the context of the available 12-Å cryo-EM map of the recombinant ORF2 particle [25], readily display the P1 peptide. It is noteworthy that in all models, arginine residues of the N-terminus downstream P1 were still exposed on the inside of the capsid (Fig. 1h).

Antibodies were also tested for their ability to neutralize non-enveloped particles, but none of them displayed neutralizing activity (data not shown), indicating that, while exposed on HEV particles, the P1 epitope is not involved in HEV entry.

#### Identification of HEV-induced subcellular structures

We next performed double-label immunofluorescence and confocal analyses of PLC3/HEV (Fig. 2a) and mock electroporated PLC3 (PLC3 mock) (Fig. S1) cells using the anti-ORF2 antibodies and a polyclonal antibody directed against ORF3, a small protein with a viroporin activity [28] that is associated with the quasi-enveloped viral particle and supports virion egress through the exosomal pathway [29, 30]. ORF3 protein is palmitoylated at cysteine residues in its N-terminal region and is exposed to the cytosolic side of the membrane [31]. The anti-ORF2i antibodies (P1H1, P2H1 and P2H2) mainly displayed a focalized ORF2 staining forming a perinuclear nugget-like structure, whereas the P3H2 and 1E6 antibodies showed a diffuse ER-like ORF2 staining in addition to the perinuclear nugget-like ORF2 staining (Fig. 2a). Of note, P3H2 and 1E6 antibodies recognize the different ORF2 isoforms notably the ORF2g/c forms, which are proteins going through the secretory pathway [7, 10, 19], leading to the diffuse ORF2 staining observed in some cells. Of note, all antibodies also recognized ORF2 proteins from HEV-gt1 (Supplementary data, Fig. S2).

For each antibody, Manders' overlap coefficient (MOC) of either ORF2 staining in ORF3 staining (Fig. 2b, ORF2 in ORF3) or ORF3 staining in ORF2 staining (Fig. 2b, ORF3 in ORF2) was calculated. The ORF3 protein staining highly overlapped with ORF2 for all antibodies, indicating that the ORF3 protein highly colocalizes with the ORF2 proteins (Fig. 2b, MOC ORF3 in ORF2). Moreover, the P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies showed a higher MOC of ORF2 in

ORF3 than that of P3H2 and 1E6, indicating that ORF3 protein mainly colocalizes with the ORF2i protein (Fig. 2b, ORF2 in ORF3). In line with this, super-resolution confocal microscopy analyses of PLC3/HEV cells stained with either P1H1 (ORF2i, Fig. 2c) or P3H2 (ORF2tot, Fig. 2d) showed a total overlap of fluorescence intensities of ORF2i with ORF3 (Fig. 2c), whereas a shift of fluorescence intensities was observed between total ORF2 and ORF3 proteins (Fig. 2d).

PLC3 cells electroporated with an infectious p6 strain in which a V5 tag was inserted into the ORF1 replicase (PLC3/ HEV-ORF1V5, [21]) and double-stained with anti-V5 and P1H1 or anti-ORF3 antibodies (Fig. 2e) also displayed nugget-like structures in which a total overlap of fluorescence intensities of ORF1 with ORF2i (Fig. 2e, upper panel) or ORF1 with ORF3 (Fig. 2e, lower panel) was observed.

Finally, PLC3/HEV and PLC3 mock cells processed for in situ RNAscope hybridization with a probe targeting HEV genomic RNA [21] and stained with P1H1 or anti-ORF3 antibodies (Fig. 2f) demonstrated that viral RNA was also co-distributed with ORF2i (Fig. 2f, upper panel), and ORF3 (Fig. 2f, lower panel) proteins in nugget-like structures in PLC3/HEV cells.



13

Page 13 of 25 615

Fig. 4 Identification of HEV-induced subcellular structures in HEVproducing Huh-7.5 cells. Huh-7.5 cells electroporated with HEV RNA (a–c) and Huh-7.5 cells infected with HEV particles (d, f) were fixed at 6 days p.e and 12 days post-infection, respectively. a, d Cells were next processed for immunostaining with 1E6, P1H1, anti-ORF3 and anti-Rab11 antibodies, as indicated. Red = ORF2; Green = ORF3 or Rab11; Blue = DAPI. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 µm. Manders' overlap coefficients (MOC) of ORF2i (P1H1) staining in ORF3 or Rab11 staining (n ≥ 30 cells) were calculated. b, c, e–f) Cryosections of HEV-producing Huh-7.5 cells were processed for immunogold labeling with 1E6 or P1H1 antibodies (visualized by 6-nm gold particles), as indicated. Cryosections were next analyzed by EM. Vesicular (b, e) and tubular (c, f) structures containing ORF2 proteins are indicated by black arrows. N nucleus

Together, these results indicate that anti-ORF2 antibodies, and more specifically anti-ORF2i antibodies, recognize perinuclear nugget-like ORF2 structures that are in close proximity to ORF3 and ORF1 proteins and viral genome.

We then performed electron microscopy (EM) experiments, using immunogold labeling with P1H1, P2H2, P3H2 and 1E6 anti-ORF2 antibodies (visualized by 6-nm gold particles) of ultrathin cryosections of PLC3/HEV (Fig. 3a) and PLC3 mock (Fig. S3) cells. On cryosections of PLC3/HEV cells, the four antibodies specifically labeled two types of subcellular structures, i.e., tubular structures and vesicular structures (Fig. 3a). Tubular structures displayed a homogeneous diameter of 20-25 nm. They were highly organized, often arranged in compact parallel arrays. Vesicular structures were larger and heterogeneous in size with a diameter of 50-250 nm. Both structures were mostly found in the vicinity of the nucleus and led to a nuclear deformation (Fig. 3a, P3H2, asterisk). In most cells, we observed an extensive membrane network containing tubular and vesicular structures (Fig. 3b, P1H1, P2H2 and 1E6), and in some cells, transverse and longitudinal sections of tubular structures were observed (Fig. 3b, P3H2). These results suggest that the perinuclear ORF2-enriched structures previously observed in confocal microscopy likely correspond to the tubular and vesicular structures observed in EM.

Importantly, confocal analyses of Huh-7.5 cells electroporated with HEV RNA (Fig. 4a) or infected with HEV particles (Fig. 4d) showed that perinuclear nugget-like structures enriched in ORF2i and ORF3 proteins were observed in these cells. In addition, tubular and vesicular structures were identified in EM (Fig. 4b, c and Fig. 4e, f). In contrast, structures were not found in cryosections of mock PLC3 and Huh-7.5 cells (Fig. S3). Together, these results indicate that, during its lifecycle, HEV induces the formation of perinuclear ORF2-enriched ultrastructures in the host cell.

Of note, we have tried to make EM observations under standard fixation and embedding procedures. How- ever, despite numerous observations and in contrast to immunogold labelled cells, we were unable to detect virusinduced ultrastructural changes in the cell sections.

We next performed double immunogold labeling experiments with P1H1 (Fig. 5a) or 1E6 (Fig. 5b) anti-ORF2 (visualized by 6-nm gold particles) and anti-ORF3 (visualized by 10-nm gold particles) antibodies on cryosections of PLC3/ HEV cells. We found a co-distribution of ORF3 and ORF2 proteins in vesicular and tubular structures, supporting the confocal microscopy analyses of ORF2/ORF3 co-localization (Fig. 5a, b).

To further understand which viral determinant is important for the formation of HEV-induced subcellular structures, we transfected PLC3 cells with an ORF3-null mutant (HEV- $\Delta$ ORF3) [15] (Fig. 5c) and an ORF2 assembly mutant (HEV-5R/5A) [10] (Fig. 5d). In the absence of ORF3 protein expression, HEV particle secretion is abolished [15] and ORF2 proteins mainly accumulate in the cytosol (Fig. 5c). In the HEV-5R/5A mutant, the arginine residues of the ARM located in the P1 epitope (Fig. 1a) were replaced by alanine residues and thus prevent recognition by the P1H1 antibody. The 5R/5A mutations lead to an accumulation of ORF2 in the Golgi apparatus (Fig. 5d) and abrogate viral assembly but do not affect ORF3 expression level [10]. Of note, HEV RNA replication is not altered in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 and PLC3/HEV-5R/5A cells [10].

Strikingly, in the absence of ORF3 expression (PLC3/ HEV- $\Delta$ ORF3), cells mainly displayed a diffuse ORF2 staining. In EM, immunogold labeling revealed no vesicular or tubular ORF2-enriched ultrastructures but rather ORF2 proteins associated with regular cellular membranes likely derived from ER/GA compartment (Fig. 5c). In PLC3/HEV-5R/5A cells (Fig. 5d), which were characterized by an accumulation of ORF2 in the Golgi and a redistribution of ORF3 protein in the cytosol, we observed no structures resembling the ORF2/ORF3-enriched ultrastructures as those observed in Fig. 5a, b, but both proteins were distributed in the cytosol close to common intracellular vesicles.

Together, these results indicate that, during its lifecycle, HEV induces the formation of subcellular structures that are likely dependent on a fine interplay between ORF2 and ORF3 proteins. Of note, we did not observe any structures resembling the ORF2/ORF3-enriched ultrastructures in PLC3 cells harboring a tagged-ORF1 replicon (data not shown), indicating that these structures are not induced by HEV replication.

# HEV hijacks the endocytic recycling compartment (ERC)

To further characterize the HEV-induced subcellular structures, we next carried out an extensive immunofluorescence colocalization study of the ORF2i protein with cell pathway markers. Colocalizations were performed with the



13

Fig. 5 HEV-induced subcellular structures are dependent on the expression of ORF3 protein and assembly of ORF2 capsid proteins. At 6 days post-electroporation (d.p.e.), PLC3/HEV (a, b), PLC3/ HEV- $\Delta$ ORF3 (c) and PLC3/HEV-5R/5A (d) cells were fixed, permeabilized with cold methanol and TX-0.5% and double-stained with P1H1 (a) or 1E6 (b-d) and anti-ORF3 antibodies. Red = ORF2; Green = ORF3; Blue = DAPI. Staining was analyzed by confocal microscopy. Manders' overlap coefficients (MOC) of the ORF3 labeling in the ORF2 labeling were calculated on at least 30 cells. Line graphs show the fluorescence intensities of ORF2 and ORF3 staining measured every 200 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown above. Scale bar, 20 µm. Cryosections of indicated cells were processed for double immunogold labeling with anti-ORF2 (visualized by 6-nm gold particles) and anti-ORF3 (visualized by 10-nm gold particles) antibodies, as indicated. Cryosections were next analyzed by EM. ORF2 proteins are indicated by black arrows and ORF3 proteins by arrowheads. N nucleus. Scale bars show the indicated length

P1H1 anti-ORF2i antibody and antibodies directed against markers of cytoskeleton (β-tubulin and MTOC), secretory pathway (Calnexin and ERGIC 53), early endosomes (EEA1 and Rab5), late endosomes / multivesicular bodies (MVB) (Rab9a, CD81 and CD63), Endocytic Recycling Compartment (ERC) (Rab11, CD71, EHD1, MICAL-L1 and PAC-SIN2), peroxisome (PMP70 and Catalase), mitochondria (TOM-20) and lysosome (LAMP1) (Fig. 6a, b and Fig. S4). Colocalizations were quantitatively analyzed by calculating the MOC (Fig. 6a). As shown in Fig. 6a, b, the ORF2i protein significantly co-distributes with markers of two different cell compartments, i.e., the late endosomes and the ERC. Indeed, the MOCs of ORF2i with Rab9a, CD81 and CD63 were 0.44, 0.55 and 0.37, respectively, indicating a medium colocalization between ORF2i and these cellular markers. Rab9a belongs to a class of small Rab GTPases which are effector proteins promoting exchanges between the late endosome pathway and the trans Golgi network (TGN) [32, 33], whereas CD81 and CD63 are tetraspanins found in MVB, which are a compartment belonging to the late endosome pathway.

On the other hand, ORF2i strongly colocalized with cell markers of the ERC. This compartment is the keystone of the slow cellular recycling pathway. The ERC plays major roles in cellular metabolism and is subverted during infection by many pathogens such as viruses [34, 35]. The ERC constitutes a collection of tubular organelles that are close to the nucleus and is defined by the presence of the Rab11 GTPase and its effectors. Rab11 regulates recycling from the ERC and transport of cargo from the TGN to the plasma membrane [36–39]. Strikingly, ORF2i and Rab11 showed a MOC of 0.86 (Fig. 6a), indicating a strong colocalization. Indeed, super-resolution confocal microscopy analyses showed a total overlap of fluorescence intensities between ORF2i and Rab11 (Fig. 6c). Moreover, detection of HEV RNA and Rab11 in PLC3/HEV cells demonstrated that viral RNA and Rab11 co-distribute in nugget-like structures

(Fig. 7). Of note, ORF2i and Rab11 were also co-distributed in Huh-7.5 cells electroporated with HEV RNA (Fig. 4a) or infected with HEV particles (Fig. 4d).

ORF2i also strongly colocalized with CD71 (MOC = 0.78) (Fig. 6a), the transferrin receptor that is a reference marker for the ERC[40]. This observation was further confirmed by high-resolution microscopy (Fig. 6d).

Efficient recycling via the ERC relies on the integrity of a complex network of elongated, non-symmetrical endosomes known as tubular-recycling endosomes (TRE). A family of proteins known as the C-terminal Eps15 homology domain (EHD1-4) proteins and EHD-interaction partners such as MICAL-L1 (Molecule Interacting with CasL-like1) and PACSIN2/Syndapin2, are involved in TRE biogenesis and control membrane recycling. Although ORF2i only displayed a weak co-localization with EHD1 (MOC = 0.28), it colocalized with MICAL-L1 (MOC = 0.49) and PAC-SIN2 (MOC = 0.63) (Fig. 6a). The colocalization of ORF2i with MICAL-L1 was further confirmed by high-resolution microscopy but showed a small shift of fluorescence intensities (Fig. 6e), indicating that they are in close proximity to each other. Altogether, our data suggest that HEV likely subverts effectors of the cellular recycling machinery.

On the other hand, although ORF2i did not colocalize with the MTOC (Fig. 6a), ORF2i-enriched structures were found in close proximity of the organizing center (Fig. S4). Of note, it has been shown that the MTOC and the ERC are two distinct structural entities closely related promoting endosomal trafficking [41].

As shown for Rab11, CD71 and MICAL-L1, colocalization analyses in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells, indicated that, in the absence of ORF3 expression, ORF2i no longer colocalizes with these cell markers (Fig. 6b). These results are in line with our above-described observations on the importance of the ORF3 protein in the formation of HEVinduced subcellular structures (Fig. 5). Although some cellular markers were enriched in the HEV-induced subcellular structures (i.e. CD81 and Rab11), staining of mock electroporated PLC3 cells (PLC3 mock) (Fig. S5) showed similar subcellular localizations of other cell markers as in PLC3/HEV and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells (Fig. 6), indicating that HEV infection does not induce a general cell marker redistribution.

To strengthen our previous observations, we next performed a kinetics of colocalization with the P1H1 anti-ORF2i antibody and fluorochrome-conjugated transferrin in PLC3/HEV and PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells (Fig. 8). It has been shown that Transferrin (TrF) first binds to its receptor (CD71) at the cell membrane and then enters the cell through clathrin-mediated endocytosis. Once in the early endosomes, TrF-CD71 complexes return back to the cell surface through either a fast route going directly back to the plasma membrane, or a slower route delivering TrF-CD71



Fig. 6 Colocalization analysis of the ORF2i protein with different cell markers. PLC3/HEV and PLC3/HEV-∆ORF3 cells were fixed, permeabilized with methanol and TX-0.5% and double-stained with P1H1 and anti-cell markers antibodies, as indicated. a Manders' overlap coefficients (MOC) of ORF2 and cell marker labeling (n > 30)cells). Co-staining showing a low MOC are in light grey and those showing a medium MOC are in middle grey. Co-staining of PLC3/ HEV cells showing a MOC > 0.4 are in dark grey and representative confocal images are shown in (b, Top). The co-staining of PLC3/ HEV-ΔORF3 cells with P1H1 and antibodies directed against markers of recycling compartment are also shown in (b, Bottom). Staining was analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 µm. PLC3/ HEV cells double-stained with P1H1 and anti-Rab11 (c), anti-CD71 (d) or anti-MICAL-L1 (e) antibodies were next analyzed by confocal microscopy with a high-resolution Airyscan module. On the top, volume rendering of the 3D z-stacks (Surfacing) using Imaris is shown to better visualize the stained substructures. In the middle, z-stacks are shown. On the bottom, line graphs show the fluorescence intensities of ORF2i and Rab11/CD71/MICAL-L1 staining measured every 50 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the bottom left of each panel. Scale bars show the indicated length. Red=ORF2; Green=cell marker; Blue = DAPI

complexes to the ERC before they are trafficked back to the cell surface [40]. In PLC3/HEV cells, the colocalization between transferrin and ORF2i readily increased over time and reached a MOC of 0.70 after 45 min (Fig. 8a), a value similar to that found in Fig. 6a for its receptor. In contrast, in PLC3/HEV- $\Delta$ ORF3 cells, transferrin and ORF2i showed a reduced colocalization (MOC = 0.4), (Fig. 8b). Thus, during the HEV lifecycle, the ORF2i protein with the help of ORF3 protein associates with a functional ERC compartment.

We carried out double immunogold labeling experiments by combining anti-ORF2 (visualized by 10 nm gold particles) with anti-Rab11 or anti-CD71 (visualized by 6-nm gold particles) antibodies, and anti-ORF3 (10 nm) with anti-CD81 (6 nm) antibodies on cryosections of PLC3/HEV (Fig. 9) and PLC3 mock (Fig. S6) cells. In PLC3/HEV cells, we found a co-distribution of ORF2 with Rab11 and CD71 and a co-distribution of ORF3 with CD81 in vesicular and tubular structures, supporting our confocal microscopy analyses. These results indicate that the HEV-induced vesicular and tubular structures likely derive from ERC and TRE compartments. Moreover, the detection of the transmembrane proteins CD71 and CD81 confirms the presence of membranes in vesicular and tubular structures.

The detection of ORF2i and ORF3 proteins, which are both key players in eHEV biogenesis [7, 10, 42], as well as the ORF1 replicase and HEV RNA in subcellular structures containing Rab11, CD71 and CD81 (a tetraspanin present on the quasi-envelope of eHEV [43]) suggests that the ORF2enriched ultrastructures we identified likely correspond to eHEV viral factories. In line with this, P1H1, P2H2, P3H2 and 1E6 anti-ORF2 immunolabeling on cryosections of PLC3/HEV cells revealed viral-like particles of ~ 25 nm in diameter in the ORF2-enriched membranous compartments (Fig. 10).

#### The ERC plays a central role in the HEV lifecycle

To confirm that the ERC plays a central role in the HEV lifecycle, we conducted functional studies. PLC3/HEV cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting Rab11a and Rab11b isoforms (siRab11) or non-targeting siRNA (siCTL) (Fig. 11). The effect of Rab11 silencing on intracellular ORF2 expression was analyzed by IF (Fig. 11a) and WB (Fig. 11b). The effect of Rab11 silencing on viral production was analyzed by quantification of secreted viral RNA (Fig. 11c) and infectious titers (Fig. 11d). The effect of Rab11 silencing on genome replication was analyzed by using PLC3 cells stably harboring a subgenomic replicon (Fig. 11e).

Although Rab11 silencing did not affect the ORF2 expression level, we found that it abrogated the formation of nugget-like structures to the benefit of ORF2-enriched stringy structures mostly localized around the nucleus. These stringy structures did not co-distribute with ORF3, CD71 nor MICAL-L1, which display a more diffuse pattern upon Rab11 silencing (Fig. 11a). Moreover, extracellular RNA levels and infectious titers were reduced in siRab11transfected PLC3/HEV cells, as compared to control cells (NT and siCTL) (Fig. 11c, d). Although no effect of siRab11 on HEV replication was observed (Fig. 11e), infectious titers showed a significant reduction (i.e., 70%) in intracellular progeny (Fig. 11d), indicating that disruption of the ERC by Rab11 silencing impairs HEV particle assembly. Altogether, these results confirm that the hijacking of the recycling compartment by HEV is pivotal for producing viral particles.

#### Discussion

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

Previously, we and other demonstrated that during HEV infection, different isoforms of the ORF2 capsid protein are secreted [7, 8]. Indeed, by combining the gt3 p6 strain [20] and the highly transfectable PLC3 cells, we identified 3 forms of the ORF2 capsid protein that perform distinct functions in the HEV lifecycle and display different sequences, post-translational modifications and subcellular localization [7, 19]. The ORF2i form is the component of infectious particles and derives from the assembly of intracellular ORF2i protein [10]. The ORF2i protein is not glycosylated, and its sequence starts at Leu14 corresponding to the middle of the signal peptide (Fig. 1a). Although it has been shown



Fig. 7 Co-distribution of HEV RNA and Rab11 in PLC3/HEV cells. PLC3/HEV and PLC3 mock cells were grown on coverslips, fixed at 3 d.p.e. and processed for in situ RNAscope hybridization. Cells were stained with a probe targeting HEV genomic RNA (RNA, red) and anti-Rab11 antibody (Rab11, green). Line graphs show the fluores-

cence intensities of RNA and Rab11 staining measured every 70 nm across the region of interest highlighted by the white line in the micrograph shown on the left. Nuclei are in blue. Scale bar, 20  $\mu$ m. Manders' overlap coefficient (MOC) of the RNA labeling in the Rab11 labeling was calculated on at least 30 cells

that ORF2i protein might be produced from an additional start codon [8], we recently found that an arginine-rich motif (ARM) located in the ORF2 N-terminal region regulates the dual topology and functionality of ORF2 signal peptide, leading to the production of either the cytosolic infectious ORF2i that is not processed by the signal peptidase or the ORF2g/c forms that are generated by translocation into the ER lumen [10]. The glycosylated ORF2g/c forms, which are not associated with infectious virions and likely act as immunological baits [7, 8], are produced by translocation of ORF2 proteins into the secretory pathway where they are highly glycosylated [19], cleaved by furin [10], and quickly secreted [7, 8]. Here, we capitalized on these distinctive features to generate and characterize four anti-ORF2 monoclonal antibodies, including three antibodies (P1H1, P2H1 and P2H2) directed against the ORF2i form and one antibody (P3H2) directed against the different ORF2 isoforms (Fig. 1). Analyses by WB and IP of HEV-infected cell lysates showed that the four antibodies equally recognize the intracellular ORF2 proteins. In contrast, analyses on HEV-infected cell supernatants, which contain some ORF2i proteins but also huge amounts of ORF2g/c proteins, demonstrated that the P1H1, P2H1 and P2H2 antibodies specifically recognize the ORF2i protein without cross-reaction with the glycosylated ORF2 forms. Importantly, we found that the P1H1 antibody recognizes non-lipid-associated HEV particles from cell culture and patient sera. Therefore, the P1H1 antibody might represent a good candidate for diagnosis purposes. More generally, the antibodies that we generated in this study represent unique tools for deciphering the biogenesis mechanisms of ORF2 isoforms and their precise functions in the HEV lifecycle.

Structure of the ORF2 N-terminal domain has not been resolved yet. It is not included in most of the recombinant constructs that have yielded structural data, and it is disordered in the single structure of full-size particle available [25]. However, based on its potential interaction with RNA and its N-terminal location to the innermost S (shell) domain, this N-terminal domain is thought to be orientated toward the inner cavity of particles. In our study, we found that the P1H1 antibody that recognizes the N-terminal domain of ORF2 (Fig. 1a) efficiently captures delipidated HEV particles (Fig. 1d-f). Although we cannot exclude that the P1H1 antibody recognizes partially assembled ORF2i proteins, our results suggest that the P1 epitope might be exposed on the viral surface. Our structural models showed that this is readily possible (Fig. 1g and h): at least some N-termini may reach as high as or higher than the outer P (protruding) domain and display the P1 epitope, while keeping most other arginine residues directed toward the capsid interior. In addition, we recently found that the ARM located in the ORF2 N-terminal region promotes ORF2 membrane association that is likely essential for particle assembly [10]. Therefore, we hypothesize that the ORF2 N-terminus is associated with eHEV-enveloping lipids and removal of lipids by detergent treatment unmasks ORF2 N-terminal epitopes, including the P1 epitope.

In the present study, we identified by confocal microscopy some HEV-induced subcellular structures that are enriched in viral components. We found that ORF2 and ORF3 proteins highly co-localize in these structures in HEV-producing and HEV-infected cells. Thanks to the P1H1 antibody that specifically recognizes the particle-associated ORF2i protein, we demonstrated that ORF2i and ORF3 proteins are





5

15

10

Time (min)

30

45

0.0

ò

1

the P1H1 antibody. Staining was analyzed by confocal microscopy. Red = ORF2; Green = transferrin; Blue = DAPI. Scale bar, 20 µm. Manders' Overlap Coefficients (MOC) of ORF2 staining in TrF staining  $(n \ge 50 \text{ cells})$  were calculated at each time point

5

10

Time (min)

0.0

ò

30

15

45



**Fig. 9** EM analysis of the co-distribution of ORF2 and ORF3 proteins with cell markers. Cryosections of PLC3/HEV cells were processed for double immunogold labeling with 1E6 or anti-ORF3 (visualized by 10-nm gold particles) and anti-Rab11, anti-CD71 or

anti-CD81 (visualized by 6 nm gold particles) antibodies, as indicated. Cryosections were next analyzed by EM. ORF2 and ORF3 proteins are indicated by black arrows and cell markers by arrowheads

which are found partitioned in different subcellular com-

partments. The glycosylated ORF2 forms go through the

tightly co-distributed in perinuclear nugget-like structures, as well as with the ORF1 replicase and HEV RNA. Interestingly, these structures were not observed in cells harboring a HEV replicon nor in cells expressing only the ORF1 replicase [21], indicating that these structures, although containing ORF1 and viral RNA, are not linked to viral replication. In contrast, we found that in the absence of ORF3 expression, the ORF2i protein was redistributed in cytosolic dot-like structures, and in the absence of ORF2 assembly, the ORF3 protein was also redistributed through the cytosol, suggesting that ORF2i and ORF3 proteins are likely in tight connection and involved in the formation of the perinuclear nugget-like structures.

The ORF2 subcellular localization has been studied in heterologous systems and found in different cell compartments, i.e., plasma membrane, ER and cytoplasmic compartment [44, 45]. Later on, ORF2 characterization in infectious systems led to the identification of the ORF2 isoforms, secretory pathway. The ORF2i form is mainly present in the cytosolic compartment but is also translocated into the nucleus of infected cells [10, 19, 46]. Here, thanks to the specificity of our antibodies, notably the P1H1 antibody, we performed an extensive colocalization study of ORF2i proteins with different cell markers. Of note, as immunofluorescence analysis of ORF2 expression was performed at 6 days p.e., the nuclear localization of the protein could not be shown here as nuclear translocation was reported to occur at early time points p.e. (i.e., 18 h p.e.) [10, 19]. In accordance with previous studies [29, 47], we found a partial colocalization of ORF2i with late endosome markers notably with the tetraspanin CD81, a marker of MVB and exosomes. Importantly, we identified a strong colocalization of ORF2i with several markers of the recycling compartment, including Rab11 and CD71. The subcellular localization of ORF2i



Fig. 10 Visualization of intracellular HEV like-particles. Cryosections of PLC3/HEV cells were immunogold-labeled with the indicated antibodies and analyzed by EM

was disturbed in the absence of ORF3 expression and upon Rab11 silencing. These results indicate that ORF3 is likely involved in the process of ORF2i addressing to the ERC.

A recent study showed that ORF3 is palmitoylated at cysteine residues in its N-terminal region and is exposed to

the cytosolic side of the intracellular membranes [31]. It has also been localized in early and recycling endosomes [48] as well as in MVB [29] and has been found in association with microtubules [49, 50]. Hence, ORF3 may behave as a cargo able to drive ORF2 to HEV factories.



Fig. 11 Effect of Rab11 silencing on protein expression and HEV particle secretion. a-d PLC3/HEV cells were transfected with siRNA targeting Rab11a and Rab11b (siRab11), with a non-targeting siRNA control (siCTL) or left non-transfected (NT). Non-electroporated PLC3 cells were used as controls (Mock). At 72 h post-transfection, cells were analyzed by IF (a) and WB (b) using the indicated antibodies. Staining were analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 µm. Red = ORF2i stained by P1H1; Green = ORF3 or cell marker; Blue = DAPI. Manders' overlap coefficients of ORF2i staining in ORF3, Rab11, CD71 or MICAL-L1 staining were calculated. c Quantification of HEV RNA in SN of transfected cells was per-

The ORF1 protein is the viral replicase, the ORF2i protein is the structural subunit of HEV virion, and the ORF3 protein plays an essential role in exosomal release and acquisition of the quasi-envelope around the neo-synthesized viral

formed by direct RT-qPCR (SN) and after IP with the P1H1 antibody (qIP-P1H1). **d** Production of extracellular and intracellular infectious particles in transfected cells was evaluated by viral titration. **e** PLC3 cells stably replicating a p6 subgenomic replicon were transfected with siRNAs as described above. At 72 h post-transfection, intracellular HEV RNA was quantified by RT-qPCR. Mock cells were used as a negative control. PLC3 cells harboring the replicon and treated with 20  $\mu$ M of sofosbuvir were used as a positive control for replication inhibition. Values are means from three independent experiments (n = 3, mean  $\pm$  S.D., Kruskal–Wallis with Dunn's test), \*\*p < 0.01

particles. Here, we showed that the 3 viral proteins as well as the genomic RNA were co-distributed in HEV-producing cells in a cellular compartment probably derived from the ERC. Our findings strengthen the hypothesis of a close
connection between HEV replication and assembly sites [51]. However, although ORF1 and RNA were detected, the identified structures are not required for HEV replication, as demonstrated by Rab11 silencing. Therefore, we hypothesize that the observed structures represent viral factories in which viral components are in close proximity and assemble into particles which acquire their membrane through an ORF2-ORF3 interaction.

Ultrastructural analyses by EM of cryosections of HEVreplicating cells showed that the ORF2/ORF3-enriched structures correspond to a network of vesicular and tubular components located in the vicinity of the nucleus and in which Rab11, CD71 and CD81 were found. On the one hand, tubular structures formed regular parallel arrays and displayed a homogeneous diameter of 20-25 nm, corresponding to that of intracellular HEV-like particles observed in cryosections. On the other hand, vesicular structures were heterogeneous in their organization and their size, i.e., 50-250 nm, and displayed some viral-like particles. Although we cannot exclude that the tubular structures correspond to a dead-end pathway containing viral and cellular proteins, we speculate that these structures might correspond to virion precursors containing assembled or pre-assembled virions while vesicular structures might correspond to a later compartment of HEV virion assembly. It should be noted that vesicular and tubular structures were found in both PLC3/HEV and Huh-7.5/HEV cells, indicating that they are not cell type specific. Furthermore, we found the same structures in HEV-infected Huh-7.5 cells, indicating that they do not correspond to an artifact of cell electroporation. Although difficult to set up, it would be interesting to analyze these structures in correlative microscopy approaches as well as to find out if this kind of structures form in a heterologous expression system and in other infectious models such as gt1 replicating cells or in HEV-infected primary cells.

ERC is involved in several stages of the lifecycle of a number of DNA and RNA viruses, with Rab11 being a central player in most of these processes [35]. ERC notably mediates viral transport, assembly and egress, e.g., it is involved in the envelopment of herpes simplex-1 capsids [52] or contributes to the transport of HCV virions towards the plasma membrane [53]. Here, we demonstrated that HEV particle assembly depends on a functional ERC. Interestingly, it has been shown that ERC hijacking is associated with membrane remodeling upon infection. Cholesterol accumulates at the ERC during Influenza A virus (IAV) infection, or Rab11 redistributes from dot structures to large aggregates during infection with several viruses including IAV [35]. Ultrastructural changes of these ERC membrane remodeling were poorly investigated to date. In our study, we demonstrated that HEV is a new candidate in the list of viruses hijacking the ERC. Importantly, we found that viral proteins and recycling compartment markers are

co-distributed in perinuclear structures found in ultrastructural analyses as a network of vesicular and tubular structures. To our knowledge, this kind of structures has never been described before and might be the hallmark of HEV infection.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00018-022-04646-y.

**Acknowledgements** We thank Suzanne U. Emerson (NIH, USA), Jérôme Gouttenoire (University of Lausanne) and Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg) for providing us with reagents. We thank Valentin de Masson d'Autume for his technical contribution. We thank Raphaël Guérois for sharing a standalone ColabFold implementation of AlphaFold2 and the I2BC integrative bioinformatics core facility BIOI2 for assistance with the high-performance computing infrastructure.

Authors contributions All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, experiments, data collection and analyses were performed by CB, KH, CM, CC, MF, JB-G, SB, KM, MA, JR, YR, JD, PR, C-MA-D and LC. EW, NLL, JM, CD and AG contributed to reagents or analytic tools. The first draft of the manuscript was written by LC, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This work has been funded by Inserm Transfert (MAT- PI-17006), Pasteur Institute of Lille (DiagHepE), Région Hauts-de-France (DiagHepE), Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, les hépatites virales et les Maladies Infectieuses Emergentes (ANRS-MIE) and the University of Tours. Cyrine Bentaleb, Kévin Hervouet and Maliki Ankavay were supported by a fellowship from the ANRS-MIE. Charline Camuzet and Martin Ferrié were supported by the Pasteur Institute of Lille and Région Hauts-de-France. Charline Camuzet was also supported by Inserm Transfert.

**Data availability** The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Declarations

**Conflict of interest** Claire Montpellier, Jean Dubuisson and Laurence Cocquerel are coinventors of two patent applications on the use of antibodies having specificity for the ORF2i protein for HEV diagnostic purposes. Patents have been filed by Inserm Transfert. Julien Roux and Clarence Deffaud are employees of the BIOTEM company. The authors have no other financial or non-financial interests to disclose.

**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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

#### References

- Kamar N, Izopet J, Pavio N et al (2017) Hepatitis E virus infection. Nat Rev Dis Primers 3:17086. https://doi.org/10.1111/trf. 13355
- Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N (2016) Zoonotic hepatitis E virus: classification animal reservoirs and transmission routes. Viruses 8:270. https://doi.org/10.3390/v8100270
- Horvatits T, Wiesch JS, zur, Lütgehetmann M, et al (2019) The clinical perspective on hepatitis E. Viruses 11:617–619. https:// doi.org/10.3390/v11070617
- 4. Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y et al (2016) Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. Gastroenterology 150:355–7.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048
- Aslan AT, Balaban HY (2020) Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. World J Gastroentero 26:5543–5560. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543
- Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A (2018) Hepatitis E virus: advances and challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 15:96–110. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150
- Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM et al (2018) Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. Gastroenterology 154:211-223.e8. https://doi.org/10. 1053/j.gastro.2017.09.020
- Yin X, Ying D, Lhomme S et al (2018) Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 3:201721345–201721346. https://doi. org/10.1073/pnas.1721345115
- Sayed IM, Verhoye L, Montpellier C et al (2019) Hepatitis E virus (HEV) open reading frame 2 antigen kinetics in humanliver chimeric mice and its impact on HEV diagnosis. J Infect Dis 220:811–819. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz171
- Hervouet K, Ferrié M, Ankavay M et al (2022) An argininerich motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis e virus lifecycle and interactions with the host cell. PLoS Pathog 18:e1010798. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798
- Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E (2019) Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. Antiviral Res 163:34– 49. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.007
- Ju X, Ding Q (2019) Hepatitis E virus assembly and release. Viruses 11:539–613. https://doi.org/10.3390/v11060539
- Harak C, Lohmann V (2015) Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. Virology 479:418–433. https:// doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.029
- Talmont F, Moulédous L, Baranger M et al (2019) Development and characterization of sphingosine 1-phosphate receptor 1 monoclonal antibody suitable for cell imaging and biochemical studies of endogenous receptors. PLoS ONE 14:e0213203-e213219. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213203
- Graff J, Nguyen H, Yu C et al (2005) The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. J Virol 79:6680–6689. https://doi.org/10.1128/jvi.79.11.6680-6689.2005
- Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD et al (1999) Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. J Virol 73:6235–6244
- Oren R, Takahashi S, Doss C et al (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol 10:4007. https://doi.org/10.1128/ mcb.10.8.4007
- Blight KJ, Mckeating JA, Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. J Virol 76:13001–13014. https://doi.org/10.1128/jvi.76.24. 13001-13014.2002

- Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM et al (2019) New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. Sci Rep 9:6243. https://doi.org/10.1038/ s41598-019-42737-2
- Shukla P, Nguyen HT, Faulk K et al (2012) Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. J Virol 86:5697–5707. https://doi.org/10.1128/jvi.00146-12
- Metzger K, Bentaleb C, Hervouet K et al (2022) Processing and subcellular localization of the hepatitis E virus replicase: identification of candidate viral factories. Front Microbiol 13:828636. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828636
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH et al (2006) A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods 131:65–71. https:// doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004
- Jumper J, Evans R, Pritzel A et al (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596:583–589. https:// doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2
- Gabler F, Nam S, Till S et al (2020) Protein sequence analysis using the MPI bioinformatics toolkit. Curr Protoc Bioinform 72:e108. https://doi.org/10.1002/cpbi.108
- Xing L, Li TC, Mayazaki N et al (2010) Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. J Biol Chem 285:33175–33183. https://doi.org/10.1074/ jbc.m110.106336
- Wang F, Flanagan J, Su N et al (2012) RNAscope a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn 14:22–29. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx. 2011.08.002
- Liu D, Tedbury PR, Lan S et al (2019) Visualization of positive and negative sense viral RNA for probing the mechanism of direct-acting antivirals against hepatitis C virus. Viruses 11:1039. https://doi.org/10.3390/v11111039
- Ding Q, Heller B, Capuccino JMV et al (2017) Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. Proc Natl Acad Sci USA. https://doi.org/10.1073/pnas. 1614955114
- 29. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M et al (2014) Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. J Gen Virol 95:2166–2175. https://doi.org/10.1099/vir.0.066910-0
- Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, et al (2011) A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. J Gen Virol 92:269–278. https://doi. org/10.1099/vir.0.025791-0
- Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L et al (2018) Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. PLoS Pathog 14:e1007471–e1007524. https://doi.org/10.1371/journal.ppat. 1007471
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA et al (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. Embo J 12:677–682. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993. tb05701.x
- Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. Physiol Rev 91:119–149. https:// doi.org/10.1152/physrev.00059.2009
- Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 5:121–132. https://doi.org/10.1038/nrm1315
- Vale-Costa S, Amorim M (2016) Recycling endosomes and viral infection. Viruses 8:29–64. https://doi.org/10.3390/v8030064
- Ullrich O, Reinsch S, Urbé S et al (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. J Cell Biology 135:913–924. https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.913

- Stone R, Hayashi T, Bajimaya S et al (2016) Critical role of Rab11a-mediated recycling endosomes in the assembly of type I parainfluenza viruses. Virology 487:11–18. https://doi.org/10. 1016/j.virol.2015.10.008
- Bhuin T, Roy JK (2015) Rab11 in disease progression. Int J Mol Cell Med 4:1–8
- Guichard A, Nizet V, Bier E (2014) RAB11-mediated trafficking in host–pathogen interactions. Nat Rev Microbiol 12:624–634. https://doi.org/10.1038/nrmicro3325
- Mayle KM, Le AM, Kamei DT (2012) The intracellular trafficking pathway of transferrin. Biochimica et Biophysica Acta BBA 1820:264–281. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.009
- Hehnly H, Chen C-T, Powers CM et al (2012) The centrosome regulates the Rab11- dependent recycling endosome pathway at appendages of the mother centriole. Curr Biol 22:1944–1950. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.022
- Yang Y-L, Nan Y-C (2021) Open reading frame 3 protein of hepatitis E virus: multi-function protein with endless potential. World J Gastroenterol 27:2458–2473. https://doi.org/10.3748/wjg.v27. i20.2458
- Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T et al (2017) Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. J Virol. https://doi.org/10.1128/ jvi.00822-17
- Surjit M, Jameel S, Lal SK (2007) 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. https://doi.org/10.1128/jvi.02039-06
- 45. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R et al (1999) Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. J Virol 73:4074–4082
- Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M et al (2017) Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. J Hepatol 67:471–479. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002

- 47. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S et al (2011) Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. J Gen Virol 92:2838–2848. https://doi.org/10.1099/vir.0.035378-0
- Chandra V, Kar-Roy A, Kumari S et al (2008) The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. J Virol 82:7100–7110. https://doi.org/10.1128/jvi.00403-08
- Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S (1997) The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. J Virol 71:9045–9053
- Kannan H, Fan S, Patel D et al (2009) The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. J Virol 83:6375–6382. https://doi.org/ 10.1128/jvi.02571-08
- Szkolnicka D, Pollán A, Silva ND et al (2019) Recombinant hepatitis E viruses harboring tags in the ORF1 protein. J Virol 93:1237–1318. https://doi.org/10.1128/jvi.00459-19
- Hollinshead M, Johns HL, Sayers CL et al (2012) Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. EMBO J 31:4204–4220. https://doi. org/10.1038/emboj.2012.262
- Coller KE, Heaton NS, Berger KL et al (2012) Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. Plos Pathog 8:e1002466. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002466

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 3 – "The AP-1 adaptor complex drives intracellular trafficking and assembly of the infectious ORF2 capsid protein of Hepatitis E Virus"

1	The AP-1 adaptor complex drives intracellular trafficking and assembly of the
2	infectious ORF2 capsid protein of Hepatitis E virus
3	
4	Martin Ferrié <sup>1</sup> , Virginie Alexandre <sup>1</sup> , Claire Montpellier <sup>1</sup> , Peggy Bouquet <sup>2</sup> , Maliki Ankavay <sup>1,3</sup> , Cyrine
5	Bentaleb <sup>1</sup> , Jean Dubuisson <sup>1</sup> , Cécile-Marie Aliouat-Denis <sup>1</sup> , Yves Rouillé <sup>1</sup> , Laurence Cocquerel <sup>1,*</sup>
6	
7	
8	<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL- Center for
9	Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.
10	<sup>2</sup> Unit of Clinical Microbiology, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France
11	<sup>3</sup> Present address: Division of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Microbiology, Lausanne,
12	Switzerland.
13	
14	*Correspondence : Dr Laurence Cocquerel; <u>laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr</u>
15	
16	Keywords : Hepatitis E virus, ORF2 capsid protein, Infectious ORF2, Addressing, Viral factories, AP-1
17	complex, Clathrin, PHHs
18	
19	
20	
21	

#### 1 Abstract

2

3 Although the HEV is an emerging global health burden, little is known about its interaction with the host 4 cell. HEV genome encodes the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 viroporin. We 5 have previously shown that HEV produces different forms of the ORF2 protein, namely the ORF2i 6 protein, which is the structural component of viral particles, and the ORF2g/c proteins, which are 7 massively secreted but not associated with infectious material. The latter likely act as immune decoys 8 that interfere with antibody-mediated neutralization. More recently, we have identified the endocytic 9 recycling compartment (ERC) as a viral factory where ORF1, ORF2i, ORF3 and viral RNA accumulate. 10 However, little is known about the host determinants involved in the subcellular shuttling of viral proteins 11 to viral factories. Here, we demonstrate that the AP-1 adaptor complex colocalizes and interacts with 12 the ORF2i protein using an in-house anti-ORF2i monoclonal antibody in a proximity ligation assay, co-13 immunoprecipitation and confocal microscopy experiments in HEV-gt1 and -gt3 producing/infected 14 cells. The AP-1 complex belongs to the family of adaptor proteins and is a tetrameric complex involved 15 in vesicular transport between the trans-Golgi network and late/recycling endosomes. This complex is 16 an important host factor involved at different stages of the lifecycle of many viruses, such as HIV, SARS-17 CoV-2 or Varicella-Zoster virus. The viral protein/AP-1 interaction can have a variety of implications, 18 from promoting viral infectivity to evading host immune responses. In this study, we demonstrate that 19 pharmacological inhibition of the AP-1 complex or silencing of its v1 subunit disrupts this interaction, 20 prevents ORF2i protein localization in viral factories and reduces viral production in hepatocytes. This 21 study identified for the first time a host factor involved in the addressing of HEV proteins (i.e. ORF2i 22 protein) to viral factories.

1	Abb	previ	iatio	ons
1	Abb	previ	iatio	ons

2		
3	AP	Adaptor protein complex
4	AP-1	Adaptor protein complex 1
5	ARM	Arginine-rich motif
6	CTL	Control
7	d.p.e	Days post-electroporation
8	d.p.i	Days post-infection
9	EM	Electron microscopy
10	ERC	Endocytic recycling compartment
11	GRP78	78kDa glucose-regulated protein
12	Gt	Genotype
13	HD	Heat denatured
14	HEV	Hepatitis E virus
15	HIV	Human immunodeficiency virus
16	IF	Immunofluorescence
17	IP	Immunoprecipitation
18	lso	Isotype control
19	M6PR	Mannose-6-phosphate receptor
20	MOC	Mander's overlapping coefficient
21	NT	Non-transfected
22	ORF	Open reading frame
23	ORF2c	Cleaved ORF2
24	ORF2g	Glycosylated ORF2
25	ORF2i	Infectious ORF2
26	PHHs	Primary human hepatocytes
27	PLA	Proximity ligation assay
28	RBV	Ribavirin
29	ROI	Region of interest
30	SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2
31	siRNA	Small interfering RNA
32	SN	Supernatant
33	Sof	Sofosbuvir
34	STX6	Syntaxin-6
35	TGN	Trans-golgi network
36	TGN46	Trans-Golgi network 46kDa protein
37	WB	Western-blotting
38		

- 1 Introduction
- 2

3 Hepatitis E virus (HEV) is a positive-strand RNA virus classified in the Paslahepevirus genus within the 4 Hepeviridae family (Purdy et al., 2022). It represents the most common cause of acute viral hepatitis 5 worldwide (WHO, 2022). Human individuals can be infected by five distinct genotypes (gt), belonging to 6 a single serotype. HEV gt1 and gt2 are restricted to humans and are responsible for waterborne 7 outbreaks in resources limited settings. HEV gt3, gt4, gt7 mainly form a foodborne porcine zoonosis due 8 to consumption of undercooked meat foodstuffs in industrialized countries (Kamar et al., 2017; Si et al., 9 2023). Whilst hepatitis E infection predominantly triggers an asymptomatic and self-limiting disease, gt1 10 infection can lead to fulminant liver failure, especially in pregnant women. Gt3 infection can cause 11 chronic disease in immunosuppressed patients. Moreover, chronic and acute HEV infections are 12 associated with extrahepatic manifestations such as neurological disorders, kidney injuries or impaired 13 renal function (Lhomme et al., 2020; Pischke et al., 2017). Currently, there is no specific treatment or 14 universal vaccine available.

15 HEV genome encodes three proteins: the ORF1 replicase, the ORF2 capsid protein and the ORF3 16 protein involved in particles egress (Nimgaonkar et al., 2018). Previously, we and others demonstrated 17 that during the HEV lifecycle, at least three forms of the ORF2 capsid protein are produced (Montpellier 18 2018, Yin 2018) : (i) the non-infectious glycosylated ORF2g form (also named ORF2s (Yin et al., 2018)) 19 is produced in large amounts in cell culture supernatant and is the most abundant antigen in patient 20 sera (Montpellier et al., 2018; Bentaleb et al., 2022), (ii) the ORF2c form, derived from ORF2g cleavage 21 (Ankavay, 2019), is found in patient sera and cell culture supernatant (Montpellier et al., 2018). Both 22 ORF2g and ORF2c forms (herein designated as ORF2g/c) presumably act as humoral decoys inhibiting 23 antibody-mediated neutralization (Yin et al., 2018), (iii) the infectious ORF2i (also named ORF2c (Yin et 24 al., 2018)) is the structural component of infectious particles that are likely derived from intracellular 25 ORF2i assembly. Very recently, we showed that a short arginine-rich motif (ARM) in the ORF2 protein 26 sequence regulates the fate and functions of HEV capsid protein forms. Thus, the ARM regulates the 27 dual topology and functionality of the ORF2 signal peptide, leading to the production of either secreted 28 non-infectious glycosylated ORF2g/c forms or cytosolic infectious ORF2i form. According to the positive 29 inside rule (Nilsson et al., 2005; Heijne, 1989), the ARM likely leads the ORF2i protein to be anchored 30 by its N-terminus part (Nter) in the canonical secretion pathway membranes with its C-terminus (Cter) 31 facing the cytosol (Hervouet et al., 2022). More recently, we generated antibodies that specifically recognize the ORF2i protein, including the P1H1 antibody (Bentaleb et al., 2022). Thanks to these tools, we unveiled for the first time a membrane network composed of vesicular and tubular structures as HEV viral factories (i.e. endosomal recycling compartment or ERC) in perinuclear regions of HEV-producing cells. We demonstrated that these structures are enriched in ORF1, ORF2i, ORF3 proteins but also in viral RNA and ERC resident proteins (i.e. CD71 and Rab11). Moreover, silencing of the small GTPase Rab11 significatively impairs viral assembly and hereby viral infectivity without affecting viral replication (Bentaleb et al., 2022).

8 Adaptors (or AP) are tetrameric complexes involved in the intracellular shuttling of membrane-bound 9 proteins. Each complex is composed of two large subunits (a combination of  $\gamma a \delta a \zeta$  and  $\beta 1-5$ , 10 respectively), one medium subunit ( $\mu$ 1-5) and one small subunit ( $\sigma$ 1-5) (Park & Guo, 2014). Five AP 11 have been identified in humans (Robinson and Bonifacio, 2001; Hirst et al., 2011). AP-1 and AP-2 12 mediate cargo transport in a clathrin-dependent manner, whereas AP-3, AP-4 and AP-5 are clathrin-13 independent (Shin et al., 2021). The AP-1 complex is composed of  $\gamma$  and  $\beta$ 1 large subunits, a  $\mu$ 1 medium 14 subunit and a  $\sigma$ 1 small subunit. It is involved in vesicular transport between the secretion pathway 15 membranes (i.e. Trans-Golgi Network, TGN) and late/recycling endosomes (Park & Guo., 2014;

Duncan 2022). AP-1 complex subcellular localization relies on direct interaction with Arf1, a small guanine nucleotide-binding factor, and PI4P (Phosphatidylinositol-4-phosphate). Thus, AP-1 complex is recruited from the cytosol by its cargo, allowing its binding to clathrin and the formation of transport vesicles (Wang et al., 2003 ; Baust et al., 2006 ; Ren et al., 2013). Several viruses such as SARS-CoV-2, Varicella-Zoster virus or Dengue virus directly or indirectly exploit AP-1 complex to promote viral infectivity (Lebrun et al., 2018 ; Rebendenne et al., 2022 ; Yasamut et al., 2015).

Recent progress has been achieved recently in the understanding of the HEV lifecycle. However, cellular
 and/or viral determinants involved in the subcellular trafficking of viral components remain poorly

characterized. In particular, nothing is known regarding the addressing of viral proteins, notably the ORF2i protein, to viral factories. In our study, using a pharmacological inhibitor of AP-1 complex or silencing of the AP-1γ1 adaptin, we analyzed the involvement of the AP-1 complex in subcellular trafficking of the HEV ORF2i protein and its localization in viral factories. Our results highlight the importance of AP-1 complex-dependent shuttling for ORF2i protein addressing to viral factories and for the production of infectious viral particles in both hepatoma and primary cells. Our study thus unveils for the first time a host factor involved in the HEV ORF2i protein addressing to viral factories.

#### 1 Material & Methods

#### 2

#### 3 Cell culture

PLC3, a subclone of PLC/PRF/5 hepatoma cells, and Huh-7.5 cells were cultured as previously
described (Ankavay 2019). Both cell lines were authenticated by STR profiling and Multiplex Cell
Authentication (Multiplexion), respectively.

- 7 H7-T7-IZ cells, derived from Huh-7 cells and stably expressing the T7 RNA polymerase (kindly provided
- 8 by R. Bartenschlager), were cultured in a medium supplemented with 50μg/mL of Zeocin (Invivogen).
- 9 They were transfected with the T7 promoter-driven pTM expression plasmids.
- 10

# 11 Plasmids, capped-RNA preparation and transfection

The plasmid pBlueScript SK(+) carrying the DNA of the full-length gt3 Kernow C-1 p6 strain (GenBank accession number JQ679013, kindly provided by S.U Emerson) was used. Capped genomic HEV RNAs were prepared with the mMESSAGE mMACHINE kit (Invitrogen) and delivered to PLC3 or Huh-7.5 cells by electroporation using a Gene Pulser Xcell apparatus (Bio-Rad). The cells were electroporated with p6 RNA (20µg/4.10<sup>6</sup> cells). Mock PLC3 and Huh-7.5 cells were electroporated in the absence of RNA. The pTM-ORF2-p6 (kindly provided by J. Gouttenoire, (Lenggenhager et al., 2017) and pTM-ORF2-18 Sar55 (Hervouet et al., 2022) plasmids were transfected into H7-T7-IZ cells using ViaFect (Promega)

- 19 following the manufacturer's recommendations.
- 20

#### 21 Chemicals and viability assay

22 A5-membrane traffic inhibitor (A5, Calbiochem), Sofosbuvir (SOF, Selleckchem) and Ribavirin (RBV,

23 MedChemExpress) were dissolved in water (A5) or DMSO (SOF and RBV), to generate a 50mM stock.

24 Dose-response curve of PLC3 cells treated with A5 drug is shown in **Fig. S1**. Cell viability was assessed

25 using a CellTiter 96AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) following the

26 manufacturer's instructions.

27

#### 28 Silencing experiments

PLC3/HEV cells were transfected with 20nM of small interfering RNA (siRNA) pools (Horizon) targeting
 the adaptin AP-1γ1 (ON-TARGETplus human AP-1G1, gene 164, siRNA SMART-pool) or with a
 nontargeting siRNA control (siCTL, ON-TARGETplus Non-targeting pool, siRNA SMART-pool) by using

- 1 Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The
- 2 knockdown effects were determined at 72h post-transfection by western-blotting, immunoprecipitation,

3 immunofluorescence, RNA and infectious titers measurements.

4

#### 5 Antibodies

6 Primary antibodies used in this study are listed in **Table 1**. Peroxidase- and fluorochrome-conjugated
7 secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch.

8

# 9 Indirect immunofluorescence

10 Cells were grown on coverslips in 24-well plates and fixed at the indicated time points, with 3% of 11 paraformaldehyde (PFA). After 20 min (min), cells were washed twice with phosphate-buffered saline 12 (PBS) and incubated, or not, for 5 min with cold methanol. Then cells were permeabilized with 0.5% 13 Triton X-100 (TX) for 30 min. Cells were incubated in PBS containing 10% goat serum for 30 min at 14 room temperature (RT) and stained with the indicated primary antibodies for 30 min at RT followed by 15 fluorochrome-conjugated secondary antibodies for 20 min at RT. The nuclei were stained with DAPI 16 (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen). After 2 washes with PBS, coverslips were mounted with 17 Mowiol 4-88 (Calbiochem) on glass slides and analyzed with a LSM 880 confocal laser-scanning 18 microscope (Zeiss) using a Plan Apochromat 63xOil/1.4 N.A. objective. The images were processed 19 using Fiji software.

20

#### 21 Mander's overlap coefficient (MOC) determination

22 Colocalization studies were performed by calculating the MOC using the JACoP plugin of Fiji software.

23 For each analysis, at least 30 cells were selected to calculate a MOC mean. A MOC of 1 indicated a

- 24 perfect overlap and 0 no overlap.
- 25

#### 26 Western-blotting experiments

Samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (HybondECL, Amersham). The targeted proteins were detected with specific antibodies that are described above
and corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies. The detection of proteins was done
by chemiluminescence analysis (ECL, Amersham).

#### 1 Immunoprecipitations

For ORF2 protein immunoprecipitation experiments, mouse anti-ORF2 P1H1 and P3H2 monoclonal antibodies (mAb) (Bentaleb et al., 2022) were bound to Epoxy Dynabeads<sup>™</sup> M-270 (Invitrogen) overnight at 37°C following the manufacturer's recommendations. Irrelevant mouse IgG antibody (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) was used as a control. Beads were washed and then incubated for 1 h at room temperature with heat-denatured supernatants. Beads were washed and then heated at 80°C for 20 min in Laemmli buffer. ORF2 proteins were detected by WB using the anti-ORF2 1E6 mAb antibody.

9 For co-immunoprecipitation experiments, rabbit anti-AP-1y1 polyclonal antibody (pAb) or irrelevant anti-10 rabbit IgG (AB-105-C, Novus) were bound to Pierce<sup>™</sup> magnetic A/G beads (Invitrogen). Cells were 11 subjected to cross-linking using 0.8% PFA before lysis. Cell lysates were precleared on beads during 12 1h at 4°C. The precleared supernatant was added to beads-Ig complexes and incubated for 2h at 4°C. 13 After the reaction, beads were washed six times with PBS 1X NP40 0.5% before elution with Laemmli 14 buffer and boiled for 5min at 95°C. Samples were analyzed by Western blotting and inputs were 1/50 of 15 the lysate volume subjected to co-immunoprecipitation. Rabbit anti-AP-1y1 pAb and mouse anti-ORF2 16 1E6 were used for revelation.

17

#### 18 Proximity ligation assay

19 Electroporated PLC3 cells cultured on glass coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min, 20 methanol for 5min and permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 30 min. Proximity ligation 21 assay was performed using Duolink in situ detection kit (Sigma), as recommended by the manufacturer, 22 with the anti-ORF2i P1H1 mAb and a polyclonal rabbit anti-AP-1y1 antibody. Images were acquired by 23 confocal microscopy. For each condition, twelve fields were acquired. For each field, a stack of images 24 corresponding to the total volume of the cells was acquired. Maximum-intensity projection images were 25 generated using Zen software. Representative images were assembled and dots were counted using 26 Fiji software. For each field, the mean number of spots per cell was calculated by dividing the total 27 number of spots by the total number of nuclei.

- 28
- 29
- 30

#### **1** Infectious titer determination

Huh 7.5 cells were seeded in 96-well plates. The following day, cells were infected with serial dilutions of supernatants or intracellular viral particles from PLC3/HEV cells. Three days post-infection, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence. Cells labeled with anti-ORF2 1E6 mAb 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/ml. Titers were adjusted to 100% for siCTL-transfected (siCTL) or diluent-treated (H<sub>2</sub>O or DMSO) cells.

8

# 9 Extraction of intracellular particles

10 Confluent T75 flasks of PLC3/HEV cells were trypsinized, and cells were centrifuged for 10 min at 1500 11 rpm. Cells were washed thrice with PBS. Intracellular viral particles were extracted by resuspending 12 cells in 1 ml of sterile water at room temperature. Cells were vortexed vigorously for 20 min, and then, 13 110 µl of sterile 10X PBS was added. Samples were clarified by centrifugation 10 min at 13400 rpm. 14 The supernatants containing intracellular particles were collected and stored at -80°C until use.

15

#### 16 RNA extraction and quantification

17 Extracellular and intracellular RNAs were extracted using QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen) and 18 Nucleospin RNA Plus kit (Macherey & Nagel), respectively. Next, extracted RNAs were converted to 19 cDNA by using a polydT primer and the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Agilent 20 Technologies) according the manufacturer's instructions. qPCR (TaqMan Gene Expression Assay, 21 MGB-FAM-dye, ThermoFisher Scientific) was performed by using the QuantStudio3 Thermocycler 22 (Applied Biosystems) and using primers (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3' (F) and 5'-23 AGGGGTTGGTTG GATGAA-3' (R)) and a probe (5'-FAM-TGATTCTCAGCC CTTCGC-TAMRA-3') that 24 targets a conserved 70-bp region in the ORF2/3 overlap (Jothikumar et al., 2006).

25

#### 26 Primary human hepatocytes (PHHs) experiments

Cryopreserved PHHs were obtained from Biopredic. PHHs (0,76x10<sup>6</sup> cells/well) were seeded in collagen
I-coated 12-well plates in Williams E GlutaMAX<sup>TM</sup>-1 medium supplemented with 100 UI/mL penicillin,
100 μg/mL streptomycin, 4 μg/mL bovine insulin and 10% fetal calf serum v/v. One day post-seeding,
PHHs were infected with HEV intracellular particles and treated with the corresponding drug or solvent

- 1 in Williams E GlutaMAX<sup>™</sup>-1 medium supplemented with 100 UI/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin,
- 2 4 µg/mL bovine insulin and 50 µM hydrocortisone. At D+1 and D+2, fresh medium containing
- 3 drug/diluent was added to the wells. At D+3, supernatants were recovered and processed for WB and
- 4 extracellular infectious titers determination.
- 5

# 6 Statistical analyses

- 7 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.5.0 software.
- 8

- 1 Results
- 2

#### 3 HEV ORF2i protein colocalizes and interacts with the AP-1 adaptor complex

4 We have recently shown that the ERC is hijacked by HEV to serve as a viral factory (Bentaleb et al., 5 2022). Here, we attempted to identify the mechanisms underlying ORF2i localization to the ERC by 6 analyzing the importance of the AP-1 complex in this process. First, PLC3 cells were electroporated with 7 the infectious gt3 p6 strain RNA (PLC3/HEV) (Fig. 1a) or mock electroporated (PLC3) (Fig. S2), and 8 the colocalization between HEV ORF2i protein (using P1H1 mAb that does not recognize the ORF2g/c 9 forms) and the AP-1 adaptor complex was studied by confocal microscopy at 6 days post-electroporation 10 (d.p.e). We analyzed the overlap of fluorescence intensities of ORF2i and AP-1 staining (Fig. 1a and 11 Fig. S2) and calculated Manders' overlap coefficients (MOC) of ORF2i protein staining in the AP-1 12 complex staining (Fig. 1f). As previously observed (Hervouet et al., 2022; Bentaleb et al., 2022), a 13 nugget-like pattern was detected for the ORF2i protein in the perinuclear region. In accordance with its 14 TGN and endosomal localization, a perinuclear and peripheral staining was observed for the AP-1 15 complex. Interestingly, the ORF2i protein staining highly overlapped with that of AP-1 complex in 16 perinuclear regions (Fig. 1a, right panel), with a MOC value of 0.86 (Fig. 1f), indicating that the ORF2i 17 protein likely colocalizes with the AP-1 complex in perinuclear regions of electroporated PLC3 cells. 18 Importantly, confocal analyses of Huh-7.5 cells electroporated with p6-HEV RNA (Huh-7.5/HEV, Fig. 19 1b) or infected with HEV particles (Fig. 1c) also showed a colocalization of ORF2i protein and AP-1 20 complex in perinuclear regions with MOC values of 0.83 and 0.81, respectively (Fig. 1f). Super-21 resolution microscopy analysis also revealed a significant overlap of ORF2i protein/AP-1 complex 22 fluorescence intensities in these contexts (Fig. 1b-c, right panels). These results indicate that ORF2i 23 and AP-1 colocalization is not cell type-dependent and does not correspond to an artifact of 24 electroporation. 25 To strengthen our observations, we extended our study to HEV-gt1 by transfecting constructs 26 expressing either HEV-gt1 ORF2 (Sar55 strain) or HEV-gt3 ORF2 (p6 strain) proteins in Huh-7 cells 27 stably expressing the T7 RNA-polymerase (H7-T7-IZ cells) (Romero-Brey 2012). In this context, gt1 and 28 gt3 ORF2i proteins display a similar subcellular localization pattern, as previously described (Hervouet

29 2022, Bentaleb, 2022). They are characterized by a nugget-like perinuclear accumulation and peripheral

30 distribution (Fig. 1d and Fig. 1e). Strikingly, both gt1 and gt3 ORF2i proteins highly colocalized with AP-

1 1 complex in perinuclear regions with MOC values of 0.76 and 0.77 (Fig. 1f), respectively. In addition,

2 as observed in electroporated/infected cells, peaks of fluorescence intensities of both proteins overlap

3 perfectly (Fig. 1d-e, right panels), indicating that colocalization between ORF2i protein and AP-1

4 complex is conserved among HEV-gt1 and -gt3 strains.

Next, we studied the interaction between the HEV ORF2i protein and the AP-1 complex interaction in
PLC3/HEV cells, at 6 d.p.e (Fig. 2). First, we performed co-immunoprecipitation (co-IP) experiments
(Fig. 2a). AP-1 complex was detected at similar intensities in PLC3/HEV and PLC3 cell lysates whereas

8 ORF2i protein was only detected in PLC3/HEV cell lysate ("Inputs", **Fig. 2a**). Following

9 immunoprecipitation of AP-1 complex (IP AP-1), a band corresponding to the ORF2i protein was

10 detected in PLC3/HEV cells and not in PLC3 mock cells or in the isotype control condition (Iso),

11 indicating that the ORF2i protein was specifically co-immunoprecipitated with AP-1 (Fig. 2a). Therefore,

12 the AP-1 complex and the HEV ORF2i protein interact specifically in PLC3/HEV cells.

13 Immunoprecipitation with anti-ORF2i P1H1 mAb was performed but failed to detect the AP-1 complex, 14 probably because the P1H1 epitope is hidden by the interaction (data not shown). We confirmed our co-15 IP results by using proximity ligation assay (PLA) (**Fig. 2b**). Indeed, in PLC3/HEV cells (HEV/H<sub>2</sub>O), a 16 mean of 2.5 spots/cell was observed whereas less than 0.2 spot/cell were observed in mock 17 electroporated cells (PLC3/H<sub>2</sub>O) (**Fig. 2b**), confirming that ORF2i protein and AP-1 complex likely 18 interact together. Of note, the low number of spots per cell in this condition may be explained by the 19 transient interaction of cargo protein/AP-1 complex in living cells.

20 The AP-1 complex can be specifically inhibited by the A5 compound, a well characterized

pharmacological inhibitor (Duncan et al. 2007 ; Zallocchi et al., 2012 ; Yasamut et al., 2015). A5 is a cell-permeable piperazinyl phenylethanone derivate that inhibits AP-1 complex by acting at a step after adaptor membrane recruitment, which significantly impairs AP-1 subcellular shuttling (Duncan et al., 2007). Therefore, we next sought to explore the ability of this molecule, at non-cytotoxic dose of 150µM (Fig. S1), to disrupt ORF2i/AP-1 interaction (HEV/A5) in PLA (Fig. 2b). Interestingly, A5 treatment induced a significant reduction of spot detection (< 1 spot/cell) as compared to control cells (HEV/H<sub>2</sub>O) (Fig. 2b), confirming the specificity of ORF2i/AP-1 interaction.

Taken together, our results indicate that HEV ORF2i and AP-1 complex colocalize and likely interact
 together in HEV-gt1 or -gt3 infected/transfected hepatoma cell lines.

#### 1 Pharmacological inhibition of the AP-1 complex prevents the localization of

#### 2 ORF2i protein in viral factories and inhibits viral infectivity

We next evaluated the relevance of HEV ORF2i protein and AP-1 complex interaction in the HEV lifecycle. We first carried out an extensive immunofluorescence analysis of the impact of A5 treatment on HEV ORF2i protein subcellular localization and colocalization with viral/cellular markers, at 3 days post-treatment. Colocalization analyses were performed by using the P1H1 anti-ORF2i antibody and antibodies against markers related to AP-1 complex shuttling (AP-1, M6PR, Clathrin), TGN compartment (TGN46, STX6), ERC (Rab11) and HEV proteins (ORF3) (**Fig. 3** and **Fig. S3**). Colocalization of markers was quantitatively analyzed by calculating the MOC (**Fig. 3**, right panels).

As shown in **Fig.3a**, the ORF2i protein significantly colocalized with AP-1 complex in H<sub>2</sub>O-treated cells (MOC = 0.86) in perinuclear regions whereas this colocalization was significantly reduced in A5-treated cells (A5 – 150 $\mu$ M, MOC = 0.45). Upon A5 treatment, staining of ORF2i and AP-1 complex was more diffuse, in accordance with **Fig. 2b**.

14 To ensure that the subcellular redistribution of ORF2i protein in A5-treated cells was correlated to a 15 specific inhibition of AP-1 complex, we analyzed the colocalization between ORF2i protein and the 16 cation-independent mannose-6-phosphate receptor (M6PR), a TGN resident protein that transits 17 between TGN and endosomes (Klumperman et al., 1993; Ghosh et al., 2003) (Fig. 3b). The AP-1 18 complex is known to bind and pack M6PR into transport vesicles at the TGN to deliver it as well as 19 bound lysosomal enzymes to late endosomes (Doray et al., 2002 ; Ghosh & Kornfeld, 2004). When AP-20 1-dependent trafficking is inhibited, lysosomal enzymes are secreted instead of being addressed to late 21 endosomes (Tan & Gleeson, 2019). In H<sub>2</sub>O-treated cells, M6PR was detected in perinuclear regions, 22 consistent with its TGN localization, and moderately colocalized with OR2i protein (MOC = 0.49; Fig. 23 3b). In A5-treated cells, M6PR displayed a diffuse dot-like staining in the cytosol, indicating an efficient 24 inhibition of its AP-1-dependent shuttling, and a significant reduction of its colocalization with ORF2i 25 protein was observed (MOC = 0.22; Fig. 3b). Again, the ORF2i protein displayed a more diffuse staining 26 in treated cells where M6PR displayed a dot-like pattern, suggesting that inhibition of AP-1 complex by 27 A5 compound is likely responsible for altering its protein subcellular localization in PLC3/HEV cells. Of 28 note, A5 treatment had not impact on subcellular localization of the AP-2 adaptor complex (Fig. S4a), 29 which is involved in cargo endocytosis from plasma membrane to endosomes (Park and Guo, 2014), 30 confirming the specificity of A5 regarding the AP-1 complex.

1 To strengthen our observations, we examined the impact of A5 treatment on TGN compartment integrity

2 to make certain that ORF2i subcellular localization modification by A5 was not due to a TGN

3 morphological alteration. For that purpose, we analyzed the colocalization of ORF2i protein with TGN46, 4 (Fig. 3c) and colocalization of TGN46 with Syntaxin-6 (STX6), which are both markers of the TGN 5 compartment (Luzio et al., 1990; Bock et al., 1997) (Fig. 3d). In H<sub>2</sub>O- and A5-treated cells, TGN46 6 subcellular localization remained unchanged (Fig.3c and 3d). Although weak, the codistribution of 7 ORF2i with TGN46 was decreased significantly in A5-treated cells compared to control (MOC = 0.15 vs 8 0.35) (Fig. 3c). Importantly, subcellular localization and colocalization of TGN46 and STX6 remained 9 unchanged upon A5 treatment (Fig. 3d), indicating that the TGN integrity was not affected upon A5 10 treatment. Together these observations indicate that the AP-1 complex is likely involved in the 11 subcellular trafficking of the HEV ORF2i protein.

Next, as AP-1 complex-dependent shuttling involves clathrin, we analyzed the colocalization between ORF2i protein and clathrin (**Fig. 3e**). In H<sub>2</sub>O-treated cells, a strong colocalization (MOC = 0.88) was observed in focalized perinuclear regions. In A5-treated cells, this colocalization was significantly reduced (MOC = 0.50) and clathrin-associated staining was more peripheral, indicating that A5

treatment also affects clathrin-recruitment to membranes. These results indicate that the subcellular
 localization of ORF2i protein is driven by AP-1 complex and involves clathrin.

18 We have previously shown that the ORF2i protein co-distributes in perinuclear nugget-like structures 19 together with the HEV ORF3 protein and Rab11, a marker of ERC (Bentaleb et al., 2022). Therefore, 20 we next studied the impact of A5 treatment on the colocalization of ORF2i with ORF3 (Fig. 3f) and 21 Rab11 (Fig. 3g). Regarding the ORF2i/ORF3 co-staining, a diffuse cytosolic dot-like distribution of the 22 HEV ORF3 protein was observed upon A5 treatment, as well as a significantly reduced ORF2i/ORF3 23 colocalization compared to control condition (MOC = 0.22 vs. 0.80; Fig. 3f). This indicates that A5 24 treatment alters the co-distribution of HEV ORF2i/ORF3 proteins. Regarding the ORF2i/Rab11 co-25 staining, a strong colocalization of both markers was observed in perinuclear nugget-like structures in 26 control cells (MOC = 0.82; Fig. 3g) whereas their colocalization was significantly impaired in A5-treated 27 cells (MOC = 0.42). These results indicate that the pharmacological inhibition of AP-1 complex impairs 28 the localization of ORF2i protein to ERC, and hence, to viral factories.

1 Next, we sought to assess the impact of altered ORF2i protein localization in viral factories upon A5 2 treatment on the viral lifecycle. For this purpose, we analyzed intracellular and extracellular ORF2 3 protein expression in treated PLC3/HEV cells by Western blotting (WB) and immunoprecipitation (IP) 4 (Fig. 4a). In WB, we used the 1E6 mAb that recognizes all the ORF2 isoforms. We also controlled the 5 expression levels of the HEV ORF3 protein, tubulin, and the stress-overexpressed GRP78 marker (Fig. 6 4a). In IP, we used P1H1 and P3H2 antibodies to differentially immunoprecipitate ORF2 forms in cell 7 supernatants. Indeed, we have previously shown that the P1H1 mAb specifically immunoprecipitates 8 the particle-associated ORF2i protein whereas the P3H2 mAb preferentially immunoprecipitates 9 glycosylated ORF2g/c forms from heat-denatured HEV-cell culture supernatant (Bentaleb et al., 2022). 10 Impact of A5 treatment on viral production was also analyzed by quantification of viral RNAs (Fig. 4b) 11 and infectious titers (Fig. 4c) and compared to cells treated with sofosbuvir (Sof), a well characterized 12 inhibitor of in vitro HEV replication and production (Dao Thi et al., 2016).

13 Although the A5 treatment did not induce any cellular stress response (i.e no impact on intracellular 14 GRP78 detection levels in WB) and did not affect intracellular expression levels/patterns of ORF2 and 15 ORF3 proteins (Fig. 4a, Cells), we found that the inhibitor induced a significant reduction of ORF2i 16 protein detection in supernatants after immunoprecipitation with the anti-ORF2i P1H1 antibody, without 17 affecting secretion of glycosylated ORF2g/c forms (Fig. 4a, Supernatant). These results indicate that 18 A5 treatment likely reduces the secretion of viral particles. Accordingly, extracellular viral RNA titers 19 were reduced whereas intracellular viral RNA titers were significantly increased, likely due to an 20 intracellular HEV RNA accumulation (Fig. 4b). In addition, both extracellular and intracellular infectious 21 titers were significantly reduced upon A5 treatment (≈70%; Fig. 4c). Taken together, these results 22 indicate that inhibition of AP-1 complex by A5 impairs assembly and secretion of infectious HEV 23 particles.

Overall, these results highlight the importance of the AP-1 complex in addressing the ORF2i protein to
 viral factories for producing infectious viral particles. The AP-1 complex is probably a central player in
 the HEV lifecycle.

- 27
- 28
- 29

#### 1 Silencing of the AP-1γ1 adaptin impairs the localization of ORF2i protein in viral

#### 2 factories and inhibits viral infectivity

To confirm the importance of the AP-1 complex in the localization of ORF2i protein in viral factories and
for viral particles production, PLC3/HEV cells were transfected with small interfering RNA (siRNA)
targeting the γ1 subunit of the AP-1 complex (siAP-1γ1) or non-targeting siRNA (siCTL) (Fig. 5 and Fig.
6). We silenced the AP-1γ1 subunit because many viruses, including Coronaviruses (Rebendenne et
al., 2022), subvert this adaptin to promote viral infectivity.

- 8 We first carried out an extensive immunofluorescence analysis of siAP-1γ1 impact on HEV ORF2i
  9 protein subcellular localization and colocalization with viral/cellular markers (Fig. 5). As in Fig. 3,
  10 colocalization experiments were performed by using the P1H1 anti-ORF2i antibody and antibodies
  11 against markers related to AP-1 complex shuttling (AP-1, M6PR, Clathrin), TGN compartment (TGN46,
  12 STX6), ERC (Rab11) and viral proteins (ORF3). Colocalizations were quantitatively analyzed by
- 13 calculating the MOC (**Fig. 5**, right panels).
- 14 As shown in Fig. 5a, the ORF2i protein significantly colocalized with AP-1 complex in siCTL-transfected 15 cells (MOC = 0.80) in perinuclear regions whereas this colocalization was abolished in siAP-1y1-16 transfected cells (siAP-1y1, MOC = 0.06). Interestingly, in AP-1y1-knocked down cells, ORF2i protein 17 displayed a more diffuse subcellular distribution as compared to siCTL-cells (Fig. 5a), similarly to what 18 was observed in A5-treated cells (Fig. 3a). As observed for the A5 compound (Fig. S4a), we found that 19 the siAP-1v1 transfection had no impact on the subcellular localization of the AP-2 adaptor complex 20 (Fig. S4b). These results confirm the importance of the AP-1 complex in the subcellular addressing of 21 ORF2i protein.
- In line with A5 treatments, the M6PR marker also displayed a more diffuse cytosolic pattern and a reduced co-distribution with ORF2i (MOC = 0.44 in siCTL vs. 0.27 in siAP-1 $\gamma$ 1; **Fig. 5b**) upon silencing of AP-1 $\gamma$ 1, without any impact on TGN integrity (**Fig. 5c-d**), indicating that the AP-1 $\gamma$ 1-silencing alters AP-1 complex activity.
- Clathrin also showed a more diffuse signal in the cytosol and reduced colocalization with ORF2i in AP-1 $\gamma$ 1-knocked down cells (MOC = 0.82 in siCTL vs. 0,40 in siAP-1 $\gamma$ 1; **Fig. 5e**). This indicates that AP-1 complex activity as well as clathrin recruitment are important for the subcellular addressing of ORF2i protein. Regarding ORF2i/ORF3 costaining (**Fig. 5f**), ORF3 staining was less focalized in siAP-1 $\gamma$ 1 cells, with a significantly reduced MOC value in siAP-1 $\gamma$ 1-cells (MOC = 0.22), as compared to siCTL cells

1 (MOC = 0.79). This indicates that the silencing of AP-1 $\gamma$ 1 subunit alters HEV ORF2i/ORF3 proteins co-2 distribution. For ORF2i/Rab11 co-staining (**Fig. 5g**), a strong colocalization was observed in perinuclear 3 nugget-like structures in the control condition (siCTL, MOC = 0.80) whereas after siAP-1 $\gamma$ 1 transfection, 4 the colocalization was significantly reduced (MOC = 0.37), indicating that the silencing of AP-1 $\gamma$ 1 adaptin 5 prevents the ORF2i protein to be targeted to viral factories. Altogether, these results confirm our 6 previous observations made with the A5 compound, strengthening the fact that AP-1 complex is an 7 important host determinant involved in ORF2i protein addressing to viral factories.

8 Next, we further evaluated the impact of altered ORF2i protein localization in viral factories upon AP-9 1v1 silencing on the viral lifecycle. For that purpose, we proceeded as in Fig. 4 with PLC3/HEV cells 10 transfected with siCTL or siAP-1y1 (Fig. 6). Although the silencing of the AP-1y1 adaptin did not affect 11 the ORF2 intracellular expression level/pattern nor the secretion of glycosylated ORF2g/c forms, we 12 found that it induced a significant reduction of ORF2i detection in supernatants after immunoprecipitation 13 with anti-ORF2i P1H1 antibody, as compared to siCTL-transfected or non-transfected (NT) cells (Fig. 14 6a). In line with previous results, extracellular viral RNA titers were reduced whereas intracellular viral 15 RNA titers were significantly increased in siAP-1y1-transfected cells (Fig. 6b). In addition, both 16 extracellular and intracellular infectious titers were significantly reduced upon AP-1y1 silencing ( $\approx 70\%$ ; 17 Fig. 6c). Taken together, these results confirm again the importance of the AP-1 complex in addressing 18 the ORF2i protein to viral factories. The AP-1 complex is thus a key player in the HEV lifecycle.

19

#### 20 AP-1 complex-dependent shuttling is pivotal for the HEV lifecycle in PHHs

To further validate our findings in a cell culture system of hepatocytes closer to *in vivo* settings, we analyzed the impact of A5 inhibitor in HEV-infected human primary hepatocytes (PHHs) (**Fig. 7**). Briefly, one day after seeding (D-0), PHHs were infected with HEV particles and treated with the compound A5, ribavirin (RBV, an FDA-approved HEV replication inhibitor), or their respective diluent (H<sub>2</sub>O or DMSO). At 3 days post-infection/treatment, supernatants were recovered (**Fig. 7a**). We assessed the impact of treatments on ORF2 protein detection in PHH supernatant by WB (**Fig. 7b**) and on viral production by quantification of infectious titers (**Fig. 7c**).

As shown in **Fig. 7b**, A5 treatment did not affect the detection level/pattern of the ORF2g protein, which is the predominant ORF2 form in supernatants (Montpellier 2018, Yin 2018). In contrast, no ORF2gassociated signal was detected in the RBV-treated condition, explained by RBV-induced replication inhibition. These results indicate that the compound A5 has not impact on the secretion of ORF2g protein
in PHH supernatant and, more globally, on the protein secretion of PHHs.

Next, we analyzed the impact of A5 treatment on viral production by determining the extracellular infectious titers (**Fig. 7c**). After treatment with A5, HEV extracellular infectious titers were significantly reduced (≈40%) as compared to control conditions, to levels comparable to the RBV-treated condition (≈40%). This indicates that A5 treatment inhibits the production of viral particles in infected PHHs, as observed in hepatoma cell lines.
Taken together, these results indicate that AP-1-dependent shuttling is pivotal for the HEV particle

- 9 secretion in this *ex vivo* system, without affecting the secretion of ORF2g protein. These results also
  10 confirm our conclusions drawn in hepatoma cell lines underlining the pivotal role of AP-1 complex in the
- 11 HEV lifecycle.
- 12
- 13

- 1 Discussion
- 2

3 We and others demonstrated that during its lifecycle, HEV produces three different forms of the ORF2 4 capsid protein (Montpellier et al., 2018; Yin et al., 2019). The non-glycosylated ORF2i form is the 5 structural component of viral particles. The ORF2g/c forms are massively secreted proteins that are N-6 glycosylated, O-glycosylated, sialylated but are not associated to virions. The mechanism underlying 7 the differential production of these isoforms is not fully understood but we have recently shown that an 8 arginine-rich motif (ARM) located at the N-terminus of the ORF2 protein, is responsible for regulating 9 the ORF2 protein topology toward secretion pathway membranes to produce either ORF2i or ORF2g/c 10 forms. We showed that the ORF2i protein is likely anchored into the membranes through its N-terminus 11 and faces the cytosol (Hervouet et al., 2022). More recently, using electron microscopy approaches and 12 the P1H1 anti-ORF2i specific antibody, we showed that HEV induces tubular and vesicular structures 13 in the vicinity of the nucleus that are enriched in viral proteins (*i.e* ORF1, ORF2i, ORF3 proteins), viral 14 RNA and ERC resident proteins (i.e. Rab11, CD71) (Metzger et al., 2022; Bentaleb et al., 2022). In 15 confocal microscopy, these structures are observable as nugget-like structures in perinuclear areas. 16 Silencing of Rab11 significantly impaired viral particle production in a replication-independent manner 17 and altered the subcellular localization of ORF2i protein (Bentaleb, 2022). These data suggest that, in 18 addition to multivesicular bodies which have been shown to be instrumental in the late steps of the HEV 19 lifecycle (Nagashima J Gen Virol 2014, Feng Adv Virus Res 2020), the ERC likely serves as a viral 20 factory and also constitutes a pathway for viral particle egress. One of the questions underlying these 21 results is the mechanism responsible for driving viral elements (proteins and RNA) to ERC/viral factories, 22 and more specifically the ORF2i protein, a key player in the HEV lifecycle.

23

24 In the present study, we demonstrated the importance of the AP-1 adaptor complex in addressing the 25 ORF2i protein to ERC/viral factories. Both proteins colocalized and interacted together in hepatoma cell 26 lines. Inhibition of AP-1 complex by a pharmacological inhibitor or by silencing impaired this interaction 27 in HEV gt1/gt3 context and also significantly reduced viral infectivity, underlining the importance of the 28 interplay between AP-1 and ORF2i for producing viral particles, in hepatoma cell lines and primary 29 human hepatocytes (Fig. 8). The interaction between AP-1 complex and viral proteins has been shown 30 to be important for infectivity of several viruses belonging to different families. For example, AP-1 31 complex interacts with HIV Nef (Bresnahan et al., 1998), African swine fever virus CD2v (Pérez-Núñez

1 et al., 2015) and Varicella-Zoster ORF9p (Lebrun et al., 2019). The interaction of AP-1 complex with 2 cargoes relies on particular consensus sequences located in their cytoplasmic domain: the tyrosine-3 based motif YXXØ or the dileucine-based motif [DE]XXXL[LI] (X is any amino acid and Ø represents 4 hydrophobic amino acid) (Park and Guo, 2014). By analyzing the primary ORF2i protein sequence, we 5 identified a dileucine-like motif located in its cytosolic domain, in agreement with the cargo features of 6 AP-1 complex. We performed site-directed mutagenesis of this motif and attempted to characterize this 7 mutant (data not shown). This mutant displays an interesting phenotype but currently, some results are 8 difficult to interpret. This mutant needs to be further characterized.

9

10 Interestingly, it has been shown that the TGN resident protein TGOLN2/TGN46 can be found on the 11 surface of enveloped HEV particles, suggesting that they bud from intracellular vesicles likely originating 12 from the TGN compartment (Nagashima et al., 2014; Das et al., 2023). As AP-1 complex binds cargos 13 anchored in TGN membranes, our study is likely in line with these observations. A study has also shown 14 that ORF3 protein is palmitoylated on 8 N-terminal cysteine residues, and is exposed on the cytosolic 15 side of intracellular membranes (Gouttenoire et al., 2019). The ORF3 protein has also been found 16 localized in ERC (Chandra et al., 2008; Bentaleb et al., 2022). As ORF2i and ORF3 proteins display 17 the same topology towards intracellular membranes and are in close relationship, we cannot exclude 18 that the ORF3 protein is also addressed to ERC/viral factories in an AP-1 complex-dependent manner, 19 or that ORF2i-ORF3 protein complex is transported by the AP-1 complex. The fact that the subcellular 20 localization of ORF3 protein is altered after inhibition of AP-1 complex supports this hypothesis. In 21 addition to post-translational modifications of cargos, specific cytoplasmic proteins recruited as 22 accessory proteins may be involved in AP-1 binding to facilitate cargo recruitment, such as the 23 Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein (PACS) family, including PACS-1 (Wan et al., 1998; Tu et 24 al., 2020). We can speculate that ORF2i protein may be involved, for example, in ensuring the proper 25 localization of the ORF3 protein, as PACS-1 does. In this context, inhibition of the ORF2i protein/AP-1 26 complex interaction would alter ORF3 protein subcellular localization and viral assembly/secretion: 27 these results were observed in our study and thus support this hypothesis. Another explanation would 28 have been that inhibition of AP-1 complex (by A5 or silencing of AP-1y1) directly affects the ORF3 29 protein and not the ORF2i protein. Previous characterization of ΔORF3 virus, expressing an ORF3-null 30 mutant of HEV-p6, showed that virion secretion was affected while viral assembly was not, indicating

that the ORF3 protein is necessary for viral particle secretion but not for viral assembly. Specifically,
extracellular infectious titers were significantly reduced compared to wild-type virus (Emerson et al.,
2006). In the present study, we observed an ≈70% reduction in extracellular and intracellular infectious
titers in cells treated with A5 or transfected with siRNA targeting AP-1γ1, indicating that viral assembly
was altered. Therefore, our observations cannot be attributed to an effect on the ORF3 protein, but are
specific to the ORF2i protein.

7

8 Unexpectedly, the interaction between the ORF2i protein and AP-1 complex may be of greater

9 importance. As AP-1 complex is involved in many cellular protein transport processes, this interaction 10 could disrupt the delivery and/or subcellular addressing of cellular proteins. This could play a role in 11 promoting viral infection, interfering with the recruitment of restriction factors or evading host immune 12 responses. For example, in the context of HIV infection, the interaction of Nef viral protein with AP-1 13 complex interferes with the subcellular addressing of cellular proteins, notably by decreasing the amount 14 of class I MHC molecules or CD4 glycoprotein detectable on the cell surface (Lijima et al., 2012; 15 Tavares et al., 2017). This mechanism is likely involved in the immune escape of HIV-infected cells, 16 mainly by inhibiting the presentation of viral antigens. This aspect would deserve our attention in order 17 to better understand the effect of the ORF2i/AP-1 complex interaction in the context of HEV infection at 18 the cellular level. Further characterization of this interaction could be helpful to identify new host factors 19 involved in promoting viral infection as well as new restriction factors or to understand immune evasion 20 mechanisms settled up by HEV, thus revealing potential new drug targets for combating HEV infection. 21

In conclusion, we have identified for the first time a host determinant critical for HEV lifecycle that is involved in HEV ORF2i protein localization to ERC/viral factories. In addition to expanding the scarce knowledge of host factors involved in the HEV lifecycle, we have demonstrated that AP-1-dependent shuttling is important for HEV particle production in human hepatoma cells *in vitro* or *ex vivo* in primary human hepatocytes.

#### **1** Data availability statement

2 The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material,

3 further inquiries can be directed to the corresponding author on reasonable request.

4

#### 5 Author contribution

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, experiments, data
collection and analysis were performed by MF, VA, CM, PB, MA, CB, CMA, JD, YR and LC. MF and LC
wrote the first draft of the manuscript, and all authors commented on previous versions of the
manuscript. All authors read and approved the submitted version of the manuscript.

10

# 11 Funding

12 MF was supported by a fellowship from the Institut Pasteur de Lille, the Région Hauts-de-France and

13 the ANRS-Maladies infectieuses émergentes (ANRS-MIE). MA was supported by ANRS-MIE and is

14 currently supported by the Fonds National Suisse (FNS). CB was supported by ANRS-MIE, INSERM-

15 Transfert, Région Hauts-de-France and Institut Pasteur de Lille.

16 The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation17 of the manuscript.

18

# 19 Acknowledgments

We would like to thank Suzanne U. Emerson (NIH, United States), Jérôme Gouttenoire (University Hospital of Lausanne, Switzerland) and Ralph Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) for providing us with reagents. We also thank Audrey Tarricone and Sophana Ung for their technical assistance. We would also like to thank the imaging core facility of the Biolmaging Center Lille-Nord de France for access to the infrastructure.

25

# 26 Declarations

Claire Montpellier, Jean Dubuisson and Laurence Cocquerel are coinventors of two patent applications
on the use of antibodies having specificity for the ORF2i protein for HEV diagnostic purposes. The
authors have no other financial or non-financial interests to disclose.

# 1 References

2

3 4 5	Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J. & Hill, V. R. A broadly reactive one- step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. <i>J Virol Methods</i> <b>131</b> , 65–71 (2006).	
6 7	Bresnahan, P. A. <i>et al.</i> A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4	2.
8 9	downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. <i>Current Biology</i> <b>8</b> , 1235-S1 (1998).	3.
10 11 12	lijima, S. <i>et al.</i> A Noncanonical mu-1A-Binding Motif in the N Terminus of HIV-1 Nef Determines Its Ability To Downregulate Major Histocompatibility Complex Class I in T Lymphocytes. <i>J Virol</i> <b>86</b> , 394 3951 (2012).	4–
13 14 15	Yasamut, U. <i>et al.</i> Adaptor Protein 1A Facilitates Dengue Virus Replication. <i>PLoS ONE</i> <b>10</b> , e013006 (2015).	4. 65
16 17 18	Park, S. Y. & Guo, X. Adaptor protein complexes and intracellular transport. <i>Bioscience Reports</i> <b>34</b> , e00123 (2014).	5.
19 20 21	Robinson, M. S. & Bonifacino, J. S. Adaptor-related proteins. <i>Current Opinion in Cell Biology</i> <b>13</b> , 444 453 (2001).	6. 4–
22 23 24	Hervouet, K. <i>et al.</i> An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecycle and interactions with the host cell. <i>PLoS Pathog</i> <b>18</b> , e1010798 (2022).	7.
25 26 27	Rebendenne, A. <i>et al.</i> Bidirectional genome-wide CRISPR screens reveal host factors regulating SARS-CoV-2, MERS-CoV and seasonal HCoVs. <i>Nat Genet</i> <b>54</b> , 1090–1102 (2022).	8.
28 29 30 31 32	Canniff, N. P., Guay, K. P. & Hebert, D. N. Carbohydrates Direct the Maturation and Trafficking of Glycoproteins in the Secretory Pathway. in <i>Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)</i> (eds. Bradshaw, R. A., Hart, G. W. & Stahl, P. D.) 320–330 (Academic Press, 2023).	9.
33	dol. <u>https://dol.org/10.1010/b976-0-12-621016-7.00010-X</u> .	10.
34 35 36	Tan, J. Z. A. & Gleeson, P. A. Cargo Sorting at the trans-Golgi Network for Shunting into Specific Transport Routes: Role of Arf Small G Proteins and Adaptor Complexes. <i>Cells</i> <b>8</b> , 531 (2019).	11
37 38 20	Pérez-Núñez, D. <i>et al.</i> CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection <i>PLoS ONE</i> <b>10</b> , e0123714 (2015).	on.
39 40 41	Das, A. <i>et al.</i> Cell entry and release of quasi-enveloped human hepatitis viruses. <i>Nat Rev Microbiol</i> 17 (2023) doi: <u>10.1038/s41579-023-00889-z</u> .	12. 1–
42 43 44	Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J. & Kamar, N. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections <i>J Clin Med</i> <b>9</b> , 331 (2020)	13. s
45		14.
46 47 48	Nilsson, J., Persson, B. & von Heijne, G. Comparative analysis of amino acid distributions in integra membrane proteins from 107 genomes. <i>Proteins</i> <b>60</b> , 606–616 (2005).	l 15.
49 50	von Heijne, G. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. <i>Nature</i> <b>341</b> , 456–458 (1989).	16
52 53	Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. & Kornfeld, S. Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network. <i>Science</i> <b>297</b> , 1700–1703 (2002).	10.
54 55 56	Hirst, J. et al. Correction: The Fifth Adaptor Protein Complex. PLoS Biol 10, (2012).	17. 18
57 58	Klumperman, J. <i>et al.</i> Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. <i>Journal of Cell Biology</i> <b>121</b> , 997–1010 (1993).	.0.
59		19.

23

1.

1 2	Tu, Y., Zhao, L., Billadeau, D. D. & Jia, D. Endosome-to-TGN Trafficking: Organelle-Vesicle and Organelle-Organelle Interactions. <i>Front. Cell Dev. Biol.</i> <b>8</b> , 163 (2020).	
3 4 5	Kamar, N. et al. Hepatitis E virus infection. Nat Rev Dis Primers 3, 17086 (2017).	20.
5 6 7	Montpellier, C. <i>et al.</i> Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. <i>Gastroenterology</i> <b>154</b> , 211-223.e8 (2018).	21.
8 9 10	Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R. E. & Ploss, A. Hepatitis E virus: advances and challenges. <i>N Rev Gastroenterol Hepatol</i> <b>15</b> , 96–110 (2018).	22. lat
11 12	Pischke, S. et al. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? J Hepatol 66, 1082–1095 (2017).	23.
13 14 15	Webb, G. W. & Dalton, H. R. Hepatitis E: an expanding epidemic with a range of complications. <i>Clinical Microbiology and Infection</i> <b>26</b> , 828–832 (2020).	24.
16 17 18	Purdy, M. A. <i>et al.</i> ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. <i>Journal of General Virology</i> <b>103</b> , (2022).	25.
19 20 21	Luzio, J. P. <i>et al.</i> Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). <i>Biochem J</i> <b>270</b> , 97–102 (1990).	26.
22 23 24	Ghosh, P., Dahms, N. M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. <i>Na Rev Mol Cell Biol</i> <b>4</b> , 202–212 (2003).	27. t
25 26 27	Duncan, M. C. New directions for the clathrin adaptor AP-1 in cell biology and human disease. <i>Curr Opinion in Cell Biology</i> <b>76</b> , 102079 (2022).	28. ent
28 29 30	Ankavay, M. <i>et al.</i> New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. <i>Sci Rep</i> <b>9</b> , 6243 (2019).	29.
31 32 33 34	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. <i>J Virol</i> <b>80</b> , 10457 10464 (2006)	30. '_
35 36 37	Yin, X. <i>et al.</i> Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> <b>115</b> , 4773–4778 (2018).	31. on.
38 39 40	Wan, L. <i>et al.</i> PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Go network localization. <i>Cell</i> <b>94</b> , 205–216 (1998).	32. olgi
41 42 43	Gouttenoire, J. <i>et al.</i> Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 prote and is required for infectious particle secretion. <i>PLoS Pathog</i> <b>14</b> , e1007471 (2018).	33. ein
44 45 46	Wang, Y. J. <i>et al.</i> Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Goldi. <i>Cell</i> <b>114</b> , 299–310 (2003)	34.
47 48 49	Metzger, K. <i>et al.</i> Processing and Subcellular Localization of the Hepatitis E Virus Replicase: Identification of Candidate Viral Factories. <i>Front Microbiol</i> <b>13</b> , 828636 (2022).	35.
50 51 52 53	Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L. & Hoflack, B. Proteomic analysis of adaptor protein 1A coats selectively assembled on liposomes. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> <b>103</b> , 3159–3164 (2006).	30.
54 55 56	Shin, J., Nile, A. & Oh, JW. Role of adaptin protein complexes in intracellular trafficking and their impact on diseases. <i>Bioengineered</i> <b>12</b> , 8259–8278 (2021).	37.
57 58 59	Dao Thi, V. L. <i>et al.</i> Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Addit Effect When Combined With Ribavirin. <i>Gastroenterology</i> <b>150</b> , 82-85.e4 (2016).	38. tive
60		39.

1 2 2	Ren, X., Farías, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S. & Hurley, J. H. Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. <i>Cell</i> <b>152</b> , 755–767 (2013).	40
5 4 5	Bock, J. B., Klumperman, J., Davanger, S. & Scheller, R. H. Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. <i>MBoC</i> 8, 1261–1271 (1997).	40.
6 7 8	Ghosh, P. & Kornfeld, S. The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. <i>Arch Biochem Biophys</i> <b>426</b> , 225–230 (2004).	41.
9 10 11	Bentaleb, C. <i>et al.</i> The endocytic recycling compartment serves as a viral factory for hepatitis E viru <i>Cell Mol Life Sci</i> <b>79</b> , 615 (2022).	42. IS.
12 13 14 15 16	Chandra, V., Kar-Roy, A., Kumari, S., Mayor, S. & Jameel, S. The Hepatitis E Virus ORF3 Protein Modulates Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking, STAT3 Translocation, and the Acute-Pha Response. <i>J Virol</i> <b>82</b> , 7100–7110 (2008).	43. ase 44
17 18 19	Nagashima, S. <i>et al.</i> The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. <i>Arch Virol</i> <b>159</b> , 979–991 (2014)	. 45
20 21	Graff, J. <i>et al.</i> The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a <i>cis</i> -Reactive Elem and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. <i>J Virol</i> <b>79</b> , 6680–6689 (2005).	ient
22 23 24	Romero-Brey, I. <i>et al.</i> Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. <i>PLoS Pathog</i> <b>8</b> , e1003056 (2012).	40.
25 26 27 29	Tavares, L. A. <i>et al.</i> Two Functional Variants of AP-1 Complexes Composed of either $\gamma^2$ or $\gamma^1$ Subunits Are Independently Required for Major Histocompatibility Complex Class I Downregulation	47. by
20 29 30 21	Lebrun, M. <i>et al.</i> Varicella-Zoster Virus ORF9p Binding to Cellular Adaptor Protein Complex 1 Is	48.
32 33 24	Lenggenhager, D. <i>et al.</i> Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. <i>J</i>	49.
34 35 36 37	Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A. & Pavio, N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. <i>Viruses</i> <b>8</b> , 270 (2016)	50.
38		51.
39 40	World Health Organization. Viral Hepatitis. June 24, 2022. Available from: <u>https://www.who.int/ne</u>	WS-
41 42 43 44	Zallocchi, M., Delimont, D., Meehan, D. T. & Cosgrove, D. Regulated Vesicular Trafficking of Specif PCDH15 and VLGR1 Variants in Auditory Hair Cells. <i>J. Neurosci.</i> <b>32</b> , 13841–13859 (2012).	52. fic
45		
46		
47		
48		
49		
50		

- **Table 1.** Primary antibodies used in Western blot (WB) and immunofluorescence (IF) experiments.

Name	Target	Host	lsotype	Source	References	Ab registry	WB	IF
P1H1	ORF2i	Mouse	lgG3	Home-made	Bentaleb et	n/a	n/a	1/500
					al., 2022			
P3H2	ORF2i/g/c	Mouse	lgG3	Home-made	Bentaleb et	n/a	n/a	1/500
					al., 2022			
1E6	ORF2i/g/c	Mouse	lgG2b	Millipore	MAB8002	AB_827236	1/2000	1/800
ORF3	ORF3	Rabbit	pAb	S. Emerson	Graff et al.,	n/a	n/a	1/1000
					2005			
ORF3	ORF3	Rabbit	pAb	Bioss	BS-0212R	AB_11056616	1/500	n/a
GRP78	GRP78	Rat	pAb	Santa Cruz	sc-16539	n/a	1/1000	n/a
				Biotechnology				
Tubulin	eta-Tubulin Cter	Mouse	lgG1	Sigma	T5201	AB_609915	1/4000	n/a
	region							
AP-1G1	AP-1G1	Rabbit	pAb	Abcam	ab220251	n/a	1/300	1/250
AP-2B1	AP-2B1	Rabbit	pAb	Proteintech	15690-1-AP	AB_2056351	n/a	1/200
Clathrin	Clathrin heavy	Rabbit	pAb	Cell signaling	#2410	AB_2083156	n/a	1/100
	chain							
M6PR	Cation-	Rabbit	pAb	B. Hoflack	Meresse et	n/a	n/a	1/500
	independant				Hoflack,			
	Mannose-6-				1993			
	phosphate							
	receptor							
Rab11	Rab11	Rabbit	pAb	Cell signaling	#5589	AB_10693925	n/a	1/50
TGN46	Trans-Golgi	Sheep	pAb	Biorad	AHP500GT	AB_2203291	n/a	1/200
	Network			Laboratories				
	46kDa protein							
Syntaxin-6	Syntaxin-6	Mouse	lgG1	BD	610635	AB_397965	n/a	1/500
				Transduction				
				laboratories				

- 1 Figures legends
- 2

3 Figure1: HEV-gt1 and -gt3 ORF2i protein colocalizes with AP-1 complex in hepatoma cell lines. 4 Electroporated PLC3/HEV (a) or Huh7.5/HEV (b) cells were fixed at 6 d.p.e, while infected Huh-7.5 cells 5 (c) were fixed at 12 d.p.i. The pTM-ORF2-p6 (d) and pTM-ORF2-Sar55 (e) transfected H7-T7-IZ cells 6 were fixed at 24 h.p.t. Cells were then permeabilized with cold methanol and 0.5% Triton X-100 and 7 double-stained with anti-ORF2i P1H1 and anti-AP-1v1 antibodies. Staining were analyzed by confocal 8 microscopy. Red=ORF2i; Green=AP-1; Blue=DAPI. Scale bar, 20 µM. (a-e) On the right, line graphs 9 show overlaps of fluorescence intensities of ORF2i and AP-1 staining measured every 50 nm across 10 the region of interest (ROI) highlighted by the white line on the "Merge" micrograph of each panel. (f) 11 Mander's overlap coefficients (MOC) of the ORF2i labeling in the AP-1 labelling using the whole cell as 12 ROI. Mann-Whitney test, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001

13

14 Figure 2: HEV ORF2i protein interacts with AP-1 complex in hepatoma cell lines. (a) PLC3/HEV 15 and PLC3 cell lysates were immunoprecipitated using a polyclonal anti-AP-1antibody (IP AP-1). An 16 irrelevant rabbit IgG antibody was used as an isotype control (Iso). Inputs and immunoprecipitated AP-17 1 and ORF2 proteins were next detected by WB. (b) PLC3/HEV/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV/A5-150µM and 18 PLC3/H<sub>2</sub>O cells were processed for proximity ligation assay using anti-ORF2i P1H1 and anti-AP-1γ1 19 antibodies after 3 days of treatment. Stacks of images corresponding to the total volume of the cells 20 were acquired, and maximum intensity projections of the stacks were generated. For each condition, 12 21 fields of cells were analyzed (total cell number >150 cells). Representative fields and quantification of 22 spot/cell (bottom right) are shown. Kruskal-Wallis test, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001

23

# Figure 3: AP-1 complex pharmacological inhibition by A5 impairs ORF2i subcellular localization and colocalization with various viral/host cell markers. (a-g) PLC3/HEV cells were treated with H<sub>2</sub>O or A5 (150µM) and fixed after 3 days of treatment. Then, cells were permeabilized with cold methanol and 0.5% Triton X-100 and double-stained with the indicated antibodies. For each double staining, MOC of the ORF2i labeling in the cellular marker/ORF3 labelling was determined using the whole cell as ROI. Mann-Whitney test, \*\*\*\*p < 0.0001</li>

#### 1 Figure 4: AP-1 complex pharmacological inhibition by A5 alters viral RNA secretion and particle

production. (a) Supernatants and cell lysates of PLC3/HEV/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV/A5-150µM, PLC3/H<sub>2</sub>O
cells were generated after 3 days of treatment. In supernatants, ORF2i and ORF2g/c proteins were
immunoprecipitated using anti-ORF2i P1H1 or anti-ORF2i/g/c P3H2 antibodies, respectively. An
irrelevant mouse IgG antibody was used as an isotype control (Iso). ORF2 proteins were detected by
WB using the 1E6 antibody. In cell lysates, ORF2i protein was detected by WB using 1E6 antibody.
GRP78 and Tubulin proteins were detected using a rat anti-GRP78 antibody and a mouse anti-β-Tubulin
antibody, respectively. (b) HEV RNA quantification in PLC3/HEV/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV/A5-150µM,

9 PLC3/HEV/DMSO, PLC3/HEV/Sofosbuvir-20µM or PLC3 cells after 3 days of treatment. Extracellular

10 and intracellular viral RNAs were quantified by RT-qPCR. Titers were adjusted to 100% for H<sub>2</sub>O/DMSO-

 $11 \qquad \text{treated cells. PLC3/HEV/Sofosbuvir-20} \mu\text{M cells were used as a positive control for replication inhibition.}$ 

12 (c) Infectious titer determination in PLC3/HEV/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV/A5-150µM, PLC3/HEV/DMSO,

13 PLC3/HEV/Sofosbuvir-20 $\mu$ M or PLC3 cells after 3 days of treatment. Extracellular and intracellular viral 14 particles were used to infect naïve Huh-7.5 cells for 3 days. Cells were next processed for indirect 15 immunofluorescence. ORF2-positive cells were counted and each positive cell focus was considered as 16 one FFU. Titers were adjusted to 100% for H<sub>2</sub>O/DMSO-treated cells. PLC3/HEV/Sofosbuvir-20 $\mu$ M cells 17 were used as a positive control for infectious titers inhibition. Mann-Whitney test, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 18 0.0001

19

# Figure 5: AP-1γ1 silencing affects ORF2i subcellular localization and colocalization with various viral/host cell markers. (a-d) PLC3/HEV cells were transfected with siRNA targeting AP-1γ1 (siAP 1γ1), with a non-targeting control siRNA (siCTL). At 3 d.p.t, cells were permeabilized with cold methanol

 $1\gamma$ 1), with a non-targeting control siRNA (siCTL). At 3 d.p.t, cells were permeabilized with cold methanol and 0.5% Triton X-100 and double-stained with the indicated antibodies. For each double staining, MOC of the ORF2i labeling in the cellular marker/ORF3 labelling were determined using the whole cell as ROI. Mann-Whitney test, \*\*\*\*p < 0.0001

26

Figure 6: AP-1γ1 silencing affects viral RNA secretion and particle production. (a) Supernatants
and cell lysates of non-transfected PLC3/HEV (PLC3/HEV/NT), PLC3/HEV/siCTL, PLC3/HEV/siAP-1γ1
or PLC3 cells were generated 3 days after siRNA transfection. In supernatants, ORF2i and ORF2g/c
proteins were immunoprecipitated using anti-ORF2i P1H1 or anti-ORF2i/g/c P3H2 antibodies,

respectively. An irrelevant mouse IgG antibody was used as an isotype control (Iso). ORF2 proteins
 were detected by WB using the 1E6 antibody. In cell lysates, ORF2i protein was detected by WB using
 the 1E6 antibody. GRP78 and Tubulin proteins were detected using a rat anti-GRP78 antibody and a
 mouse anti-β-Tubulin antibody, respectively. (b) HEV RNA quantification in PLC3/HEV/siCTL,

5 PLC3/HEV/siAP-1γ1, PLC3/HEV/DMSO, PLC3/HEV/Sofosbuvir-20μM or PLC3 cells after 3 days of
6 transfection/treatment. Extracellular and intracellular viral RNAs were quantified by RT-qPCR. Titers
7 were adjusted to 100% for siCTL/DMSO-treated cells. PLC3/HEV/Sofosbuvir-20μM cells were used as
8 a positive control for replication inhibition. (c) Infectious titer determination in PLC3/HEV/siCTL,

9 PLC3/HEV/siAP-1 $\gamma$ 1, PLC3/HEV/DMSO, PLC3/HEV/Sofosbuvir-20 $\mu$ M or PLC3 cells after 3 days of 10 transfection/treatment. Extracellular and intracellular viral particles were used to infect naïve Huh-7.5 11 cells for 3 days. Cells were next processed for indirect immunofluorescence. ORF2-positive cells were 12 counted and each positive cell focus was considered as one FFU. Titers were adjusted to 100% for 13 siCTL/DMSO-treated cells. PLC3/HEV/Sofosbuvir-20 $\mu$ M cells were used as a positive control for 14 infectious titers inhibition. Mann-Whitney test, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001

15

16 Figure 7: AP-1 complex is involved in particle production in primary human hepatocytes. (a) 17 Experimental procedure. One day after seeding (D-0), primary human hepatocytes (PHHs) were 18 infected with intracellular HEV particles and treated with the appropriate drug/diluent. At D+1 and D+2, 19 fresh medium containing drug/diluent was added to the wells. At D+3, supernatants were recovered and 20 processed for WB and extracellular infectious titers determination. D = Day. (b) Supernatant of HEV-21 infected PHHs or Mock PHHs, treated or not with diluent (H<sub>2</sub>O or DMSO), A5-150µM (A5) or Ribavirin-22 25µM (RBV) were subjected to western blotting to detect the ORF2g protein using the 1E6 Ab. The 23 asterisk indicates a non-specific band detected in HEV-infected cells. (c) Supernatants were used to 24 infect naïve Huh-7.5 cells for 3 days to determine extracellular infectious titers. Cells were next 25 processed for indirect immunofluorescence. ORF2-positive cells were counted and each positive cell

focus was considered as one FFU. Results were expressed in relative infectious titers. PHHs-Ribavirin 25µM (RBV) cells were used as a positive control for infectious titers inhibition. Mann-Whitney test, \*\*p
 < 0.01</li>

1 Figure 8: Model of ORF2i protein addressing to viral factories by AP-1 complex. Newly produced 2 ORF2i proteins are anchored in secretion pathway membranes through their Nter and oriented toward 3 the cytosol. ORF2i protein then interacts with AP-1 complex in TGN to generate ORF2i protein/AP-1 4 complex-positive transport vesicles, in a clathrin dependent-manner. The transport vesicles transit to 5 the endosomal recycling compartment (ERC) that constitutes viral factories where ORF2i protein 6 colocalizes with the ERC resident marker Rab11. The enrichment of ORF1, ORF2i, ORF3 proteins and 7 viral RNA in viral factories leads to viral assembly and production/secretion of infectious HEV particles. 8 The inhibition of AP-1 complex activity either by A5 molecule or by silencing the AP-1γ1 adaptin (siAP-9 1y1) prevents the ORF2i protein/AP-1 complex interaction, resulting in the absence of AP-1-positive 10 vesicles containing ORF2i protein. In this context, ORF2i protein is no longer addressed to ERC/viral factories and does not colocalize with Rab11. Such process likely interferes with viral assembly, 11 12 resulting in a significant reduction of infectious HEV particles production/secretion and ORF2i protein 13 detection in culture supernatant.

# **1** Supplementary figures

- Figure S1: Dose-response curve of PLC3 cells treated with A5. Cell viability was assessed using a
   MTS based assay after 72 hours of treatment. Cells treated with the diluent (H<sub>2</sub>O) were used as control
   and plot as 100% of viability.
- 6

2

# 7 Figure S2: Confocal analysis of ORF2i and AP-1 staining in mock-transfected/infected hepatoma

8 cell lines. Mock-electroporated PLC3 (a) or Huh-7.5 (b) cells were fixed at 6 d.p.e, while mock-infected

9 Huh-7.5 cells (c) were fixed at 12 d.p.i. (d) H7-T7-IZ cells transfected with the empty pTM vector were

10 fixed at 24 h.p.t. Cells were then permeabilized with cold methanol and 0.5% Triton X-100 and double-

11 stained with anti-ORF2i P1H1 and anti-AP-1γ1 antibodies. Red=ORF2i ; Green= AP-1γ1 (AP1);

12 Blue=Dapi. Staining was analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 20 µM. (**a-d**) On the right, line

13 graphs show the overlap of fluorescence intensities of ORF2i and AP-1 staining measured every 50 nm

- 14 across the region of interest highlighted by the white line on the "Merge" micrograph of each panel.
- 15

# 16 Figure S3: Subcellular distribution of various host cell markers in Mock-electroporated cells.

17 Mock-electroporated PLC3 cells were fixed, then permeabilized with cold methanol and 0.5% Triton X-

- 18 100 and double-stained with the indicated antibodies.
- 19

# 20 Figure S4: Impact of A5 treatment or AP-1γ1 silencing on the subcellular localization of AP-2

21 adaptor complex. PLC3/HEV/H<sub>2</sub>O, PLC3/HEV/A5-150µM and PLC3 cells (a) or PLC3/HEV/NT,

22 PLC3/HEV/siCTL and PLC3/HEV/siAP-1γ1 (b) were fixed 3 days post-treatment/transfection. Then,

cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 and stained with a rabbit anti-AP-2β1 polyclonal
antibody.






Figure 2



Figure 3





Figure 5



Figure 6



Figure 7







Figure S1



## Mock electroporated PLC3 cells



Figure S3



Figure S4

## **Bibliographie**

- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.-M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N.G., Boileau, C., 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet 34, 154–156. <u>https://doi.org/10.1038/ng1161</u>
- Abraham, N.G., Kappas, A., 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. Pharmacol Rev 60, 79–127. <u>https://doi.org/10.1124/pr.107.07104</u>
- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Miedougé, M., Peron, J.-M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J., 2013. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. J Clin Virol 58, 624–628. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.003
- Abravanel, F., Lhomme, S., El Costa, H., Schvartz, B., Peron, J.-M., Kamar, N., Izopet, J., 2017. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. Emerg. Infect. Dis. 23, 1191–1193. https://doi.org/10.3201/eid2307.170318
- Abravanel, F., Nicot, F., Lhomme, S., Cazabat, M., Drumel, T., Velay, A., Latour, J., Belliere, J., Cintas, P., Kamar, N., Izopet, J., 2021. Hepatitis E Virus Quasispecies in Cerebrospinal Fluid with Neurological Manifestations. Vaccines (Basel) 9, 1205. <u>https://doi.org/10.3390/vaccines9101205</u>
- Adegboro, B., Lawani, O.A., Oriaifo, S.E., Abayomi, S.A., 2021. A review of the anti-viral effects of ivermectin. Af J Clin Exp Micro 22, 322–329. <u>https://doi.org/10.4314/ajcem.v22i3.2</u>
- Aggarwal, R., Goel, A., 2019. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 2 Infections. Cold Spring Harb Perspect Med 9, a032136. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032136</u>
- Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S., 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. Virus Research 161, 47–58. <u>https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.011</u>
- Ahmed, Z., Holla, P., Ahmad, I., Jameel, S., 2016. The ATP synthase subunit β (ATP5B) is an entry factor for the hepatitis E virus (preprint). Cell Biology. <u>https://doi.org/10.1101/060434</u>
- Ait-Goughoulte, M., Hourioux, C., Patient, R., Trassard, S., Brand, D., Roingeard, P., 2006. Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. J Gen Virol 87, 855–860. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.81664-0</u>
- Aizawa, S., Okamoto, T., Sugiyama, Y., Kouwaki, T., Ito, A., Suzuki, T., Ono, C., Fukuhara, T., Yamamoto, M., Okochi, M., Hiraga, N., Imamura, M., Chayama, K., Suzuki, R., Shoji, I., Moriishi, K., Moriya, K., Koike, K., Matsuura, Y., 2016. TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. Nat Commun 7, 11379. https://doi.org/10.1038/ncomms11379
- Al-Ayoubi, J., Behrendt, P., Bremer, B., Suneetha, P.V., Gisa, A., Rinker, F., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Kraft, A.R.M., 2018. Hepatitis E virus ORF 1 induces proliferative and functional T-cell responses in patients with ongoing and resolved hepatitis E. Liver Int 38, 266–277. <u>https://doi.org/10.1111/liv.13521</u>

- Alhammad, Y.M.O., Fehr, A.R., 2020. The Viral Macrodomain Counters Host Antiviral ADP-Ribosylation. Viruses 12, 384. <u>https://doi.org/10.3390/v12040384</u>
- Allen, S.J., Mott, K.R., Ghiasi, H., 2014. Inhibitors of signal peptide peptidase (SPP) affect HSV-1 infectivity in vitro and in vivo. Experimental Eye Research 123, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.004
- Anang, S., Kaushik, N., Surjit, M., 2018. Recent Advances Towards the Development of a Potent Antiviral Against the Hepatitis E Virus. J Clin Transl Hepatol 6, 310–316. https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00005
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., Thomas, G., 1993. Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. Journal of Biological Chemistry 268, 24887–24891. <u>https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74548-7</u>
- Ankavay, M., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2018. [The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself]. Med Sci (Paris) 34, 1071–1078. <u>https://doi.org/10.1051/medsci/2018299</u>
- Ankavay, M., Montpellier, C., Sayed, I.M., Saliou, J.-M., Wychowski, C., Saas, L., Duvet, S., Aliouat-Denis, C.-M., Farhat, R., de Masson d'Autume, V., Meuleman, P., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2019. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. Sci Rep 9, 6243. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42737-2
- Ansari, I.H., Nanda, S.K., Durgapal, H., Agrawal, S., Mohanty, S.K., Gupta, D., Jameel, S., Panda, S.K., 2000. Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1). J Med Virol 60, 275–283.
- 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, 199–204. <u>https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80062-2</u>
- Aslan, A.T., Balaban, H.Y., 2020. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. WJG 26, 5543–5560. <u>https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543</u>
- Assil, S., Coléon, S., Dong, C., Décembre, E., Sherry, L., Allatif, O., Webster, B., Dreux, M., 2019. Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. Cell Host Microbe 25, 730-745.e6. <u>https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.005</u>
- Atkinson, S.C., Audsley, M.D., Lieu, K.G., Marsh, G.A., Thomas, D.R., Heaton, S.M., Paxman, J.J., Wagstaff, K.M., Buckle, A.M., Moseley, G.W., Jans, D.A., Borg, N.A., 2018. Recognition by host nuclear transport proteins drives disorder-to-order transition in Hendra virus V. Sci Rep 8, 358. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18742-8
- Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., Grompe, M., 2007. Robust expansion of human hepatocytes in Fah-/-/Rag2-/-/Il2rg-/- mice. Nat Biotechnol 25, 903–910. <u>https://doi.org/10.1038/nbt1326</u>
- Baechlein, C., Schielke, A., Johne, R., Ulrich, R.G., Baumgaertner, W., Grummer, B., 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. Vet Microbiol 144, 187–191. <u>https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.011</u>

- Bahbouhi, B., Seidah, N.G., Bahraoui, E., 2001. Replication of HIV-1 viruses in the presence of the Portland alpha1-antitrypsin variant (alpha1-PDX) inhibitor. Biochem J 360, 127–134. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600127
- Bai, H., Ami, Y., Suzaki, Y., Doan, Y.H., Muramatsu, M., Li, T.-C., 2023. Open Reading Frame 4 Is Not Essential in the Replication and Infection of Genotype 1 Hepatitis E Virus. Viruses 15, 784. https://doi.org/10.3390/v15030784
- Bakhache, W., Couderc, É., Neyret, A., Briant, L., 2019. [Architecture and biogenesis of positive-stranded RNA virus replication organelles]. Virologie (Montrouge) 23, 160–175. https://doi.org/10.1684/vir.2019.0779
- Balayart, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., Poleschuk, V.F., 1983. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. Intervirology 20, 23–31. <u>https://doi.org/10.1159/000149370</u>
- Barajas, D., Jiang, Y., Nagy, P.D., 2009. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. PLoS Pathog 5, e1000705. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000705</u>
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Penin, F., 2013. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. Nat Rev Microbiol 11, 482–496. https://doi.org/10.1038/nrmicro3046
- Basak, A., Banik, U.K., Basak, S., Seidah, N.G., Li, S., 2006. Evaluation of Anti-Proprotein Convertase Activity of Diterpene Andrographolid Derived Products, in: Khatib, A.-M. (Ed.), Regulation of Carcinogenesis, Angiogenesis and Metastasis by the Proprotein Convertases (PCs). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 137–154. <u>https://doi.org/10.1007/1-4020-5132-8 8</u>
- Basak, S., Chrétien, M., Mbikay, M., Basak, A., 2004. In vitro elucidation of substrate specificity and bioassay of proprotein convertase 4 using intramolecularly quenched fluorogenic peptides. Biochem J 380, 505–514. <u>https://doi.org/10.1042/BJ20031405</u>
- Baumforth, K.R.N., Birgersdotter, A., Reynolds, G.M., Wei, W., Kapatai, G., Flavell, J.R., Kalk, E., Piper, K., Lee, S., Machado, L., Hadley, K., Sundblad, A., Sjoberg, J., Bjorkholm, M., Porwit, A.A., Yap, L.-F., Teo, S., Grundy, R.G., Young, L.S., Ernberg, I., Woodman, C.B.J., Murray, P.G., 2008. Expression of the Epstein-Barr Virus-Encoded Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Hodgkin's Lymphoma Cells Mediates Up-Regulation of CCL20 and the Migration of Regulatory T Cells. The American Journal of Pathology 173, 195–204. <u>https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070845</u>
- Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L., Hoflack, B., 2006. Proteomic analysis of adaptor protein 1A coats selectively assembled on liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 3159–3164. https://doi.org/10.1073/pnas.0511062103
- Bayati, A., Kumar, R., Francis, V., McPherson, P.S., 2021. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. J Biol Chem 296, 100306. https://doi.org/10.1016/i.jbc.2021.100306
- Beacham, G.M., Partlow, E.A., Hollopeter, G., 2019. Conformational regulation of AP1 and AP2 clathrin adaptor complexes. Traffic 20, 741–751. <u>https://doi.org/10.1111/tra.12677</u>
- Beer, A., Holzmann, H., Pischke, S., Behrendt, P., Wrba, F., Schlue, J., Drebber, U., Neudert, B., Halilbasic, E., Kreipe, H., Lohse, A., Sterneck, M., Wedemeyer, H., Manns, M., Dienes, H.P., 2019. Chronic Hepatitis E is associated with cholangitis. Liver Int 39, 1876–1883. https://doi.org/10.1111/liv.14137

- Behrendt, P., Bremer, B., Todt, D., Brown, R.J.P., Heim, A., Manns, M.P., Steinmann, E., Wedemeyer, H., 2016. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. J Infect Dis 214, 361–368. <u>https://doi.org/10.1093/infdis/jiw161</u>
- Behrendt, P., Steinmann, E., Manns, M.P., Wedemeyer, H., 2014. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. J Hepatol 61, 1418–1429. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.047</u>
- 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 Pathog 4, e1000216. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000216
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.-C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A.D., Rader, D.J., Boileau, C., Brissette, L., Chrétien, M., Prat, A., Seidah, N.G., 2004. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. J Biol Chem 279, 48865–48875. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M409699200</u>
- Best, J.D., Jay, M.T., Otu, F., Ma, J., Nadin, A., Ellis, S., Lewis, H.D., Pattison, C., Reilly, M., Harrison, T., Shearman, M.S., Williamson, T.L., Atack, J.R., 2005. Quantitative measurement of changes in amyloid-beta(40) in the rat brain and cerebrospinal fluid following treatment with the gammasecretase inhibitor LY-411575 [N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide]. J Pharmacol Exp Ther 313, 902–908. <u>https://doi.org/10.1124/jpet.104.081174</u>
- Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S.K., Acharya, S.K., 2008. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? Hepatology 48, 1577–1585. https://doi.org/10.1002/hep.22493
- Bi, Y., Yang, C., Yu, W., Zhao, X., Zhao, C., He, Z., Jing, S., Wang, H., Huang, F., 2015. Pregnancy serum facilitates hepatitis E virus replication in vitro. J Gen Virol 96, 1055–1061. https://doi.org/10.1099/vir.0.000054
- Biliotti, E., Franchi, C., Spaziante, M., Garbuglia, A.R., Volpicelli, L., Palazzo, D., De Angelis, M., Esvan, R., Taliani, G., 2018. Autochthonous acute hepatitis E: treatment with sofosbuvir and ribavirin. Infection 46, 725–727. <u>https://doi.org/10.1007/s15010-018-1168-7</u>
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouillé, Y., 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. J Virol 80, 6964–6972. https://doi.org/10.1128/JVI.00024-06
- Boehm, M., Bonifacino, J.S., 2001. Adaptins: The Final Recount. MBoC 12, 2907–2920. https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2907
- Bonamassa, B., Ciccarese, F., Antonio, V.D., Contarini, A., Palù, G., Alvisi, G., 2015. Hepatitis C virus and host cell nuclear transport machinery: a clandestine affair. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00619
- Boname, J.M., Bloor, S., Wandel, M.P., Nathan, J.A., Antrobus, R., Dingwell, K.S., Thurston, T.L., Smith, D.L., Smith, J.C., Randow, F., Lehner, P.J., 2014. Cleavage by signal peptide peptidase is required for the degradation of selected tail-anchored proteins. J Cell Biol 205, 847–862. https://doi.org/10.1083/jcb.201312009

- Borkakoti, J., Ahmed, G., Rai, A., Kar, P., 2017. Report of novel H105R, D29N, V27A mutations in the methyltransferase region of the HEV genome in patients with acute liver failure. J Clin Virol 91, 1–4. <u>https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.017</u>
- Borner, G.H.H., Antrobus, R., Hirst, J., Bhumbra, G.S., Kozik, P., Jackson, L.P., Sahlender, D.A., Robinson, M.S., 2012. Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. J Cell Biol 197, 141–160. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.201111049</u>
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R., Kirchhausen, T., 2010. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. PLoS One 5, e10597. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010597</u>
- Braun, E., Sauter, D., 2019. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. Clin Transl Immunol 8. <u>https://doi.org/10.1002/cti2.1073</u>
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 678–689. https://doi.org/10.1038/nrm2009
- Bremer, W., Blasczyk, H., Yin, X., Salinas, E., Grakoui, A., Feng, Z., Walker, C., 2021. Resolution of hepatitis E virus infection in CD8+ T cell-depleted rhesus macaques. J Hepatol 75, 557–564. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.04.036
- Broadbent, D.G., Barnaba, C., Perez, G.I., Schmidt, J.C., 2023. Quantitative analysis of autophagy reveals the role of ATG9 and ATG2 in autophagosome formation. J Cell Biol 222, e202210078. https://doi.org/10.1083/jcb.202210078
- Brown, A., Halliday, J.S., Swadling, L., Madden, R.G., Bendall, R., Hunter, J.G., Maggs, J., Simmonds, P., Smith, D.B., Vine, L., McLaughlin, C., Collier, J., Bonsall, D., Jeffery, K., Dunachie, S., Klenerman, P., Izopet, J., Kamar, N., Dalton, H.R., Barnes, E., 2016. Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. Hepatology 64, 1934–1950. <u>https://doi.org/10.1002/hep.28819</u>
- Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M., Gillespie, M.T., 1996. PC8 [corrected], a new member of the convertase family. Biochem J 314 (Pt 3), 727– 731. <u>https://doi.org/10.1042/bj3140727</u>
- Burgos, P.V., Mardones, G.A., Rojas, A.L., daSilva, L.L.P., Prabhu, Y., Hurley, J.H., Bonifacino, J.S., 2010. Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. Dev Cell 18, 425–436. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.015</u>
- Burri, D.J., Pasqual, G., Rochat, C., Seidah, N.G., Pasquato, A., Kunz, S., 2012. Molecular characterization of the processing of arenavirus envelope glycoprotein precursors by subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease. J Virol 86, 4935–4946. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00024-12</u>
- Cancela, F., Noceti, O., Arbiza, J., Mirazo, S., 2022. Structural aspects of hepatitis E virus. Arch Virol 167, 2457–2481. <u>https://doi.org/10.1007/s00705-022-05575-8</u>
- Cao, D., Cao, Q.M., Subramaniam, S., Yugo, D.M., Heffron, C.L., Rogers, A.J., Kenney, S.P., Tian, D., Matzinger, S.R., Overend, C., Catanzaro, N., LeRoith, T., Wang, H., Piñeyro, P., Lindstrom, N., Clark-Deener, S., Yuan, L., Meng, X.-J., 2017. Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 6914–6923. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1705446114</u>

- Cerutti, A., Maillard, P., Minisini, R., Vidalain, P.-O., Roohvand, F., Pecheur, E.-I., Pirisi, M., Budkowska, A., 2011. Identification of a Functional, CRM-1-Dependent Nuclear Export Signal in Hepatitis C Virus Core Protein. PLoS ONE 6, e25854. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025854</u>
- Cheema, S.S., Cheema, M.F., Gilani, S., Cheema, S.R., 2023. Immunoglobulin A nephropathy associated with acute hepatitis E infection: First case report. Clin Nephrol Case Stud 11, 95–98. https://doi.org/10.5414/CNCS111100
- Cheng, X., Wang, S., Dai, X., Shi, C., Wen, Y., Zhu, M., Zhan, S., Meng, J., 2012. Rabbit as a Novel Animal Model for Hepatitis E Virus Infection and Vaccine Evaluation. PLoS ONE 7, e51616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051616
- Cheng, X., Zhao, Y., Zhang, X., Jin, H., Min, J., 2017. Health economic evaluation of immunization strategies of hepatitis E vaccine for elderly population. Human Vaccines & Immunotherapeutics 13, 1873–1878. <u>https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1316913</u>
- Chilaka, V.N., Konje, J.C., 2021. Viral Hepatitis in pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 256, 287–296. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.11.052</u>
- Ciglenecki, I., Rumunu, J., Wamala, J.F., Nkemenang, P., Duncker, J., Nesbitt, R., Gignoux, E., Newport, T., Heile, M., Jamet, C., Rull, M., Azman, A.S., 2022. The first reactive vaccination campaign against hepatitis E. The Lancet Infectious Diseases 22, 1110–1111. <u>https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00421-2</u>
- Colson, P., Decoster, C., 2019. Recent data on hepatitis E. Curr Opin Infect Dis 32, 475–481. https://doi.org/10.1097/QC0.000000000000090
- Constam, D.B., Robertson, E.J., 2000. Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. Development 127, 245–254. https://doi.org/10.1242/dev.127.2.245
- Coric, V., Salloway, S., Van Dyck, C.H., Dubois, B., Andreasen, N., Brody, M., Curtis, C., Soininen, H., Thein, S., Shiovitz, T., Pilcher, G., Ferris, S., Colby, S., Kerselaers, W., Dockens, R., Soares, H., Kaplita, S., Luo, F., Pachai, C., Bracoud, L., Mintun, M., Grill, J.D., Marek, K., Seibyl, J., Cedarbaum, J.M., Albright, C., Feldman, H.H., Berman, R.M., 2015. Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial. JAMA Neurol 72, 1324. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0607
- Coric, V., Van Dyck, C.H., Salloway, S., Andreasen, N., Brody, M., Richter, R.W., Soininen, H., Thein, S., Shiovitz, T., Pilcher, G., Colby, S., Rollin, L., Dockens, R., Pachai, C., Portelius, E., Andreasson, U., Blennow, K., Soares, H., Albright, C., Feldman, H.H., Berman, R.M., 2012. Safety and Tolerability of the γ-Secretase Inhibitor Avagacestat in a Phase 2 Study of Mild to Moderate Alzheimer Disease. Arch Neurol 69, 1430. <u>https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.2194</u>
- Corneillie, L., Banda, D., Meuleman, P., 2019. Animal Models for Hepatitis E Virus. Viruses 11, 564. https://doi.org/10.3390/v11060564
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., Bartenschlager, R., 2017. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. Cell Reports 18, 2113–2123. <u>https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014</u>

- Dahms, S.O., Haider, T., Klebe, G., Steinmetzer, T., Brandstetter, H., 2021. OFF-State-Specific Inhibition of the Proprotein Convertase Furin. ACS Chem. Biol. 16, 1692–1700. https://doi.org/10.1021/acschembio.1c00411
- Dalton, H.R., Kamar, N., Van Eijk, J.J.J., Mclean, B.N., Cintas, P., Bendall, R.P., Jacobs, B.C., 2016. Hepatitis E virus and neurological injury. Nat Rev Neurol 12, 77–85. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.234
- 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. <u>https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.011</u>
- Dao Thi, V.L., Wu, X., Rice, C.M., 2019. Stem Cell-Derived Culture Models of Hepatitis E Virus Infection. Cold Spring Harb Perspect Med 9, a031799. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031799</u>
- Das, A., Rivera-Serrano, E.E., Yin, X., Walker, C.M., Feng, Z., Lemon, S.M., 2023. Cell entry and release of quasi-enveloped human hepatitis viruses. Nat Rev Microbiol 21, 573–589. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00889-z
- Davies, A.K., Itzhak, D.N., Edgar, J.R., Archuleta, T.L., Hirst, J., Jackson, L.P., Robinson, M.S., Borner, G.H.H., 2018. AP-4 vesicles contribute to spatial control of autophagy via RUSC-dependent peripheral delivery of ATG9A. Nat Commun 9, 3958. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-018-06172-7</u>
- Day, R., Schafer, M.K., Watson, S.J., Chrétien, M., Seidah, N.G., 1992. Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. Mol Endocrinol 6, 485–497. https://doi.org/10.1210/mend.6.3.1316544
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R., 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretaselike protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature 398, 518–522. https://doi.org/10.1038/19083
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature 391, 387–390. <u>https://doi.org/10.1038/34910</u>
- Debing, Y., Emerson, S.U., Wang, Y., Pan, Q., Balzarini, J., Dallmeier, K., Neyts, J., 2014. Ribavirin Inhibits *In Vitro* Hepatitis E Virus Replication through Depletion of Cellular GTP Pools and Is Moderately Synergistic with Alpha Interferon. Antimicrob Agents Chemother 58, 267–273. <u>https://doi.org/10.1128/AAC.01795-13</u>
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J., Gouttenoire, J., 2016. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. Journal of Hepatology 65, 200–212. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.045
- Declercq, J., Meulemans, S., Plets, E., Creemers, J.W.M., 2012. Internalization of proprotein convertase PC7 from plasma membrane is mediated by a novel motif. J Biol Chem 287, 9052–9060. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306407
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., Bonifacino, J.S., 1998. Association of the AP-3 Adaptor Complex with Clathrin. Science 280, 431–434. <u>https://doi.org/10.1126/science.280.5362.431</u>

- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., Bonifacino, J.S., 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. J Biol Chem 274, 7278–7285. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7278</u>
- Demangel, C., High, S., 2018. Sec61 blockade by mycolactone: A central mechanism in Buruli ulcer disease. Biol Cell 110, 237–248. <u>https://doi.org/10.1111/boc.201800030</u>
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. Journal of Interferon & Cytokine Research 29, 313–326. https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027
- Devhare, P., Madiyal, M., Mukhopadhyay, C., Shetty, S., Shastry, S., 2021. Interplay between Hepatitis E Virus and Host Cell Pattern Recognition Receptors. IJMS 22, 9259. <u>https://doi.org/10.3390/ijms22179259</u>
- Devhare, P.B., Chatterjee, S.N., Arankalle, V.A., Lole, K.S., 2013. Analysis of Antiviral Response in Human Epithelial Cells Infected with Hepatitis E Virus. PLoS ONE 8, e63793. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063793
- Dey, A., Norrbom, C., Zhu, X., Stein, J., Zhang, C., Ueda, K., Steiner, D.F., 2004. Furin and prohormone convertase 1/3 are major convertases in the processing of mouse pro-growth hormone-releasing hormone. Endocrinology 145, 1961–1971. <u>https://doi.org/10.1210/en.2003-1472</u>
- Diamond, D.L., Syder, A.J., Jacobs, J.M., Sorensen, C.M., Walters, K.-A., Proll, S.C., McDermott, J.E., Gritsenko, M.A., Zhang, Q., Zhao, R., Metz, T.O., Camp, D.G., Waters, K.M., Smith, R.D., Rice, C.M., Katze, M.G., 2010. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. PLoS Pathog 6, e1000719. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000719
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J.M.V., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J.E., Ploss, A., 2017. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 1147–1152. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1614955114</u>
- Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A., Pavio, N., 2016. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses 8, 270. <u>https://doi.org/10.3390/v8100270</u>
- Dong, C., Zafrullah, M., Mixson-Hayden, T., Dai, X., Liang, J., Meng, J., Kamili, S., 2012. Suppression of interferon-α signaling by hepatitis E virus. Hepatology 55, 1324–1332. https://doi.org/10.1002/hep.25530
- Dong, W., Marcinkiewicz, M., Vieau, D., Chrétien, M., Seidah, N.G., Day, R., 1995. Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. J Neurosci 15, 1778–1796. <u>https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01778.1995</u>
- Donnelly, M.C., Scobie, L., Crossan, C.L., Dalton, H., Hayes, P.C., Simpson, K.J., 2017. Review article: hepatitis E-a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. Aliment Pharmacol Ther 46, 126–141. <u>https://doi.org/10.1111/apt.14109</u>
- Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S., Bernstein, A., 1999. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. Genes Dev 13, 2801–2810. https://doi.org/10.1101/gad.13.21.2801
- Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Siemers, E., Sethuraman, G., Mohs, R., 2013. A Phase 3 Trial of Semagacestat for

Treatment of Alzheimer's Disease. N Engl J Med 369, 341–350. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210951

- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H.J., Kornfeld, S., 2002. Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network. Science 297, 1700–1703. https://doi.org/10.1126/science.1075327
- Dou, Q., Chen, H.-N., Wang, K., Yuan, K., Lei, Y., Li, K., Lan, J., Chen, Y., Huang, Z., Xie, N., Zhang, L., Xiang, R., Nice, E.C., Wei, Y., Huang, C., 2016. Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. Cancer Res 76, 4457–4469. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2887</u>
- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., Hu, K.L., Johnson-Wood, K.L., Kennedy, S.L., Kholodenko, D., Knops, J.E., Latimer, L.H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I.M., Motter, R.N., Mutter, L.C., Nietz, J., Quinn, K.P., Sacchi, K.L., Seubert, P.A., Shopp, G.M., Thorsett, E.D., Tung, J.S., Wu, J., Yang, S., Yin, C.T., Schenk, D.B., May, P.C., Altstiel, L.D., Bender, M.H., Boggs, L.N., Britton, T.C., Clemens, J.C., Czilli, D.L., Dieckman-McGinty, D.K., Droste, J.J., Fuson, K.S., Gitter, B.D., Hyslop, P.A., Johnstone, E.M., Li, W.Y., Little, S.P., Mabry, T.E., Miller, F.D., Audia, J.E., 2001. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. Neurochem 173-181. I 76, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00012.x
- Drexler, J.F., Seelen, A., Corman, V.M., Fumie Tateno, A., Cottontail, V., Melim Zerbinati, R., Gloza-Rausch, F., Klose, S.M., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S.K., Kalko, E.K.V., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Müller, M.A., Ulrich, R.G., Leroy, E.M., Lukashev, A.N., Drosten, C., 2012. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. J Virol 86, 9134–9147. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00800-12</u>
- Drinane, M., Jing Wang, X., Watt, K., 2019. Sofosbuvir and Ribavirin Eradication of Refractory Hepatitis E in an Immunosuppressed Kidney Transplant Recipient. Hepatology 69, 2297–2299. https://doi.org/10.1002/hep.30428
- Duncan, M.C., Ho, D.G., Huang, J., Jung, M.E., Payne, G.S., 2007. Composite synthetic lethal identification of membrane traffic inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 6235–6240. https://doi.org/10.1073/pnas.0607773104
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. J Virol 76, 5974–5984. <u>https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.5974-5984.2002</u>
- El-Mokhtar, M.A., Kamel, A.M., El-Sabaa, E.M.W., Mandour, S.A., Abdelmohsen, A.S., Moussa, A.M., Salama, E.H., Aboulfotuh, S., Abdel-Wahid, L., Abdel Aziz, E.M., Azoz, N.M.A., Sayed, I.M., Elkhawaga, A.A., 2023. Evidence of a Link between Hepatitis E Virus Exposure and Glomerulonephritis Development. Viruses 15, 1379. <u>https://doi.org/10.3390/v15061379</u>
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005. Thermal Stability of Hepatitis E Virus. J INFECT DIS 192, 930–933. <u>https://doi.org/10.1086/432488</u>
- Emerson, S.U., Zhang, M., Meng, X.J., Nguyen, H., St Claire, M., Govindarajan, S., Huang, Y.K., Purcell, R.H., 2001. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 15270–15275. https://doi.org/10.1073/pnas.251555098

- Farhat, R., Ankavay, M., Lebsir, N., Gouttenoire, J., Jackson, C.L., Wychowski, C., Moradpour, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Cocquerel, L., 2018. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis E virus RNA replication. Cell Microbiol 20, e12804. https://doi.org/10.1111/cmi.12804
- Fehr, A.R., Singh, S.A., Kerr, C.M., Mukai, S., Higashi, H., Aikawa, M., 2020. The impact of PARPs and ADPribosylation on inflammation and host-pathogen interactions. Genes Dev. 34, 341–359. https://doi.org/10.1101/gad.334425.119
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.-H., Walker, C., Lanford, R.E., Lemon, S.M., 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature 496, 367–371. <u>https://doi.org/10.1038/nature12029</u>
- Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K.L., Lemon, S.M., 2014. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. Annu Rev Virol 1, 539–560. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085359</u>
- Feurer, C., Le Roux, A., Rossel, R., Barnaud, E., Dumarest, M., Garry, P., Pavio, N., 2018. High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. Int J Food Microbiol 264, 25–30. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.013</u>
- Fieulaine, S., Tubiana, T., Bressanelli, S., 2023. De novo modelling of HEV replication polyprotein: Fivedomain breakdown and involvement of flexibility in functional regulation. Virology 578, 128–140. https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.12.002
- Fousekis, F.S., Mitselos, I.V., Christodoulou, D.K., 2020. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus: An overview. Clin Mol Hepatol 26, 16–23. <u>https://doi.org/10.3350/cmh.2019.0082</u>
- Friedmann, E., Lemberg, M.K., Weihofen, A., Dev, K.K., Dengler, U., Rovelli, G., Martoglio, B., 2004. Consensus Analysis of Signal Peptide Peptidase and Homologous Human Aspartic Proteases Reveals Opposite Topology of Catalytic Domains Compared with Presenilins. Journal of Biological Chemistry 279, 50790–50798. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M407898200</u>
- Frolova, E., Gorchakov, R., Garmashova, N., Atasheva, S., Vergara, L.A., Frolov, I., 2006. Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. J Virol 80, 4122–4134. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4122-4134.2006</u>
- Fu, R.M., Decker, C.C., Dao Thi, V.L., 2019. Cell Culture Models for Hepatitis E Virus. Viruses 11, 608. https://doi.org/10.3390/v11070608
- Furuta, M., Zhou, A., Webb, G., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Steiner, D.F., 2001. Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. J Biol Chem 276, 27197–27202. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M103362200</u>
- Geng, Y., Zhao, C., Huang, W., Harrison, T.J., Zhang, H., Geng, K., Wang, Y., 2016. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. J Hepatol 64, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.034
- Ghosh, P., Kornfeld, S., 2004. The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. Archives of Biochemistry and Biophysics 426, 225–230. <u>https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.011</u>
- Gillman, K.W., Starrett, J.E., Parker, M.F., Xie, K., Bronson, J.J., Marcin, L.R., McElhone, K.E., Bergstrom, C.P., Mate, R.A., Williams, R., Meredith, J.E., Burton, C.R., Barten, D.M., Toyn, J.H., Roberts, S.B., Lentz,

K.A., Houston, J.G., Zaczek, R., Albright, C.F., Decicco, C.P., Macor, J.E., Olson, R.E., 2010. Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable  $\gamma$ -Secretase Inhibitor. ACS Med. Chem. Lett. 1, 120–124. <u>https://doi.org/10.1021/ml1000239</u>

- Glitscher, M., Hildt, E., 2021. Hepatitis E virus egress and beyond the manifold roles of the viral ORF3 protein. Cellular Microbiology 23. <u>https://doi.org/10.1111/cmi.13379</u>
- Glitscher, M., Himmelsbach, K., Woytinek, K., Schollmeier, A., Johne, R., Praefcke, G.J.K., Hildt, E., 2021. Identification of the Interferon-Inducible GTPase GBP1 as a Major Restriction Factor for Hepatitis E Virus. J Virol 95, e01564-20. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.01564-20</u>
- Gömer, A., Klöhn, M., Jagst, M., Nocke, M., Pischke, S., Horvatits, T., Schulze Zur Wiesch, J., Müller, T., Hardtke, S., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Behrendt, P., Steinmann, E., Todt, D., 2023. Emergence of resistance-associated variants during sofosbuvir treatment in chronically infected hepatitis E patients. Hepatology. <u>https://doi.org/10.1097/HEP.00000000000514</u>
- Gouilly, J., Chen, Q., Siewiera, J., Cartron, G., Levy, C., Dubois, M., Al-Daccak, R., Izopet, J., Jabrane-Ferrat, N., El Costa, H., 2018. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternalfetal interface. Nat Commun 9, 4748. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-018-07200-2</u>
- Goulet, A., Cambillau, C., Roussel, A., Imbert, I., 2022. Structure Prediction and Analysis of Hepatitis E Virus Non-Structural Proteins from the Replication and Transcription Machinery by AlphaFold2. Viruses 14, 1537. <u>https://doi.org/10.3390/v14071537</u>
- Gounder, M., Ratan, R., Alcindor, T., Schöffski, P., van der Graaf, W.T., Wilky, B.A., Riedel, R.F., Lim, A., Smith, L.M., Moody, S., Attia, S., Chawla, S., D'Amato, G., Federman, N., Merriam, P., Van Tine, B.A., Vincenzi, B., Benson, C., Bui, N.Q., Chugh, R., Tinoco, G., Charlson, J., Dileo, P., Hartner, L., Lapeire, L., Mazzeo, F., Palmerini, E., Reichardt, P., Stacchiotti, S., Bailey, H.H., Burgess, M.A., Cote, G.M., Davis, L.E., Deshpande, H., Gelderblom, H., Grignani, G., Loggers, E., Philip, T., Pressey, J.G., Kummar, S., Kasper, B., 2023. Nirogacestat, a γ-Secretase Inhibitor for Desmoid Tumors. N Engl J Med 388, 898–912. <a href="https://doi.org/10.1056/NEJMoa2210140">https://doi.org/10.1056/NEJMoa2210140</a>
- Gouttenoire, J., Penin, F., Moradpour, D., 2010. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory: Hepatitis C virus nonstructural protein 4B. Rev. Med. Virol. 20, 117–129. <u>https://doi.org/10.1002/rmv.640</u>
- Gouttenoire, J., Pollán, A., Abrami, L., Oechslin, N., Mauron, J., Matter, M., Oppliger, J., Szkolnicka, D., Dao Thi, V.L., van der Goot, F.G., Moradpour, D., 2018. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. PLoS Pathog 14, e1007471. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007471
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. J Virol 80, 5919–5926. https://doi.org/10.1128/JVI.00046-06
- Gu, K., Li, Q., Lin, H., Zhu, J., Mo, J., He, S., Lu, X., Jiang, X., Sun, H., 2017. Gamma secretase inhibitors: a patent review (2013 2015). Expert Opin Ther Pat 27, 851–866. https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1313231
- Gupta, J., Kaul, S., Srivastava, A., Kaushik, N., Ghosh, S., Sharma, C., Batra, G., Banerjee, M., Shalimar, Nayak, B., Ranjith-Kumar, C.T., Surjit, M., 2020. Expression, Purification and Characterization of the Hepatitis E Virus Like-Particles in the Pichia pastoris. Front. Microbiol. 11, 141. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00141

- Gyamera-Acheampong, C., Mbikay, M., 2009. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: a review. Hum Reprod Update 15, 237–247. https://doi.org/10.1093/humupd/dmn060
- Haffar, S., Shalimar, Kaur, R.J., Wang, Z., Prokop, L.J., Murad, M.H., Bazerbachi, F., 2018. Acute liver failure caused by hepatitis E virus genotype 3 and 4: A systematic review and pooled analysis. Liver Int 38, 1965–1973. <u>https://doi.org/10.1111/liv.13861</u>
- Haldipur, B., Bhukya, P.L., Arankalle, V., Lole, K., 2018. Positive Regulation of Hepatitis E Virus Replication by MicroRNA-122. J Virol 92, e01999-17. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.01999-17</u>
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., Garten, W., 1992. Inhibition of furinmediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. Nature 360, 358–361. <u>https://doi.org/10.1038/360358a0</u>
- Hansrivijit, P., Trongtorsak, A., Puthenpura, M.M., Boonpheng, B., Thongprayoon, C., Wijarnpreecha, K., Choudhury, A., Kaewput, W., Mao, S.A., Mao, M.A., Jadlowiec, C.C., Cheungpasitporn, W., 2021. Hepatitis E in solid organ transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. World J Gastroenterol 27, 1240–1254. <u>https://doi.org/10.3748/wig.v27.i12.1240</u>
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J., 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. J Gen Virol 82, 2449–2462. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2449
- He, M., Wang, M., Huang, Y., Peng, W., Zheng, Z., Xia, N., Xu, J., Tian, D., 2016. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF-κB Signaling via TRADD and RIP1. Sci Rep 6, 27597. <u>https://doi.org/10.1038/srep27597</u>
- Helsen, N., Debing, Y., Paeshuyse, J., Dallmeier, K., Boon, R., Coll, M., Sancho-Bru, P., Claes, C., Neyts, J., Verfaillie, C.M., 2016. Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. Journal of Hepatology 64, 565–573. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.013</u>
- Henley, D.B., May, P.C., Dean, R.A., Siemers, E.R., 2009. Development of semagacestat (LY450139), a functional γ-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. Expert Opinion on Pharmacotherapy 10, 1657–1664. <u>https://doi.org/10.1517/14656560903044982</u>
- Henley, D.B., Sundell, K.L., Sethuraman, G., Dowsett, S.A., May, P.C., 2014. Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings. Current Medical Research and Opinion 30, 2021–2032. <u>https://doi.org/10.1185/03007995.2014.939167</u>
- Hervouet, K., Ferrié, M., Ankavay, M., Montpellier, C., Camuzet, C., Alexandre, V., Dembélé, A., Lecoeur, C., Foe, A.T., Bouquet, P., Hot, D., Vausselin, T., Saliou, J.-M., Salomé-Desnoulez, S., Vandeputte, A., Marsollier, L., Brodin, P., Dreux, M., Rouillé, Y., Dubuisson, J., Aliouat-Denis, C.-M., Cocquerel, L., 2022. An Arginine-Rich Motif in the ORF2 capsid protein regulates the hepatitis E virus lifecycle and interactions with the host cell. PLoS Pathog 18, e1010798. <a href="https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798">https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010798</a>
- Himmelsbach, K., Bender, D., Hildt, E., 2018. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. Emerging Microbes & Infections 7, 1–12. <u>https://doi.org/10.1038/s41426-018-0198-7</u>
- Hirano, J., Okamoto, T., Sugiyama, Y., Suzuki, T., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Fukuhara, T., Sasai, M., Tougan, T., Matsunaga, Y., Yamashita, K., Sakai, Y., Yamamoto, M., Horii, T., Standley, D.M., Moriishi, K., Moriya, K., Koike, K., Matsuura, Y., 2017. Characterization of SPP inhibitors suppressing

propagation of HCV and protozoa. Proc Natl Acad Sci U S A 114, E10782–E10791. https://doi.org/10.1073/pnas.1712484114

- Hirst, J., Barlow, L.D., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N.J., Dacks, J.B., Robinson, M.S., 2011. The fifth adaptor protein complex. PLoS Biol 9, e1001170. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001170</u>
- Hirst, J., Borner, G.H.H., Edgar, J., Hein, M.Y., Mann, M., Buchholz, F., Antrobus, R., Robinson, M.S., 2013. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. Mol Biol Cell 24, 2558–2569. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0170</u>
- Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B., Robinson, M.S., 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. Mol Biol Cell 10, 2787–2802. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2787</u>
- Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., Jameel, S., 2013. Molecular virology of hepatitis E virus. Semin Liver Dis 33, 3–14. <u>https://doi.org/10.1055/s-0033-1338110</u>
- Holmes, O., Paturi, S., Selkoe, D.J., Wolfe, M.S., 2014. Pen-2 Is Essential for γ-Secretase Complex Stability and Trafficking but Partially Dispensable for Endoproteolysis. Biochemistry 53, 4393–4406. https://doi.org/10.1021/bi500489j
- Hooda, P., Chaudhary, M., Parvez, M.K., Sinha, N., Sehgal, D., 2022. Inhibition of Hepatitis E Virus Replication by Novel Inhibitor Targeting Methyltransferase. Viruses 14, 1778. https://doi.org/10.3390/v14081778
- Horvatits, T., Schulze Zur Wiesch, J., Lütgehetmann, M., Lohse, A.W., Pischke, S., 2019. The Clinical Perspective on Hepatitis E. Viruses 11, 617. <u>https://doi.org/10.3390/v11070617</u>
- Huang, F., Yang, C., Yu, W., Bi, Y., Long, F., Wang, J., Li, Y., Jing, S., 2016. Hepatitis E virus infection activates signal regulator protein α to down-regulate type I interferon. Immunol Res 64, 115–122. https://doi.org/10.1007/s12026-015-8729-y
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Guenette, D.K., Woolcock, P.R., Larsen, C.T., Pierson, F.W., Elvinger, F., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. J Clin Microbiol 40, 4197–4202. https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4197-4202.2002
- Husain, M.M., Srivastava, R., Akondy, R., Aggarwal, R., Jameel, S., Naik, S., 2011. Evidence of Hepatitis E Virus Exposure among Seronegative Healthy Residents of an Endemic Area. Intervirology 54, 139–143. <u>https://doi.org/10.1159/000319840</u>
- Hyams, C., Mabayoje, D.A., Copping, R., Maranao, D., Patel, M., Labbett, W., Haque, T., Webster, D.P., 2014. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. J Med Virol 86, 478–483. <u>https://doi.org/10.1002/jmv.23827</u>
- Hyde, L.A., McHugh, N.A., Chen, J., Zhang, Q., Manfra, D., Nomeir, A.A., Josien, H., Bara, T., Clader, J.W., Zhang, L., Parker, E.M., Higgins, G.A., 2006. Studies to investigate the in vivo therapeutic window of the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY411,575) in the CRND8 mouse. J Pharmacol Exp Ther 319, 1133–1143. <a href="https://doi.org/10.1124/jpet.106.111716">https://doi.org/10.1124/jpet.106.111716</a>
- Iijima, S., Lee, Y.-J., Ode, H., Arold, S.T., Kimura, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tanaka, Y., Strebel, K., Akari, H., 2012. A Noncanonical mu-1A-Binding Motif in the N Terminus of HIV-1 Nef Determines Its

Ability To Downregulate Major Histocompatibility Complex Class I in T Lymphocytes. J Virol 86, 3944–3951. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.06257-11</u>

- Ilnytska, O., Santiana, M., Hsu, N.-Y., Du, W.-L., Chen, Y.-H., Viktorova, E.G., Belov, G., Brinker, A., Storch, J., Moore, C., Dixon, J.L., Altan-Bonnet, N., 2013. Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. Cell Host Microbe 14, 281–293. <u>https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.002</u>
- Imbimbo, B., Hutter-Paier, B., Villetti, G., Facchinetti, F., Cenacchi, V., Volta, R., Lanzillotta, A., Pizzi, M., Windisch, M., 2009. CHF5074, a novel γ-secretase modulator, attenuates brain β-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease: CHF5074 in transgenic human APP mice. British Journal of Pharmacology 156, 982–993. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00097.x
- Imbimbo, B.P., Del Giudice, E., Colavito, D., D'Arrigo, A., Carbonare, M.D., Villetti, G., Facchinetti, F., Volta, R., Pietrini, V., Baroc, M.F., Serneels, L., De Strooper, B., Leon, A., 2007. 1-(3',4'-Dichloro-2fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic Acid (CHF5074), a Novel γ-Secretase Modulator, Reduces Brain β-Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease without Causing Peripheral Toxicity. J Pharmacol Exp Ther 323, 822–830. https://doi.org/10.1124/jpet.107.129007
- Izaguirre, G., 2019. The Proteolytic Regulation of Virus Cell Entry by Furin and Other Proprotein Convertases. Viruses 11, 837. <u>https://doi.org/10.3390/v11090837</u>
- Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeau, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., Guérin, J.-L., 2012. Hepatitis E Virus Strains in Rabbits and Evidence of a Closely Related Strain in Humans, France. Emerg. Infect. Dis. 18. <u>https://doi.org/10.3201/eid1808.120057</u>
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nat Rev Mol Cell Biol 23, 3–20. <u>https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x</u>
- Jans, D.A., Martin, A.J., Wagstaff, K.M., 2019. Inhibitors of nuclear transport. Current Opinion in Cell Biology 58, 50–60. <u>https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.01.001</u>
- Jeblaoui, A., Haim-Boukobza, S., Marchadier, E., Mokhtari, C., Roque-Afonso, A.-M., 2013. Genotype 4 hepatitis e virus in france: an autochthonous infection with a more severe presentation. Clin Infect Dis 57, e122-126. <u>https://doi.org/10.1093/cid/cit291</u>
- Jiao, G.-S., Cregar, L., Wang, J., Millis, S.Z., Tang, C., O'Malley, S., Johnson, A.T., Sareth, S., Larson, J., Thomas, G., 2006. Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 19707–19712. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0606555104</u>
- John, L., Thomas, S., Herchenröder, O., Pützer, B.M., Schaefer, S., 2011. Hepatitis E virus ORF2 protein activates the pro-apoptotic gene CHOP and anti-apoptotic heat shock proteins. PLoS One 6, e25378. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025378</u>
- Johnson, D.S., Li, Y.-M., Pettersson, M., St George-Hyslop, P.H., 2017. Structural and Chemical Biology of Presenilin Complexes. Cold Spring Harb Perspect Med 7, a024067. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024067
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods 131, 65–71. <u>https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004</u>

- Ju, X., Xiang, G., Gong, M., Yang, R., Qin, J., Li, Y., Nan, Y., Yang, Y., Zhang, Q.C., Ding, Q., 2020. Identification of functional cis-acting RNA elements in the hepatitis E virus genome required for viral replication. PLoS Pathog 16, e1008488. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008488</u>
- Ju, X., Yu, Y., Ren, W., Dong, L., Meng, X., Deng, H., Nan, Y., Ding, Q., 2023. The PRMT5/WDR77 complex restricts hepatitis E virus replication. PLoS Pathog 19, e1011434. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011434
- Jung, S., Seo, D.J., Yeo, D., Wang, Z., Min, A., Zhao, Z., Song, M., Choi, I.-S., Myoung, J., Choi, C., 2020. Experimental infection of hepatitis E virus induces pancreatic necroptosis in miniature pigs. Sci Rep 10, 12022. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-68959-3</u>
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S.A., Sehgal, D., Jameel, S., 2009. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. J Virol 83, 12714–12724. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00717-09</u>
- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., Dalton, H.R., 2017. Hepatitis E virus infection. Nat Rev Dis Primers 3, 17086. <u>https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86</u>
- Kamar, N., Izopet, J., Tripon, S., Bismuth, M., Hillaire, S., Dumortier, J., Radenne, S., Coilly, A., Garrigue, V., D'Alteroche, L., Buchler, M., Couzi, L., Lebray, P., Dharancy, S., Minello, A., Hourmant, M., Roque-Afonso, A.-M., Abravanel, F., Pol, S., Rostaing, L., Mallet, V., 2014. Ribavirin for Chronic Hepatitis E Virus Infection in Transplant Recipients. N Engl J Med 370, 1111–1120. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215246
- Kamar, N., Pischke, S., 2019. Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. Cold Spring Harb Perspect Med 9, a031872. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031872
- Kan, C.C., Solomon, E., Belt, K.T., Chain, A.C., Hiorns, L.R., Fey, G., 1985. Nucleotide sequence of cDNA encoding human alpha 2-macroglobulin and assignment of the chromosomal locus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 2282–2286. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.82.8.2282</u>
- Kang, S., Choi, C., Choi, I., Han, G., Rho, S.W., Choi, J., Kwon, J., Park, M.-K., Kim, S.-J., Myoung, J., 2018. Hepatitis E Virus Methyltransferase Inhibits Type I Interferon Induction by Targeting RIG-I. Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 1554–1562. https://doi.org/10.4014/jmb.1808.08058
- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., Thongboonkerd, V., 2010. Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. Mol. BioSyst. 6, 795. https://doi.org/10.1039/b923864f
- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., Zhang, Y.-J., 2009. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. J Virol 83, 6375–6382. https://doi.org/10.1128/JVI.02571-08
- Karpe, Y.A., Lole, K.S., 2010. RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. J Virol 84, 9637–9641. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00492-10</u>
- Kashyap, T., Murray, J., Walker, C.J., Chang, H., Tamir, S., Hou, B., Shacham, S., Kauffman, M.G., Tripp, R.A., Landesman, Y., 2021a. Selinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces SARS-CoV-2 infection and protects the respiratory system in vivo. Antiviral Research 192, 105115. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105115</u>

- Kashyap, T., Murray, J., Walker, C.J., Chang, H., Tamir, S., Hou, B., Shacham, S., Kauffman, M.G., Tripp, R.A., Landesman, Y., 2021b. Selinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces SARS-CoV-2 infection and protects the respiratory system in vivo. Antiviral Research 192, 105115. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105115</u>
- Kashyap, T., Murray, J., Walker, C.J., Chang, H., Tamir, S., Hou, B., Shacham, S., Kauffman, M.G., Tripp, R.A., Landesman, Y., 2021c. Selinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces SARS-CoV-2 infection and protects the respiratory system in vivo. Antiviral Research 192, 105115. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105115</u>
- Kaur, M., Hyams, K.C., Purdy, M.A., Krawczynski, K., Ching, W.M., Fry, K.E., Reyes, G.R., Bradley, D.W., Carl, M., 1992. Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 3855–3858. https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3855
- Kaushik, N., Subramani, C., Anang, S., Muthumohan, R., Shalimar, null, Nayak, B., Ranjith-Kumar, C.T., Surjit, M., 2017. Zinc Salts Block Hepatitis E Virus Replication by Inhibiting the Activity of Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. J Virol 91, e00754-17. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00754-17</u>
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity 34, 637–650. <u>https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006</u>
- Kenney, S.P., Meng, X.-J., 2019. Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis. Annu Rev Anim Biosci 7, 427–448. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115117</u>
- Khuroo, Mohammad S., Khuroo, Mehnaaz S., Khuroo, N.S., 2016. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. World J Gastroenterol 22, 7030–7045. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030
- Khuroo, M.S., 2011. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. Virus Res 161, 3–14. <u>https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.007</u>
- Kibler, K.V., Miyazato, A., Yedavalli, V.S.R.K., Dayton, A.I., Jacobs, B.L., Dapolito, G., Kim, S., Jeang, K.-T., 2004. Polyarginine Inhibits gp160 Processing by Furin and Suppresses Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Journal of Biological Chemistry 279, 49055–49063. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M403394200</u>
- Kim, E., Myoung, J., 2018. Hepatitis E Virus Papain-Like Cysteine Protease Inhibits Type I Interferon Induction by Down-Regulating Melanoma Differentiation-Associated Gene 5. Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 1908–1915. <u>https://doi.org/10.4014/jmb.1809.09028</u>
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., Von Figura, K., Geuze, H.J., 1993. Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. The Journal of cell biology 121, 997–1010. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.997</u>
- Ko, H.-C., Wei, B.-L., Chiou, W.-F., 2006. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. Journal of Ethnopharmacology 107, 205–210. <u>https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.004</u>
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 1992. Computerassisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 8259–8263. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8259</u>

- Korbecki, J., Gąssowska-Dobrowolska, M., Wójcik, J., Szatkowska, I., Barczak, K., Chlubek, M., Baranowska-Bosiacka, I., 2022. The Importance of CXCL1 in Physiology and Noncancerous Diseases of Bone, Bone Marrow, Muscle and the Nervous System. IJMS 23, 4205. <u>https://doi.org/10.3390/ijms23084205</u>
- Kornilova, A.Y., Bihel, F., Das, C., Wolfe, M.S., 2005. The initial substrate-binding site of γ-secretase is located on presenilin near the active site. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 3230–3235. https://doi.org/10.1073/pnas.0407640102
- Kourtis, A.P., Read, J.S., Jamieson, D.J., 2014. Pregnancy and infection. N Engl J Med 370, 2211–2218. https://doi.org/10.1056/NEJMra1213566
- Kovalev, N., de Castro Martín, I.F., Pogany, J., Barajas, D., Pathak, K., Risco, C., Nagy, P.D., 2016. Role of Viral RNA and Co-opted Cellular ESCRT-I and ESCRT-III Factors in Formation of Tombusvirus Spherules Harboring the Tombusvirus Replicase. J Virol 90, 3611–3626. https://doi.org/10.1128/JVI.02775-15
- Kraus, T.A., Engel, S.M., Sperling, R.S., Kellerman, L., Lo, Y., Wallenstein, S., Escribese, M.M., Garrido, J.L., Singh, T., Loubeau, M., Moran, T.M., 2012. Characterizing the pregnancy immune phenotype: results of the viral immunity and pregnancy (VIP) study. J Clin Immunol 32, 300–311. <u>https://doi.org/10.1007/s10875-011-9627-2</u>
- Kupke, P., Adenugba, A., Schemmerer, M., Bitterer, F., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Wenzel, J.J., Werner, J.M., 2023. Immunomodulation of Natural Killer Cell Function by Ribavirin Involves TYK-2 Activation and Subsequent Increased IFN-γ Secretion in the Context of In Vitro Hepatitis E Virus Infection. Cells 12, 453. <u>https://doi.org/10.3390/cells12030453</u>
- Kupke, P., Werner, J.M., 2021. Hepatitis E Virus Infection—Immune Responses to an Underestimated Global Threat. Cells 10, 2281. <u>https://doi.org/10.3390/cells10092281</u>
- Lampejo, T., 2022. Sofosbuvir in the Treatment of Hepatitis E virus Infection: A Review of in vitro and in vivo Evidence. J Clin Exp Hepatol 12, 1225–1237. <u>https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.02.003</u>
- Lanke, K.H.W., van der Schaar, H.M., Belov, G.A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C.L., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F.J.M., 2009. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. J Virol 83, 11940–11949. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.01244-09</u>
- Lanz, T.A., Hosley, J.D., Adams, W.J., Merchant, K.M., 2004. Studies of Abeta pharmacodynamics in the brain, cerebrospinal fluid, and plasma in young (plaque-free) Tg2576 mice using the gammasecretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY-411575). J Pharmacol Exp Ther 309, 49–55. <u>https://doi.org/10.1124/jpet.103.060715</u>
- Lapa, D., Brega, C., Mammone, A., Zaccarelli, M., Capobianchi, M.R., Garbuglia, A.R., 2016. Diagnostic performance of hepatitis E virus antigen assay in hepatitis E virus acute infection. New Microbiol 40, 246–250.
- Le Breton, M., Meyniel-Schicklin, L., Deloire, A., Coutard, B., Canard, B., de Lamballerie, X., Andre, P., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Davoust, N., 2011. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. BMC Microbiol 11, 234. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-234

- LeDesma, R., Nimgaonkar, I., Ploss, A., 2019. Hepatitis E Virus Replication. Viruses 11, 719. https://doi.org/10.3390/v11080719
- Lee, G.-H., Tan, B.-H., Chi-Yuan Teo, E., Lim, S.-G., Dan, Y.-Y., Wee, A., Kim Aw, P.P., Zhu, Y., Hibberd, M.L., Tan, C.-K., Purdy, M.A., Teo, C.-G., 2016. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. Gastroenterology 150, 355-357.e3. <u>https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048</u>
- Lee, S.-F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., Yu, G., 2002. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. J Biol Chem 277, 45013–45019. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M208164200</u>
- Legrand-Abravanel, F., Thevenet, I., Mansuy, J.-M., Saune, K., Vischi, F., Peron, J.-M., Kamar, N., Rostaing, L., Izopet, J., 2009. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. Clin Vaccine Immunol 16, 772–774. https://doi.org/10.1128/CVI.00438-08
- Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N.G., Marvaldi, J., Lissitzky, J.C., 1996. Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo. Biochem J 317 (Pt 3), 803–809. <u>https://doi.org/10.1042/bj3170803</u>
- Lei, Q., Li, L., Cai, J., Huang, W., Qin, B., Zhang, S., 2016. ORF3 of Hepatitis E Virus Inhibits the Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemotactic Factors in LPS-Stimulated Human PMA-THP1 Cells by Inhibiting NF-κB Pathway. Viral Immunology 29, 105–111. https://doi.org/10.1089/vim.2015.0107
- Lei, Q., Li, L., Zhang, S., Li, T., Zhang, X., Ding, X., Qin, B., 2018. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. Sci Rep 8, 8585. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26975-4
- Lenz, O., Ter Meulen, J., Klenk, H.-D., Seidah, N.G., Garten, W., 2001. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 12701–12705. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.221447598</u>
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science 269, 973–977. <u>https://doi.org/10.1126/science.7638622</u>
- Lewin, D.A., Sheff, D., Ooi, C.E., Whitney, J.A., Yamamoto, E., Chicione, L.M., Webster, P., Bonifacino, J.S., Mellman, I., 1998. Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule. FEBS Lett 435, 263–268. <u>https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01083-7</u>
- Lhomme, S., Abravanel, F., Cintas, P., Izopet, J., 2021. Hepatitis E Virus Infection: Neurological Manifestations and Pathophysiology. Pathogens 10, 1582. <u>https://doi.org/10.3390/pathogens10121582</u>
- Lhomme, S., Magne, S., Perelle, S., Vaissière, E., Abravanel, F., Trelon, L., Hennechart-Collette, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Izopet, J., Figoni, J., Spaccaferri, G., 2023. Clustered Cases of Waterborne Hepatitis E Virus Infection, France. Viruses 15, 1149. <u>https://doi.org/10.3390/v15051149</u>
- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Kamar, N., Izopet, J., 2016. Hepatitis E Pathogenesis. Viruses 8, 212. <u>https://doi.org/10.3390/v8080212</u>

- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J., Kamar, N., 2020a. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. JCM 9, 331. <u>https://doi.org/10.3390/jcm9020331</u>
- Lhomme, S., Migueres, M., Abravanel, F., Marion, O., Kamar, N., Izopet, J., 2020b. Hepatitis E Virus: How It Escapes Host Innate Immunity. Vaccines 8, 422. <u>https://doi.org/10.3390/vaccines8030422</u>
- Li, P., Li, Yunlong, Wang, Yijin, Liu, J., Lavrijsen, M., Li, Yang, Zhang, R., Verstegen, M.M.A., Wang, Yining, Li, T.-C., Ma, Z., Kainov, D.E., Bruno, M.J., de Man, R.A., van der Laan, L.J.W., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2022. Recapitulating hepatitis E virus-host interactions and facilitating antiviral drug discovery in human liver-derived organoids. Sci Adv 8, eabj5908. <a href="https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5908">https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5908</a>
- Li, P., Merrill, S.A., Jorgensen, E.M., Shen, K., 2016. Two Clathrin Adaptor Protein Complexes Instruct Axon-Dendrite Polarity. Neuron 90, 564–580. <u>https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.020</u>
- Li, S.-W., Zhao, Q., Wu, T., Chen, S., Zhang, J., Xia, N.-S., 2015. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. Human Vaccines & Immunotherapeutics 11, 908–914. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1008870
- Li, T.-C., Bai, H., Yoshizaki, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Doan, Y.H., Takahashi, K., Mishiro, S., Takeda, N., Wakita, T., 2019. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. Hepatol Commun 3, 160–172. <u>https://doi.org/10.1002/hep4.1288</u>
- Li, X., Dang, S., Yan, C., Gong, X., Wang, J., Shi, Y., 2013. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. Nature 493, 56–61. <u>https://doi.org/10.1038/nature11801</u>
- Li, X., Niu, Y., Cheng, M., Chi, X., Liu, X., Yang, W., 2016. AP1S3 is required for hepatitis C virus infection by stabilizing E2 protein. Antiviral Research 131, 26–34. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.006
- Li, Y., Miao, Z., Li, P., Zhang, R., Kainov, D.E., Ma, Z., De Man, R.A., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2021. Ivermectin effectively inhibits hepatitis E virus replication, requiring the host nuclear transport protein importin α1. Arch Virol 166, 2005–2010. <u>https://doi.org/10.1007/s00705-021-05096-w</u>
- Li, Y., Li, P., He, Q., Zhang, R., Li, Yang, Kamar, N., Peppelenbosch, M.P., de Man, R.A., Wang, L., Pan, Q., 2022. Niclosamide inhibits hepatitis E virus through suppression of NF-kappaB signalling. Antiviral Res 197, 105228. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105228</u>
- Li, Yunlong, Li, P., Li, Yang, Zhang, R., Yu, P., Ma, Z., Kainov, D.E., de Man, R.A., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2020. Drug screening identified gemcitabine inhibiting hepatitis E virus by inducing interferonlike response via activation of STAT1 phosphorylation. Antiviral Res 184, 104967. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104967
- Li, Z., Liu, Q., 2018. Hepatitis C virus regulates proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 promoter activity. Biochemical and Biophysical Research Communications 496, 1229–1235. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.176
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., Steiner, H., 2011. Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. J Neurochem 117, 779–796. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07248.x
- Lin, S., Yang, Y., Nan, Y., Ma, Z., Yang, L., Zhang, Y.-J., 2019. The Capsid Protein of Hepatitis E Virus Inhibits Interferon Induction via Its N-Terminal Arginine-Rich Motif. Viruses 11, 1050. <u>https://doi.org/10.3390/v11111050</u>

- Liu, P., Bu, Q.-N., Wang, L., Han, J., Du, R.-J., Lei, Y.-X., Ouyang, Y.-Q., Li, J., Zhu, Y.-H., Lu, F.-M., Zhuang, H., 2013. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. Emerg Infect Dis 19, 559–565. <u>https://doi.org/10.3201/eid1904.120827</u>
- Long, J.Z., Cravatt, B.F., 2011. The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. Chem. Rev. 111, 6022–6063. <u>https://doi.org/10.1021/cr200075y</u>
- Lopez-Denman, A.J., Russo, A., Wagstaff, K.M., White, P.A., Jans, D.A., Mackenzie, J.M., 2018. Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA -dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection. Cellular Microbiology 20. https://doi.org/10.1111/cmi.12848
- Lowery, J., Kuczmarski, E.R., Herrmann, H., Goldman, R.D., 2015. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. Journal of Biological Chemistry 290, 17145– 17153. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.R115.640359</u>
- Luistro, L., He, W., Smith, M., Packman, K., Vilenchik, M., Carvajal, D., Roberts, J., Cai, J., Berkofsky-Fessler, W., Hilton, H., Linn, M., Flohr, A., Jakob-Røtne, R., Jacobsen, H., Glenn, K., Heimbrook, D., Boylan, J.F., 2009. Preclinical Profile of a Potent γ-Secretase Inhibitor Targeting Notch Signaling with *In vivo* Efficacy and Pharmacodynamic Properties. Cancer Research 69, 7672–7680. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1843
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., Royer, C., Fischer, B., Zahid, M.N., Lavillette, D., Fresquet, J., Cosset, F.-L., Rothenberg, S.M., Pietschmann, T., Patel, A.H., Pessaux, P., Doffoël, M., Raffelsberger, W., Poch, O., McKeating, J.A., Brino, L., Baumert, T.F., 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. Nat Med 17, 589–595. <u>https://doi.org/10.1038/nm.2341</u>
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., Tong, H., 2019. Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. Marine Drugs 17, 487. <u>https://doi.org/10.3390/md17090487</u>
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Parton, R.G., 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. Cell Host Microbe 2, 229–239. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.003
- Magden, J., Takeda, N., Li, T., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits, A., Kääriäinen, L., 2001. Virusspecific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. J Virol 75, 6249–6255. https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6249-6255.2001
- 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. J Gen Virol 85, 89–95. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.19587-0</u>
- Malide, D., Seidah, N.G., Chrétien, M., Bendayan, M., 1995. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. J Histochem Cytochem 43, 11–19. <u>https://doi.org/10.1177/43.1.7822759</u>
- Marion, O., Capelli, N., Lhomme, S., Dubois, M., Pucelle, M., Abravanel, F., Kamar, N., Izopet, J., 2019. Hepatitis E virus genotype 3 and capsid protein in the blood and urine of immunocompromised patients. J Infect 78, 232–240. <u>https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.01.004</u>
- Mathew, C., Ghildyal, R., 2017. CRM1 Inhibitors for Antiviral Therapy. Front. Microbiol. 8, 1171. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01171

- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y., Bonifacino, J.S., 2011. Conservation and Diversification of Dileucine Signal Recognition by Adaptor Protein (AP) Complex Variants. Journal of Biological Chemistry 286, 2022–2030. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197178</u>
- McCaw, T.R., Inga, E., Chen, H., Jaskula-Sztul, R., Dudeja, V., Bibb, J.A., Ren, B., Rose, J.B., 2021. Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance. The Oncologist 26, e608–e621. <u>https://doi.org/10.1002/onco.13627</u>
- McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., Lorca, T., Castro, A., Burgess, A., 2014. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. Cell Cycle 13, 1400–1412. https://doi.org/10.4161/cc.28401
- McLauchlan, J., 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. The EMBO Journal 21, 3980–3988. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/cdf414</u>
- Mclean, B.N., Gulliver, J., Dalton, H.R., 2017. Hepatitis E virus and neurological disorders. Pract Neurol 17, 282–288. <u>https://doi.org/10.1136/practneurol-2016-001588</u>
- Meckler, X., Checler, F., 2016. Presenilin 1 and Presenilin 2 Target γ-Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments. Journal of Biological Chemistry 291, 12821–12837. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708297</u>
- Meister, T.L., Bruening, J., Todt, D., Steinmann, E., 2019. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. Antiviral Res 163, 34–49. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.007</u>
- Meister, T.L., Brüggemann, Y., Nocke, M.K., Ulrich, R.G., Schuhenn, J., Sutter, K., Gömer, A., Bader, V., Winklhofer, K.F., Broering, R., Verhoye, L., Meuleman, P., Vondran, F.W.R., Camuzet, C., Cocquerel, L., Todt, D., Steinmann, E., 2022. A ribavirin-induced ORF2 single-nucleotide variant produces defective hepatitis E virus particles with immune decoy function. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2202653119. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.2202653119</u>
- Mentrup, T., Loock, A.-C., Fluhrer, R., Schröder, B., 2017. Signal peptide peptidase and SPP-like proteases Possible therapeutic targets? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research 1864, 2169–2182. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.007</u>
- Mesev, E.V., LeDesma, R.A., Ploss, A., 2019. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. Nat Microbiol 4, 914–924. <u>https://doi.org/10.1038/s41564-019-0421-x</u>
- Metzger, K., Bentaleb, C., Hervouet, K., Alexandre, V., Montpellier, C., Saliou, J.-M., Ferrié, M., Camuzet, C., Rouillé, Y., Lecoeur, C., Dubuisson, J., Cocquerel, L., Aliouat-Denis, C.-M., 2022. Processing and Subcellular Localization of the Hepatitis E Virus Replicase: Identification of Candidate Viral Factories. Front Microbiol 13, 828636. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828636</u>
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., Schu, P., 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6phosphate receptors. EMBO J 19, 2193–2203. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2193</u>
- Miao, Z., Zhang, R., Yu, P., Li, Yang, Pan, Q., Li, Yunlong, 2021. The macrolide antibiotic azithromycin potently inhibits hepatitis E virus in cell culture models. Int J Antimicrob Agents 58, 106383. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106383
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., Bartenschlager, R., 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. J Biol Chem 282, 8873–8882. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200</u>

- Mishra, N., Walimbe, A.M., Arankalle, V.A., 2013. Hepatitis E virus from India exhibits significant amino acid mutations in fulminant hepatic failure patients. Virus Genes 46, 47–53. https://doi.org/10.1007/s11262-012-0833-7
- Mitchell, K.J., Pinson, K.I., Kelly, O.G., Brennan, J., Zupicich, J., Scherz, P., Leighton, P.A., Goodrich, L.V., Lu, X., Avery, B.J., Tate, P., Dill, K., Pangilinan, E., Wakenight, P., Tessier-Lavigne, M., Skarnes, W.C., 2001. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. Nat Genet 28, 241–249. <a href="https://doi.org/10.1038/90074">https://doi.org/10.1038/90074</a>
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P.E., Grinberg, A., Bonifacino, J.S., Ohno, H., 2005. Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. Mol Cell Biol 25, 9318–9323. https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9318-9323.2005
- Miyashita, K., Kang, J.-H., Saga, A., Takahashi, K., Shimamura, T., Yasumoto, A., Fukushima, H., Sogabe, S., Konishi, K., Uchida, T., Fujinaga, A., Matsui, T., Sakurai, Y., Tsuji, K., Maguchi, H., Taniguchi, M., Abe, N., Fazle Akbar, S.M., Arai, M., Mishiro, S., 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. Hepatol Res 42, 870–878. https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01006.x
- Montpellier, C., Wychowski, C., Sayed, I.M., Meunier, J.-C., Saliou, J.-M., Ankavay, M., Bull, A., Pillez, A., Abravanel, F., Helle, F., Brochot, E., Drobecq, H., Farhat, R., Aliouat-Denis, C.-M., Haddad, J.G., Izopet, J., Meuleman, P., Goffard, A., Dubuisson, J., Cocquerel, L., 2018. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. Gastroenterology 154, 211-223.e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020
- Mughini-Gras, L., Angeloni, G., Salata, C., Vonesch, N., D'Amico, W., Campagna, G., Natale, A., Zuliani, F., Ceglie, L., Monne, I., Vascellari, M., Capello, K., DI Martino, G., Inglese, N., Palù, G., Tomao, P., Bonfanti, L., 2017. Hepatitis E virus infection in North Italy: high seroprevalence in swine herds and increased risk for swine workers. Epidemiol Infect 145, 3375–3384. https://doi.org/10.1017/S0950268817002485
- Myoung, J., Min, K.S., 2019. Dose-Dependent Inhibition of Melanoma Differentiation-Associated Gene 5-Mediated Activation of Type I Interferon Responses by Methyltransferase of Hepatitis E Virus. Journal of Microbiology and Biotechnology 29, 1137–1143. https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05040
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, null, Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2011a. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. J Gen Virol 92, 269–278. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.025791-0</u>
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, S., Tanaka, T., Nishizawa, T., Yasuda, J., Okamoto, H., 2011b. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. J Gen Virol 92, 2838–2848. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.035378-</u> <u>0</u>
- Naik, A., 2015. Changes in gene expression in liver tissue from patients with fulminant hepatitis E. WJG 21, 8032. <u>https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i26.8032</u>
- Nair, V.P., Anang, S., Subramani, C., Madhvi, A., Bakshi, K., Srivastava, A., Shalimar, null, Nayak, B., Ranjith Kumar, C.T., Surjit, M., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. PLoS Pathog 12, e1005521. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005521

- Nakada, R., Matsuura, Y., 2017. Crystal structure of importin-α bound to the nuclear localization signal of Epstein-Barr virus EBNA-LP protein. Protein Sci 26, 1231–1235. https://doi.org/10.1002/pro.3173
- Nakagawa, T., Murakami, K., Nakayama, K., 1993. Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. FEBS Lett 327, 165–171. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80163-0
- Nan, Y., Ma, Z., Wang, R., Yu, Y., Kannan, H., Fredericksen, B., Zhang, Y.-J., 2014a. Enhancement of interferon induction by ORF3 product of hepatitis E virus. J Virol 88, 8696–8705. https://doi.org/10.1128/JVI.01228-14
- Nan, Y., Yu, Y., Ma, Z., Khattar, S.K., Fredericksen, B., Zhang, Y.-J., 2014b. Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. J Virol 88, 11924–11932. https://doi.org/10.1128/JVI.01935-14
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis: Hepatitis E and pregnancy. Liver International 28, 1190–1199. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x
- Neufeldt, C.J., Cortese, M., Acosta, E.G., Bartenschlager, R., 2018. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. Nat Rev Microbiol 16, 125–142. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170
- Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., Einav, S., 2012. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. PLoS Pathog 8, e1002845. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002845
- Neveu, G., Ziv-Av, A., Barouch-Bentov, R., Berkerman, E., Mulholland, J., Einav, S., 2015. AP-2-Associated Protein Kinase 1 and Cyclin G-Associated Kinase Regulate Hepatitis C Virus Entry and Are Potential Drug Targets. J Virol 89, 4387–4404. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02705-14</u>
- Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M., Faundez, V., 2007. Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. Journal of Cell Science 120, 531–541. https://doi.org/10.1242/jcs.03365
- Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., Moses, A.M., 2009. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics 10, 202. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202</u>
- Niimura, M., Isoo, N., Takasugi, N., Tsuruoka, M., Ui-Tei, K., Saigo, K., Morohashi, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2005. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. J Biol Chem 280, 12967–12975. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M409829200</u>
- Nikolic, J., Blondel, D., 2017. Le virus de la rage induit la formation de granules de stress en contact étroit avec les usines virales. Med Sci (Paris) 33, 921–923. https://doi.org/10.1051/medsci/20173311002
- Nimgaonkar, I., Archer, N.F., Becher, I., Shahrad, M., LeDesma, R.A., Mateus, A., Caballero-Gómez, J., Berneshawi, A.R., Ding, Q., Douam, F., Gaska, J.M., Savitski, M.M., Kim, H., Ploss, A., 2021. Isocotoin

suppresses hepatitis E virus replication through inhibition of heat shock protein 90. Antiviral Research 185, 104997. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104997</u>

- Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R.E., Ploss, A., 2018. Hepatitis E virus: advances and challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 15, 96–110. <u>https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150</u>
- Nyborg, A.C., Jansen, K., Ladd, T.B., Fauq, A., Golde, T.E., 2004. A Signal Peptide Peptidase (SPP) Reporter Activity Assay Based on the Cleavage of Type II Membrane Protein Substrates Provides Further Evidence for an Inverted Orientation of the SPP Active Site Relative to Presenilin. Journal of Biological Chemistry 279, 43148–43156. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M405879200</u>
- Oechslin, N., Ankavay, M., Moradpour, D., Gouttenoire, J., 2023. Expanding the Hepatitis E Virus Toolbox: Selectable Replicons and Recombinant Reporter Genomes. Viruses 15, 869. https://doi.org/10.3390/v15040869
- Okamoto, H., 2011. Hepatitis E virus cell culture models. Virus Research 161, 65–77. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.015
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., Levy, S., 1990. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol 10, 4007–4015. https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4007-4015.1990
- Owolodun, O.A., Giménez-Lirola, L.G., Gerber, P.F., Sanford, B.J., Feagins, A.R., Meng, X.-J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2013. Development of a fluorescent microbead-based immunoassay for the detection of hepatitis E virus IgG antibodies in pigs and comparison to an enzyme-linked immunoassay. Journal of Virological Methods 193, 278–283. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.010
- Ozden, S., Lucas-Hourani, M., Ceccaldi, P.-E., Basak, A., Valentine, M., Benjannet, S., Hamelin, J., Jacob, Y., Mamchaoui, K., Mouly, V., Desprès, P., Gessain, A., Butler-Browne, G., Chrétien, M., Tangy, F., Vidalain, P.-O., Seidah, N.G., 2008. Inhibition of Chikungunya Virus Infection in Cultured Human Muscle Cells by Furin Inhibitors. Journal of Biological Chemistry 283, 21899–21908. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M802444200</u>
- Paliwal, D., Panda, S.K., Kapur, N., Varma, S.P.K., Durgapal, H., 2014. Hepatitis E virus (HEV) protease: a chymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein. Journal of General Virology 95, 1689–1700. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.066142-0</u>
- Panda, S.K., Ansari, I.H., Durgapal, H., Agrawal, S., Jameel, S., 2000. The In Vitro-Synthesized RNA from a cDNA Clone of Hepatitis E Virus Is Infectious. J Virol 74, 2430–2437. https://doi.org/10.1128/JVI.74.5.2430-2437.2000
- Papadopoulou, A.A., Fluhrer, R., 2020. Signaling Functions of Intramembrane Aspartyl-Proteases. Front. Cardiovasc. Med. 7, 591787. <u>https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.591787</u>
- Park, S.Y., Guo, X., 2014. Adaptor protein complexes and intracellular transport. Bioscience Reports 34, e00123. <u>https://doi.org/10.1042/BSR20140069</u>
- Parvez, M.K., 2015. The hepatitis E virus ORF1 'X-domain' residues form a putative macrodomain protein/Appr-1"-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication. Gene 566, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.026

- Parvez, M.K., 2013. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. Virus Research 178, 553–556. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.020
- Pasdeloup, D., Poisson, N., Raux, H., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Blondel, D., 2005. Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal. Virology 334, 284–293. <u>https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.005</u>
- Pasquato, A., Ramos Da Palma, J., Galan, C., Seidah, N.G., Kunz, S., 2013. Viral envelope glycoprotein processing by proprotein convertases. Antiviral Research 99, 49–60. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.04.013
- Patil, R.N., Karpe, Y.A., 2020. Uncovering the Roles of miR-214 in Hepatitis E Virus Replication. J Mol Biol 432, 5322–5342. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.015</u>
- Paul, D., Bartenschlager, R., 2015. Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. Annu. Rev. Virol. 2, 289–310. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055007</u>
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., Bartenschlager, R., 2011. NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. J Virol 85, 6963–6976. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00502-11</u>
- Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A.S., Moore, R.J., Weitz, K.W., Pasa-Tolic, L., Metz, T.O., Adamec, J., Kuhn, R.J., 2012. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. PLoS Pathog 8, e1002584. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584</u>
- Pérez-Gracia, M.T., Suay-García, B., Mateos-Lindemann, M.L., 2017. Hepatitis E and pregnancy: current state. Rev Med Virol 27, e1929. <u>https://doi.org/10.1002/rmv.1929</u>
- Peron, J.-M., Larrue, H., Izopet, J., Buti, M., 2023. The pressing need for a global HEV vaccine. J Hepatol S0168-8278(23)00201–5. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.024</u>
- 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. https://doi.org/10.1099/vir.0.049577-0
- Perwitasari, O., Johnson, S., Yan, X., Register, E., Crabtree, J., Gabbard, J., Howerth, E., Shacham, S., Carlson, R., Tamir, S., Tripp, R.A., 2016. Antiviral Efficacy of Verdinexor In Vivo in Two Animal Models of Influenza A Virus Infection. PLoS ONE 11, e0167221. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167221
- Pierce, D.M., Buchanan, F.J.T., Macrae, F.L., Mills, J.T., Cox, A., Abualsaoud, K.M., Ward, J.C., Ariëns, R.A.S., Harris, M., Stonehouse, N.J., Herod, M.R., 2023. Thrombin cleavage of the hepatitis E virus polyprotein at multiple conserved locations is required for genome replication. PLoS Pathog 19, e1011529. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011529</u>
- Pillot, J., Sharma, M.D., Lazizi, Y., Budkowska, A., Dauguet, C., Galimand, M., Sarthou, J.L., 1987. Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic and sporadic non-A,non-B hepatitis. Annales de l'Institut Pasteur / Virologie 138, 145–158. <u>https://doi.org/10.1016/S0769-2617(87)80087-4</u>
- Pingale, K.D., Kanade, G.D., Karpe, Y.A., 2020. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins Participate in<br/>Hepatitis E Virus Replication. J Mol Biol 432, 2369–2387.<br/>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.025
- Pingale, K.D., Kanade, G.D., Karpe, Y.A., 2019. Hepatitis E virus polymerase binds to IFIT1 to protect the viral RNA from IFIT1-mediated translation inhibition. J Gen Virol 100, 471–483. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001229
- Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P.S., Desjardins, R., Ly, K., Asselin, M.-C., Day, R., Duclos, F.J., Witmer, M., Parker, R., Prat, A., Seidah, N.G., 2009. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. J Biol Chem 284, 28856–28864. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M109.037085</u>
- Ponting, C.P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., Golde, T.E., 2002. Identification of a novel family of presenilin homologues. Hum Mol Genet 11, 1037–1044. https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1037
- Posner, S.F., Vaslet, C.A., Jurofcik, M., Lee, A., Seidah, N.G., Nillni, E.A., 2004. Stepwise posttranslational processing of progrowth hormone-releasing hormone (proGHRH) polypeptide by furin and PC1. Endocrine 23, 199–213. <u>https://doi.org/10.1385/END0:23:2-3:199</u>
- Prabhu, S.B., Gupta, P., Durgapal, H., Rath, S., Gupta, S.D., Acharya, S.K., Panda, S.K., 2011. Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). J Viral Hepat 18, 587–594. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01338.x
- Praditya, D.F., Klöhn, M., Brüggemann, Y., Brown, L.E., Porco, J.A., Zhang, W., Kinast, V., Kirschning, A., Vondran, F.W.R., Todt, D., Steinmann, E., 2022. Identification of structurally re-engineered rocaglates as inhibitors against hepatitis E virus replication. Antiviral Res 204, 105359. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105359
- Primadharsini, P.P., Nagashima, S., Nishiyama, T., Takahashi, M., Murata, K., Okamoto, H., 2022a. Development of Recombinant Infectious Hepatitis E Virus Harboring the nanoKAZ Gene and Its Application in Drug Screening. J Virol 96, e0190621. <u>https://doi.org/10.1128/jvi.01906-21</u>
- Primadharsini, P.P., Nagashima, S., Takahashi, M., Murata, K., Okamoto, H., 2022b. Ritonavir Blocks Hepatitis E Virus Internalization and Clears Hepatitis E Virus In Vitro with Ribavirin. Viruses 14, 2440. <u>https://doi.org/10.3390/v14112440</u>
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., Steiner, H., 2004. Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N-/C-terminal Fragment Heterodimer within the γ-Secretase Complex. Journal of Biological Chemistry 279, 23255–23261. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M401789200</u>
- Protzer, U., Böhm, F., Longerich, T., Seebach, J., Heidary Navid, M., Friemel, J., Marques-Maggio, E., Bawohl, M., Heikenwalder, M., Schirmacher, P., Dutkowski, P., Clavien, P.-A., Schemmer, P., Schnitzler, P., Gotthardt, D., Müllhaupt, B., Weber, A., 2015. Molecular detection of hepatitis E virus (HEV) in liver biopsies after liver transplantation. Mod Pathol 28, 523–532. https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.147
- Proudfoot, A., Hyrina, A., Holdorf, M., Frank, A.O., Bussiere, D., 2019. First Crystal Structure of a Nonstructural Hepatitis E Viral Protein Identifies a Putative Novel Zinc-Binding Protein. J Virol 93, e00170-19. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00170-19</u>
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., López-Otín, C., 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. Nat Rev Genet 4, 544–558. <u>https://doi.org/10.1038/nrg1111</u>

- Pullikotil, P., Benjannet, S., Mayne, J., Seidah, N.G., 2007. The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. J Biol Chem 282, 27402–27413. https://doi.org/10.1074/jbc.M703200200
- Purdy, M.A., Drexler, J.F., Meng, X.-J., Norder, H., Okamoto, H., Van Der Poel, W.H.M., Reuter, G., De Souza, W.M., Ulrich, R.G., Smith, D.B., 2022. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. Journal of General Virology 103. <u>https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778</u>
- Purdy, M.A., Lara, J., Khudyakov, Y.E., 2012. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. PLoS One 7, e35974. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035974</u>
- Qian, Z., Li, T., Xia, Y., Cong, C., Chen, S., Zhang, Y., Gong, S., Wang, W., Liu, H., Chen, D., Zhao, W., Zhong, G., Deng, Y., Yu, W., Wei, D., Yu, X., Huang, F., 2023. Genotype 4 Hepatitis E virus replicates in the placenta, causes severe histopathological damage, and vertically transmits to fetuses. J Infect 87, 34–45. <u>https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.05.003</u>
- Qiu, Q., Basak, A., Mbikay, M., Tsang, B.K., Gruslin, A., 2005. Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11047–11052. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0502357102</u>
- Qu, C., Li, Yang, Li, Yunlong, Yu, P., Li, P., Donkers, J.M., van de Graaf, S.F.J., de Man, R.A., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2019. FDA-drug screening identifies deptropine inhibiting hepatitis E virus involving the NF-κB-RIPK1-caspase axis. Antiviral Res 170, 104588. <u>https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104588</u>
- Ralfs, P., Holland, B., Salinas, E., Bremer, B., Wang, M., Zhu, J., Ambardekar, C., Blasczyk, H., Walker, C.M., Feng, Z., Grakoui, A., 2023. Soluble ORF2 protein enhances HEV replication and induces longlasting antibody response and protective immunity in vivo. Hepatology Publish Ahead of Print. https://doi.org/10.1097/HEP.000000000000421
- Rasche, A., Saqib, M., Liljander, A.M., Bornstein, S., Zohaib, A., Renneker, S., Steinhagen, K., Wernery, R., Younan, M., Gluecks, I., Hilali, M., Musa, B.E., Jores, J., Wernery, U., Drexler, J.F., Drosten, C., Corman, V.M., 2016. Hepatitis E Virus Infection in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983–2015. Emerg. Infect. Dis. 22, 1249–1252. https://doi.org/10.3201/eid2207.160168
- Rawla, P., Raj, J.P., Kannemkuzhiyil, A.J., Aluru, J.S., Thandra, K.C., Gajendran, M., 2020. A Systematic Review of the Extra-Hepatic Manifestations of Hepatitis E Virus Infection. Med Sci (Basel) 8, 9. https://doi.org/10.3390/medsci8010009
- Rebendenne, A., Roy, P., Bonaventure, B., Chaves Valadão, A.L., Desmarets, L., Arnaud-Arnould, M., Rouillé, Y., Tauziet, M., Giovannini, D., Touhami, J., Lee, Y., DeWeirdt, P., Hegde, M., Urbach, S., Koulali, K.E., de Gracia, F.G., McKellar, J., Dubuisson, J., Wencker, M., Belouzard, S., Moncorgé, O., Doench, J.G., Goujon, C., 2022. Bidirectional genome-wide CRISPR screens reveal host factors regulating SARS-CoV-2, MERS-CoV and seasonal HCoVs. Nat Genet 54, 1090–1102. https://doi.org/10.1038/s41588-022-01110-2
- Reiling, J.H., Olive, A.J., Sanyal, S., Carette, J.E., Brummelkamp, T.R., Ploegh, H.L., Starnbach, M.N., Sabatini, D.M., 2013. A CREB3–ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. Nat Cell Biol 15, 1473–1485. <u>https://doi.org/10.1038/ncb2865</u>
- Rein, D.B., Stevens, G.A., Theaker, J., Wittenborn, J.S., Wiersma, S.T., 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. Hepatology 55, 988–997. <u>https://doi.org/10.1002/hep.25505</u>

- Remacle, A.G., Gawlik, K., Golubkov, V.S., Cadwell, G.W., Liddington, R.C., Cieplak, P., Millis, S.Z., Desjardins, R., Routhier, S., Yuan, X.W., 2010. Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 42, 987–995. <u>https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.013</u>
- Ren, X., Farías, G.G., Canagarajah, B.J., Bonifacino, J.S., Hurley, J.H., 2013. Structural Basis for Recruitment and Activation of the AP-1 Clathrin Adaptor Complex by Arf1. Cell 152, 755–767. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.042
- Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1994. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science 263, 1149–1152. https://doi.org/10.1126/science.8108734
- Rivero-Juarez, A., Frias, M., Perez, A.B., Pineda, J.A., Reina, G., Fuentes-Lopez, A., Freyre-Carrillo, C., Ramirez-Arellano, E., Alados, J.C., Rivero, A., HEPAVIR and GEHEP-014 Study Groups, 2022. Orthohepevirus C infection as an emerging cause of acute hepatitis in Spain: First report in Europe. J Hepatol 77, 326–331. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.028</u>
- Rivero-Juarez, A., Frias, M., Rodriguez-Cano, D., Cuenca-López, F., Rivero, A., 2016. Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. Clin Infect Dis 62, 1464. <u>https://doi.org/10.1093/cid/ciw186</u>
- Rizzo, E., 2020. Ivermectin, antiviral properties and COVID-19: a possible new mechanism of action. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 393, 1153–1156. <u>https://doi.org/10.1007/s00210-020-01902-5</u>
- Robinson, D.P., Klein, S.L., 2012. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. Hormones and Behavior 62, 263–271. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023
- Robinson, M.S., Bonifacino, J.S., 2001. Adaptor-related proteins. Curr Opin Cell Biol 13, 444–453. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00235-0
- Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J., Constam, D.B., 1998. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. Development 125, 4863–4876. <u>https://doi.org/10.1242/dev.125.24.4863</u>
- Rogée, S., Talbot, N., Caperna, T., Bouquet, J., Barnaud, E., Pavio, N., 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. J Gen Virol 94, 549–558. https://doi.org/10.1099/vir.0.049858-0
- Romero-Brey, I., Bartenschlager, R., 2014. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. Viruses 6, 2826–2857. <u>https://doi.org/10.3390/v6072826</u>
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2012. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. PLoS Pathog 8, e1003056. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056
- Ropp, S.L., Tam, A.W., Beames, B., Purdy, M., Frey, T.K., 2000. Expression of the hepatitis E virus ORF1. Arch Virol 145, 1321–1337. <u>https://doi.org/10.1007/s007050070093</u>

- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F., Pavio, N., 2011. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 34, 419–427. <u>https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.07.003</u>
- Rowe, C.L., Wagstaff, K.M., Oksayan, S., Glover, D.J., Jans, D.A., Moseley, G.W., 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, e0150477. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150477
- Sahli, R., Fraga, M., Semela, D., Moradpour, D., Gouttenoire, J., 2019. Rabbit HEV in immunosuppressed patients with hepatitis E acquired in Switzerland. J Hepatol 70, 1023–1025. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.025
- Salonen, A., Ahola, T., Kääriäinen, L., 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. Curr Top Microbiol Immunol 285, 139–173. <u>https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6\_5</u>
- Sanger, A., Hirst, J., Davies, A.K., Robinson, M.S., 2019. Adaptor protein complexes and disease at a glance. J Cell Sci 132, jcs222992. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.222992</u>
- Sannerud, R., Esselens, C., Ejsmont, P., Mattera, R., Rochin, L., Tharkeshwar, A.K., De Baets, G., De Wever, V., Habets, R., Baert, V., Vermeire, W., Michiels, C., Groot, A.J., Wouters, R., Dillen, K., Vints, K., Baatsen, P., Munck, S., Derua, R., Waelkens, E., Basi, G.S., Mercken, M., Vooijs, M., Bollen, M., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Bonifacino, J.S., Van Niel, G., De Strooper, B., Annaert, W., 2016. Restricted Location of PSEN2/γ-Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular Aβ Pool. Cell 166, 193–208. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.020</u>
- Saoudi, A., Goyenvalle, A., 2021. Les approches thérapeutiques de modulation de l'épissage: Avancées et perspectives. Med Sci (Paris) 37, 625–631. <u>https://doi.org/10.1051/medsci/2021091</u>
- Sato, H., Masuda, M., Miura, R., Yoneda, M., Kai, C., 2006. Morbillivirus nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. Virology 352, 121–130. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.04.013
- Sayed, I.M., Verhoye, L., Cocquerel, L., Abravanel, F., Foquet, L., Montpellier, C., Debing, Y., Farhoudi, A., Wychowski, C., Dubuisson, J., Leroux-Roels, G., Neyts, J., Izopet, J., Michiels, T., Meuleman, P., 2017. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. Gut 66, 920– 929. <u>https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311109</u>
- Schlombs, K., Wagner, T., Scheel, J., 2003. Site-1 protease is required for cartilage development in zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 14024–14029. https://doi.org/10.1073/pnas.2331794100
- Schlosser, J., Dähnert, L., Dremsek, P., Tauscher, K., Fast, C., Ziegler, U., Gröner, A., Ulrich, R.G., Groschup, M.H., Eiden, M., 2018. Different Outcomes of Experimental Hepatitis E Virus Infection in Diverse Mouse Strains, Wistar Rats, and Rabbits. Viruses 11, 1.<u>https://doi.org/10.3390/v11010001</u>
- Schrader, J.A., Burkard, T.L., Brüggemann, Y., Gömer, A., Meister, T.L., Fu, R.M., Mehnert, A.-K., Dao Thi, V.L., Behrendt, P., Durantel, D., Broering, R., Vondran, F.W.R., Todt, D., Kinast, V., Steinmann, E., 2023. EGF receptor modulates HEV entry in human hepatocytes. Hepatology 77, 2104–2117. https://doi.org/10.1097/HEP.00000000000308

- Schrul, B., Kapp, K., Sinning, I., Dobberstein, B., 2010. Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes. Biochemical Journal 427, 523–534. <u>https://doi.org/10.1042/BJ20091005</u>
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., Chretien, M., 2003. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 928–933. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100</u>
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., Day, R., 1996. cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 3388– 3393. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3388</u>
- Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., Prat, A., 2008. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. Int J Biochem Cell Biol 40, 1111–1125. <u>https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.030</u>
- Seidah, N.G., Pasquato, A., Andréo, U., 2021. How Do Enveloped Viruses Exploit the Secretory Proprotein Convertases to Regulate Infectivity and Spread? Viruses 13, 1229. https://doi.org/10.3390/v13071229
- Seidah, N.G., Prat, A., 2012. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov 11, 367–383. <u>https://doi.org/10.1038/nrd3699</u>
- Selkoe, D.J., 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. J Biol Chem 271, 18295–18298. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18295</u>
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., Südhof, T., Yu, G., 2005. Nicastrin Functions as a γ-Secretase-Substrate Receptor. Cell 122, 435–447. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.022</u>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F., 2020. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci U S A 117, 11727–11734.<u>https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117</u>
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A., Haines, J.L., Perkicak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., St George-Hyslop, P.H., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375, 754–760. <a href="https://doi.org/10.1038/375754a0">https://doi.org/10.1038/375754a0</a>
- Shi, X., Botting, C.H., Li, P., Niglas, M., Brennan, B., Shirran, S.L., Szemiel, A.M., Elliott, R.M., 2016. Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase and signal peptide peptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113, 8825–8830. https://doi.org/10.1073/pnas.1603364113
- Shimata, K., Sugawara, Y., Yamamoto, H., Okamoto, H., Uchida, K., Kawabata, S., Isono, K., Hayashida, S., Inomata, Y., 2018. A Case Report of Living Donor Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Related to Hepatitis E Virus Infection. Prog Transplant 28, 91–92. https://doi.org/10.1177/1526924817746912

- Shin, J., Nile, A., Oh, J.-W., 2021. Role of adaptin protein complexes in intracellular trafficking and theirimpactondiseases.Bioengineeredhttps://doi.org/10.1080/21655979.2021.1982846
- Shiota, T., Li, T.-C., Nishimura, Y., Yoshizaki, S., Sugiyama, R., Shimojima, M., Saijo, M., Shimizu, H., Suzuki, R., Wakita, T., Muramatsu, M., Ishii, K., 2019. Integrin α3 is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. Virology 536, 119–124. <u>https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.025</u>
- Shukla, P., Nguyen, H.T., Torian, U., Engle, R.E., Faulk, K., Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2011. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 2438–2443. https://doi.org/10.1073/pnas.1018878108
- Simmen, T., Höning, S., Icking, A., Tikkanen, R., Hunziker, W., 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. Nat Cell Biol 4, 154–159. https://doi.org/10.1038/ncb745
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L., Robinson, M.S., 1997. Characterization of the Adaptorrelated Protein Complex, AP-3. Journal of Cell Biology 137, 835–845. https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.835
- Smith, D.B., Izopet, J., Nicot, F., Simmonds, P., Jameel, S., Meng, X.-J., Norder, H., Okamoto, H., van der Poel, W.H.M., Reuter, G., Purdy, M.A., 2020. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). J Gen Virol 101, 692–698. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435
- Smith, D.B., Simmonds, P., 2015. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis-a virus or host-specific pathology? Liver Int 35, 1334–1340. <u>https://doi.org/10.1111/liv.12629</u>
- Smith, D.B., Simmonds, P., Members Of The International Committee On The Taxonomy Of Viruses Study Group, null, Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.-J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M., Purdy, M.A., 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. J Gen Virol 95, 2223–2232. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0</u>
- Smith, D.B., Vanek, J., Ramalingam, S., Johannessen, I., Templeton, K., Simmonds, P., 2012. Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region. J Gen Virol 93, 2408–2418. https://doi.org/10.1099/vir.0.045351-0
- Sooryanarain, H., Ahmed, S.A., Meng, X.-J., 2021. Progesterone-Mediated Enhancement of Hepatitis E Virus Replication in Human Liver Cells. mBio 12, e0143421. <u>https://doi.org/10.1128/mBio.01434-21</u>
- Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L., Ahola, T., 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. J Virol 84, 7543–7557. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.00477-10</u>
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Sachdeva, S., Alam, M.I., Jameel, S., Naik, S., 2011. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. J Gastroenterol Hepatol 26, 306–311. <u>https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06356.x</u>
- Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P.M., Selkoe, D.J., Romig, H., Mendla, K., Haass, C., 1998. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. J Biol Chem 273, 32322–32331. https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32322

- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., Haass, C., 2002. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. J Biol Chem 277, 39062–39065. https://doi.org/10.1074/jbc.C200469200
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., Rout, M.P., 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 490–501. https://doi.org/10.1038/nrm2928
- Suppiah, S., Zhou, Y., Frey, T.K., 2011. Lack of Processing of the Expressed ORF1 Gene Product of Hepatitis E Virus. Virol J 8, 245. <u>https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-245</u>
- Surjit, M., Varshney, B., Lal, S.K., 2012. The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF-  $\kappa$ B activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in human hepatoma cells. BMC Biochem 13, 7. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2091-13-7</u>
- Susan-Resiga, D., Essalmani, R., Hamelin, J., Asselin, M.-C., Benjannet, S., Chamberland, A., Day, R., Szumska, D., Constam, D., Bhattacharya, S., Prat, A., Seidah, N.G., 2011. Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10. J Biol Chem 286, 22785–22794. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233577</u>
- Swiecki, M., Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nat Rev Immunol 15, 471–485. <u>https://doi.org/10.1038/nri3865</u>
- Syed, G.H., Tang, H., Khan, M., Hassanein, T., Liu, J., Siddiqui, A., 2014. Hepatitis C virus stimulates lowdensity lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. J Virol 88, 2519–2529. https://doi.org/10.1128/JVI.02727-13
- Szabo, K., Trojnar, E., Anheyer-Behmenburg, H., Binder, A., Schotte, U., Ellerbroek, L., Klein, G., Johne, R., 2015. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. Int J Food Microbiol 215, 149–156. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013
- Szkolnicka, D., Pollán, A., Da Silva, N., Oechslin, N., Gouttenoire, J., Moradpour, D., 2019. Recombinant Hepatitis E Viruses Harboring Tags in the ORF1 Protein. J Virol 93, e00459-19. https://doi.org/10.1128/JVI.00459-19
- Szkolnicka, D., Zhou, W., Lucendo-Villarin, B., Hay, D.C., 2013. Pluripotent Stem Cell–Derived Hepatocytes: Potential and Challenges in Pharmacology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 53, 147– 159. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140306</u>
- Szumska, D., Pieles, G., Essalmani, R., Bilski, M., Mesnard, D., Kaur, K., Franklyn, A., El Omari, K., Jefferis, J., Bentham, J., Taylor, J.M., Schneider, J.E., Arnold, S.J., Johnson, P., Tymowska-Lalanne, Z., Stammers, D., Clarke, K., Neubauer, S., Morris, A., Brown, S.D., Shaw-Smith, C., Cama, A., Capra, V., Ragoussis, J., Constam, D., Seidah, N.G., Prat, A., Bhattacharya, S., 2008. VACTERL/caudal regression/Currarino syndrome-like malformations in mice with mutation in the proprotein convertase Pcsk5. Genes Dev 22, 1465–1477. <a href="https://doi.org/10.1101/gad.479408">https://doi.org/10.1101/gad.479408</a>
- Takahashi, M., Tanaka, T., Takahashi, H., Hoshino, Y., Nagashima, S., Jirintai, null, Mizuo, H., Yazaki, Y., Takagi, T., Azuma, M., Kusano, E., Isoda, N., Sugano, K., Okamoto, H., 2010. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. J Clin Microbiol 48, 1112–1125. https://doi.org/10.1128/JCM.02002-09

- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K., Nakayama, K., 1993. A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. Biochem Biophys Res Commun 195, 1019–1026. https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2146
- Takayama, I., Sato, H., Watanabe, A., Omi-Furutani, M., Sugai, A., Kanki, K., Yoneda, M., Kai, C., 2012. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. Virology 424, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.011
- Tan, J.Z.A., Gleeson, P.A., 2019. Cargo Sorting at the trans-Golgi Network for Shunting into Specific Transport Routes: Role of Arf Small G Proteins and Adaptor Complexes. Cells 8, 531. <u>https://doi.org/10.3390/cells8060531</u>
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. J Gen Virol 88, 903–911. https://doi.org/10.1099/vir.0.82535-0
- Tang, X., Yang, C., Gu, Y., Song, C., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, J., Hew, C.L., Li, S., Xia, N., Sivaraman, J., 2011. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 10266–10271. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1101309108</u>
- Targett-Adams, P., Schaller, T., Hope, G., Lanford, R.E., Lemon, S.M., Martin, A., McLauchlan, J., 2006. Signal Peptide Peptidase Cleavage of GB Virus B Core Protein Is Required for Productive Infection in Vivo. Journal of Biological Chemistry 281, 29221–29227. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M605373200</u>
- Tascher, G., Burban, A., Camus, S., Plumel, M., Chanon, S., Le Guevel, R., Shevchenko, V., Van Dorsselaer, A., Lefai, E., Guguen-Guillouzo, C., Bertile, F., 2019. In-Depth Proteome Analysis Highlights HepaRG Cells as a Versatile Cell System Surrogate for Primary Human Hepatocytes. Cells 8, 192. <u>https://doi.org/10.3390/cells8020192</u>
- Tavares, L.A., De Carvalho, J.V., Costa, C.S., Silveira, R.M., De Carvalho, A.N., Donadi, E.A., daSilva, L.L.P., 2020. Two Functional Variants of AP-1 Complexes Composed of either γ2 or γ1 Subunits Are Independently Required for Major Histocompatibility Complex Class I Downregulation by HIV-1 Nef. J Virol 94, e02039-19. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02039-19</u>
- te Velthuis, A.J.W., van den Worm, S.H.E., Sims, A.C., Baric, R.S., Snijder, E.J., van Hemert, M.J., 2010. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. PLoS Pathog 6, e1001176. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001176</u>
- Teo, C.S.H., Chu, J.J.H., 2014. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. J Virol 88, 1897–1913. https://doi.org/10.1128/JVI.01249-13
- Terrault, N.A., Levy, M.T., Cheung, K.W., Jourdain, G., 2021. Viral hepatitis and pregnancy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18, 117–130. <u>https://doi.org/10.1038/s41575-020-00361-w</u>
- Thomas, G., 2002. Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 753–766. <u>https://doi.org/10.1038/nrm934</u>
- Tian, Y., Huang, W., Yang, J., Wen, Z., Geng, Y., Zhao, C., Zhang, H., Wang, Y., 2017. Systematic identification of hepatitis E virus ORF2 interactome reveals that TMEM134 engages in ORF2-

mediated	NF-ĸB	pathway.	Virus	Res	228,	102–108.
https://doi.org	/10.1016/i.v	virusres.2016.11.0	)27			

- Ticehurst, J., Rhodes, L.L., Krawczynski, K., Asher, L.V., Engler, W.F., Mensing, T.L., Caudill, J.D., Sjogren, M.H., Hoke, C.H., LeDuc, J.W., 1992. Infection of owl monkeys (Aotus trivirgatus) and cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) with hepatitis E virus from Mexico. J Infect Dis 165, 835–845. https://doi.org/10.1093/infdis/165.5.835
- Todesco, E., Mazzola, A., Akhavan, S., Abravanel, F., Poynard, T., Roque-Afonso, A.-M., Peytavin, G., Marcelin, A.-G., Calmus, Y., Lecuyer, L., Guillemain, R., Conti, F., 2018. Chronic hepatitis E in a heart transplant patient: sofosbuvir and ribavirin regimen not fully effective. Antivir Ther 23, 463–465. <u>https://doi.org/10.3851/IMP3227</u>
- Todt, D., Moeller, N., Praditya, D., Kinast, V., Friesland, M., Engelmann, M., Verhoye, L., Sayed, I.M., Behrendt, P., Dao Thi, V.L., Meuleman, P., Steinmann, E., 2018. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. Antiviral Res 157, 151–158. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.010
- Tong, G., Castaneda, L., Wang, J.-S., Sverdlov, O., Huang, S.-P., Slemmon, R., Gu, H., Wong, O., Li, H., Berman, R.M., Smith, C., Albright, C., Dockens, R.C., 2012a. Effects of Single Doses of Avagacestat (BMS-708163) on Cerebrospinal Fluid Aβ Levels in Healthy Young Men. Clin Drug Investig 32, 761–769. <u>https://doi.org/10.1007/s40261-012-0006-4</u>
- Tong, G., Wang, J.-S., Sverdlov, O., Huang, S.-P., Slemmon, R., Croop, R., Castaneda, L., Gu, H., Wong, O., Li, H., Berman, R.M., Smith, C., Albright, C.F., Dockens, R.C., 2012b. Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Ascending Dose Study of the Oral γ-Secretase Inhibitor BMS-708163 (Avagacestat): Tolerability Profile, Pharmacokinetic Parameters, and Pharmacodynamic Markers. Clinical Therapeutics 34, 654–667.<u>https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.01.022</u>
- Treagus, S., Wright, C., Baker-Austin, C., Longdon, B., Lowther, J., 2021. The Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus to Humans. Food Environ Virol 13, 127–145. <u>https://doi.org/10.1007/s12560-021-09461-5</u>
- Trémeaux, P., Lhomme, S., Chapuy-Regaud, S., Peron, J.-M., Alric, L., Kamar, N., Izopet, J., Abravanel, F., 2016. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. J Clin Virol 79, 1–5. <u>https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.019</u>
- Tu, Y., Zhao, L., Billadeau, D.D., Jia, D., 2020. Endosome-to-TGN Trafficking: Organelle-Vesicle and Organelle-Organelle Interactions. Front. Cell Dev. Biol. 8, 163. <u>https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00163</u>
- Urata, S., Yun, N., Pasquato, A., Paessler, S., Kunz, S., De La Torre, J.C., 2011. Antiviral Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Arenavirus Glycoprotein Processing by the Cellular Site 1 Protease. J Virol 85, 795–803. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02019-10</u>
- Van Eijk, J.J.J., Dalton, H.R., Ripellino, P., Madden, R.G., Jones, C., Fritz, M., Gobbi, C., Melli, G., Pasi, E., Herrod, J., Lissmann, R.F., Ashraf, H.H., Abdelrahim, M., Masri, O.A.B.A.L., Fraga, M., Benninger, D., Kuntzer, T., Aubert, V., Sahli, R., Moradpour, D., Blasco-Perrin, H., Attarian, S., Gérolami, R., Colson, P., Giordani, M.T., Hartl, J., Pischke, S., Lin, N.X., Mclean, B.N., Bendall, R.P., Panning, M., Peron, J.-M., Kamar, N., Izopet, J., Jacobs, B.C., Van Alfen, N., Van Engelen, B.G.M., 2017. Clinical phenotype and outcome of hepatitis E virus–associated neuralgic amyotrophy. Neurology 89, 909–917. https://doi.org/10.1212/WNL.00000000004297

- Verheije, M.H., Raaben, M., Mari, M., Te Lintelo, E.G., Reggiori, F., van Kuppeveld, F.J.M., Rottier, P.J.M., de Haan, C.A.M., 2008. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. PLoS Pathog 4, e1000088. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000088</u>
- Vogl, D.T., Dingli, D., Cornell, R.F., Huff, C.A., Jagannath, S., Bhutani, D., Zonder, J., Baz, R., Nooka, A., Richter, J., Cole, C., Vij, R., Jakubowiak, A., Abonour, R., Schiller, G., Parker, T.L., Costa, L.J., Kaminetzky, D., Hoffman, J.E., Yee, A.J., Chari, A., Siegel, D., Fonseca, R., Van Wier, S., Ahmann, G., Lopez, I., Kauffman, M., Shacham, S., Saint-Martin, J.-R., Picklesimer, C.D., Choe-Juliak, C., Stewart, A.K., 2018. Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. JCO 36, 859–866. <u>https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.5207</u>
- Voss, M., Schröder, B., Fluhrer, R., 2013. Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes 1828, 2828–2839. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.033</u>
- Wagstaff, K.M., Sivakumaran, H., Heaton, S.M., Harrich, D., Jans, D.A., 2012. Ivermectin is a specific inhibitor of importin  $\alpha/\beta$ -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. Biochem J 443, 851–856. <u>https://doi.org/10.1042/BJ20120150</u>
- Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L., Thomas, G., 1998. PACS-1 Defines a Novel Gene Family of Cytosolic Sorting Proteins Required for trans-Golgi Network Localization. Cell 94, 205–216. <u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81420-8</u>
- Wang, B., Mahsoub, H.M., Li, W., Heffron, C.L., Tian, D., Hassebroek, A.M., LeRoith, T., Meng, X.-J., 2023. Ribavirin Treatment Failure-Associated Mutation, Y1320H, in the RNA-Dependent RNA Polymerase of Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) Enhances Virus Replication in a Rabbit HEV Infection Model. mBio 14, e0337222. <u>https://doi.org/10.1128/mbio.03372-22</u>
- Wang, B., Tian, D., Sooryanarain, H., Mahsoub, H.M., Heffron, C.L., Hassebroek, A.M., Meng, X.-J., 2022. Two mutations in the ORF1 of genotype 1 hepatitis E virus enhance virus replication and may associate with fulminant hepatic failure. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2207503119. https://doi.org/10.1073/pnas.2207503119
- Wang, J., Sun, D., Wang, M., Cheng, A., Zhu, Y., Mao, S., Ou, X., Zhao, X., Huang, J., Gao, Q., Zhang, S., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Jia, R., Chen, S., Liu, M., 2022. Multiple functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the positive single-stranded RNA virus life cycle. Front Immunol 13, 989298. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.989298</u>
- Wang, Lin, Teng, J.L.L., Lau, S.K.P., Sridhar, S., Fu, H., Gong, W., Li, M., Xu, Q., He, Y., Zhuang, H., Woo, P.C.Y., Wang, Ling, 2019. Transmission of a Novel Genotype of Hepatitis E Virus from Bactrian Camels to Cynomolgus Macaques. J Virol 93, e02014-18. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02014-18</u>
- Wang, M., Huang, Y., He, M., Peng, W.-J., Tian, D.-Y., 2018. Effects of hepatitis E virus infection on interferon production via ISG15. World J Gastroenterol 24, 2173–2180. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i20.2173
- Wang, P.-G., Tang, D.-J., Hua, Z., Wang, Z., An, J., 2020. Sunitinib reduces the infection of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 partially by inhibiting AP2M1 phosphorylation. Cell Discov 6, 71. https://doi.org/10.1038/s41421-020-00217-2
- Wang, S., Guo, F., Liu, K., Wang, H., Rao, S., Yang, P., Jiang, C., 2008. Endocytosis of the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein together with virus receptor ACE2. Virus Res 136, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.03.004

- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., Yin, H.L., 2003. Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. Cell 114, 299–310.<u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00603-2</u>
- Wawrzynowicz-Syczewska, M., 2002. [Ribavirin--pharmacological features, antiviral effects against hepatitis C virus (HCV) and other viruses and side effects during treatment]. Przegl Epidemiol 56 Suppl 5, 35–40.
- Webster, B., Assil, S., Dreux, M., 2016. Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. J Virol 90, 10050–10053. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.01692-16</u>
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K., Martoglio, B., 2002. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. Science 296, 2215–2218. https://doi.org/10.1126/science.1070925
- Weihofen, A., Lemberg, M.K., Ploegh, H.L., Bogyo, M., Martoglio, B., 2000. Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. J Biol Chem 275, 30951–30956. https://doi.org/10.1074/jbc.M005980200
- Wen, G.-P., He, L., Tang, Z.-M., Wang, S.-L., Zhang, X., Chen, Y.-Z., Lin, X., Liu, C., Chen, J.-X., Ying, D., Chen, Z.-H., Wang, Y.-B., Luo, W.-X., Huang, S.-J., Li, S.-W., Zhang, J., Zheng, Z.-Z., Zhu, J., Xia, N.-S., 2020. Quantitative evaluation of protective antibody response induced by hepatitis E vaccine in humans. Nat Commun 11, 3971. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-020-17737-w</u>
- Wen, J., Liu, D., Zhao, L., 2022. Small molecules targeting γ-secretase and their potential biological applications. European Journal of Medicinal Chemistry 232, 114169. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114169</u>
- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., Aster, J.C., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science 306, 269–271. <u>https://doi.org/10.1126/science.1102160</u>
- Wente, S.R., Rout, M.P., 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a000562. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000562</u>
- Wing, C.E., Fung, H.Y.J., Chook, Y.M., 2022. Karyopherin-mediated nucleocytoplasmic transport. Nat Rev Mol Cell Biol 23, 307–328. <u>https://doi.org/10.1038/s41580-021-00446-7</u>
- Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I.O., Selkoe, D.J., 1999a. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gammasecretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. Biochemistry 38, 4720-4727. <u>https://doi.org/10.1021/bi982562p</u>
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J., 1999b. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature 398, 513–517. <u>https://doi.org/10.1038/19077</u>
- Wolff, G., Melia, C.E., Snijder, E.J., Bárcena, M., 2020. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. Trends in Microbiology 28, 1022–1033. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.009</u>
- Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.-J.J., Zhang, L., Higgins, G.A., Parker, E.M., 2004. Chronic treatment with the gammasecretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters

lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. J Biol Chem 279, 12876–12882. https://doi.org/10.1074/jbc.M311652200

- World Health Organization. Viral Hepatitis. June 24, 2022. Available from: <u>https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e</u>. Accessed on June, 23th 2023.
- Wu, C., Wu, X., Xia, J., 2020. Hepatitis E virus infection during pregnancy. Virol J 17, 73. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01343-9
- Wu, J., Ling, B., Guo, N., Zhai, G., Li, M., Guo, Y., 2021. Immunological Manifestations of Hepatitis E-Associated Acute and Chronic Liver Failure and Its Regulatory Mechanisms. Front. Med. 8, 725993. <u>https://doi.org/10.3389/fmed.2021.725993</u>
- Wu, J., Xiang, Z., Gao, C., Huang, L., Hua, J., Tong, L., Ling, B., Yao, Y., Jiang, B., Wang, D., Li, G., Ju, F., Jin, X., Xu, P., Bortolanza, M., Jiang, C., Chao, C., Dong, P., Huang, F., Chinese Consortium for the Study of Hepatitis E (CCSHE), 2023. Genotype 4 HEV infection triggers the initiation and development of acute pancreatitis. Microbes Infect 105190. <u>https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105190</u>
- Wu, X., Dao Thi, V.L., Liu, P., Takacs, C.N., Xiang, K., Andrus, L., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Rice, C.M., 2018. Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication in Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. Gastroenterology 154, 663-674.e7. <u>https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.041</u>
- Xia, J., Liu, L., Wang, L., Zhang, Y., Zeng, H., Liu, P., Zou, Q., Wang, L., Zhuang, H., 2015. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. J Viral Hepat 22, 850–857. <u>https://doi.org/10.1111/jvh.12406</u>
- Xia, R., Sun, S., Shen, M., Zhang, L., Zhuang, G., 2019. Targeted hepatitis E vaccination for women of childbearing age is cost-effective in China. Vaccine 37, 5868–5876. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.003
- Xiang, Y., Molloy, S.S., Thomas, L., Thomas, G., 2000. The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. Mol Biol Cell 11, 1257–1273. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1257</u>
- Xiao, F., Wang, S., Barouch-Bentov, R., Neveu, G., Pu, S., Beer, M., Schor, S., Kumar, S., Nicolaescu, V., Lindenbach, B.D., Randall, G., Einav, S., 2018. Interactions between the Hepatitis C Virus Nonstructural 2 Protein and Host Adaptor Proteins 1 and 4 Orchestrate Virus Release. mBio 9, e02233-17. <u>https://doi.org/10.1128/mBio.02233-17</u>
- Xing, L., Li, T.-C., Mayazaki, N., Simon, M.N., Wall, J.S., Moore, M., Wang, C.-Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., Cheng, R.H., 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNAdependent viral assembly pathway. J Biol Chem 285, 33175–33183. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106336
- Xu, J., Wu, F., Tian, D., Wang, J., Zheng, Z., Xia, N., 2014. Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-κappa B signaling induced by tumor necrosis factor-α in human A549 lung epithelial cells. PLoS One 9, e100787. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100787
- Xu, L., Zhou, X., Wang, W., Wang, Y., Yin, Y., Laan, L.J.W. van der, Sprengers, D., Metselaar, H.J., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2016. IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. FASEB J 30, 3352–3367. https://doi.org/10.1096/fj.201600356R

- Yadav, K.K., Boley, P.A., Fritts, Z., Kenney, S.P., 2021. Ectopic Expression of Genotype 1 Hepatitis E Virus ORF4 Increases Genotype 3 HEV Viral Replication in Cell Culture. Viruses 13, 75. https://doi.org/10.3390/v13010075
- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 12986–12991. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0903699106</u>
- Yang, C., Hao, X., Li, Y., Long, F., He, Q., Huang, F., Yu, W., 2019. Successful Establishment of Hepatitis E Virus Infection in Pregnant BALB/c Mice. Viruses 11, 451. <u>https://doi.org/10.3390/v11050451</u>
- Yang, C.-W., Hsu, H.-Y., Lee, Y.-Z., Jan, J.-T., Chang, S.-Y., Lin, Y.-L., Yang, R.-B., Chao, T.-L., Liang, J.-J., Lin, S.-J., Liao, C.-C., Chang, C.-S., Sytwu, H.-K., Hung, M.-S., Chen, C.-T., Lee, S.-J., 2023. Natural fucoidans inhibit coronaviruses by targeting viral spike protein and host cell furin. Biochemical Pharmacology 215, 115688. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115688</u>
- Yang, Y.-L., Nan, Y.-C., 2021. Open reading frame 3 protein of hepatitis E virus: Multi-function protein with endless potential. WJG 27, 2458–2473. <u>https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i20.2458</u>
- Yao, W., Yang, H., Yang, J., 2022. Small-molecule drugs development for Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 14, 1019412. <u>https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1019412</u>
- Yarbrough, M.L., Mata, M.A., Sakthivel, R., Fontoura, B.M.A., 2014. Viral Subversion of Nucleocytoplasmic Trafficking: Viral Subversion of Nucleocytoplasmic Trafficking. Traffic 15, 127–140. <u>https://doi.org/10.1111/tra.12137</u>
- Yasamut, U., Tongmuang, N., Yenchitsomanus, P., Junking, M., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Chu, J.J.H., Limjindaporn, T., 2015. Adaptor Protein 1A Facilitates Dengue Virus Replication. PLoS ONE 10, e0130065. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130065</u>
- Yin, Feng, 2019. Hepatitis E Virus Entry. Viruses 11, 883. https://doi.org/10.3390/v11100883
- Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z., 2016. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. J Virol 90, 4232–4242. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02804-15</u>
- Yin, X., Ying, D., Lhomme, S., Tang, Z., Walker, C.M., Xia, N., Zheng, Z., Feng, Z., 2018. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 115, 4773–4778. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115</u>
- Ying, D., He, Q., Tian, W., Chen, Y., Zhang, X., Wang, S., Liu, C., Chen, Z., Liu, Y., Fu, L., Yan, L., Wang, Ling, Tang, Z., Wang, Lin, Zheng, Z., Xia, N., 2023. Urine is a viral antigen reservoir in hepatitis E virus infection. Hepatology 77, 1722–1734. <u>https://doi.org/10.1002/hep.32745</u>
- Yonemura, Y., Futai, E., Yagishita, S., Suo, S., Tomita, T., Iwatsubo, T., Ishiura, S., 2011. Comparison of Presenilin 1 and Presenilin 2 γ-Secretase Activities Using a Yeast Reconstitution System. Journal of Biological Chemistry 286, 44569–44575. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M111.270108</u>
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St George-Hyslop, P., 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature 407, 48–54. https://doi.org/10.1038/35024009

- Yu, H., Li, S., Yang, C., Wei, M., Song, C., Zheng, Z., Gu, Y., Du, H., Zhang, J., Xia, N., 2011. Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78. J Mol Model 17, 987– 995. <u>https://doi.org/10.1007/s00894-010-0794-5</u>
- Yu, W., Hao, X., Li, Yi, Yang, C., Li, Yunlong, He, Z., Huang, F., 2020. Vertical transmission of hepatitis E virus in pregnant rhesus macaques. Sci Rep 10, 17517. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-74461-7</u>
- Yu, W., Ji, H., Long, F., Chen, S., He, Q., Xia, Y., Cong, C., Yang, C., Wei, D., Huang, F., 2021. Inhibition of hepatitis E virus replication by zinc-finger antiviral Protein synergizes with IFN-β. Journal of Viral Hepatitis 28, 1219–1229. <u>https://doi.org/10.1111/jvh.13522</u>
- Yu, X., Chen, Z., Wang, S., Pan, H., Wang, Z., Zhang, Q., Shen, L., Zheng, X., Yan, C., Lu, M., Chen, B., Zheng, Y., Zhang, J., Lv, H., Huang, S., 2019. Safety and immunogenicity of hepatitis E vaccine in elderly people older than 65 years. Vaccine 37, 4581–4586. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.006
- Yuan, S., Chu, H., Huang, J., Zhao, X., Ye, Z.-W., Lai, P.-M., Wen, L., Cai, J.-P., Mo, Y., Cao, J., Liang, R., Poon, V.K.-M., Sze, K.-H., Zhou, J., To, K.K.-W., Chen, Z., Chen, H., Jin, D.-Y., Chan, J.F.-W., Yuen, K.-Y., 2020. Viruses harness YxxØ motif to interact with host AP2M1 for replication: A vulnerable broadspectrum antiviral target. Sci Adv 6, eaba7910. <u>https://doi.org/10.1126/sciadv.aba7910</u>
- Yugo, D.M., Cossaboom, C.M., Meng, X.-J., 2014. Naturally occurring animal models of human hepatitis E virus infection. ILAR J 55, 187–199. <u>https://doi.org/10.1093/ilar/ilu007</u>
- Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K., Jameel, S., 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. J Virol 71, 9045–9053. https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9045-9053.1997
- Zallocchi, M., Delimont, D., Meehan, D.T., Cosgrove, D., 2012. Regulated Vesicular Trafficking of Specific PCDH15 and VLGR1 Variants in Auditory Hair Cells. J. Neurosci. 32, 13841–13859. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1242-12.2012
- Zhang, F., Xu, L.-D., Zhang, Q., Wang, A., Yu, X., Liu, S., Chen, C., Wu, S., Jin, J., Lin, A., Neculai, D., Zhao, B., Feng, X.-H., Liang, T., Xu, P., Huang, Y.-W., 2023. Targeting proteostasis of the HEV replicase to combat infection in preclinical models. J Hepatol 78, 704–716. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.12.010
- Zhang, J., Li, S.-W., Wu, T., Zhao, Q., Ng, M.-H., Xia, N.-S., 2012. Hepatitis E virus: neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity: Hepatitis E virus: protective immunity. Rev. Med. Virol. 22, 339–349. <u>https://doi.org/10.1002/rmv.1719</u>
- Zhang, J., Liu, C., Li, R., Li, Yi-min, Zheng, Y., Li, Yan-ping, Luo, D., Pan, B., Nong, Y., Ge, S.-X., Xiong, J., Shih, J.W., Ng, M.-H., Xia, N., 2009. Randomized-controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed recombinant hepatitis E vaccine. Vaccine 27, 1869–1874. <u>https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.061</u>
- Zhang, J., Zhang, X.-F., Zhou, C., Wang, Z.-Z., Huang, S.-J., Yao, X., Liang, Z.-L., Wu, T., Li, J.-X., Yan, Q., Yang, C.-L., Jiang, H.-M., Huang, H.-J., Xian, Y.-L., Shih, J.W.-K., Ng, M.-H., Li, Y.-M., Wang, J.-Z., Zhu, F.-C., Xia, N.-S., 2014. Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccineinduced immunity. Clin Microbiol Infect 20, 0397-405. <u>https://doi.org/10.1111/1469-0691.12419</u>

- Zhang, L., Tian, Y., Wen, Z., Zhang, F., Qi, Y., Huang, W., Zhang, H., Wang, Y., 2016. Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2: ASGPR Facilitates HEV Infection. J. Med. Virol. 88, 2186–2195. <u>https://doi.org/10.1002/jmv.24570</u>
- Zhang, X., Cremers, N., Hendrickx, S., Debing, Y., Roskams, T., Coelmont, L., Neyts, J., Kaptein, S.J.F., 2023. Establishment of a robust rat hepatitis E virus fecal-oral infection model and validation for antiviral studies. Antiviral Research 216, 105670. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105670
- Zhang, Y., Luo, W., Wang, H., Lin, P., Vetrivel, K.S., Liao, F., Li, F., Wong, P.C., Farquhar, M.G., Thinakaran, G., Xu, H., 2005. Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/gamma-secretase components. J Biol Chem 280, 17020–17026. https://doi.org/10.1074/jbc.M409467200
- Zhang, Y., Wen, Z., Shi, X., Liu, Y.-J., Eriksson, J.E., Jiu, Y., 2021. The diverse roles and dynamic rearrangement of vimentin during viral infection. Journal of Cell Science 134, jcs250597. https://doi.org/10.1242/jcs.250597
- Zhang, Y., Zhao, S., Li, Y., Feng, F., Li, M., Xue, Y., Cui, J., Xu, T., Jin, X., Jiu, Y., 2022. Host cytoskeletal vimentin serves as a structural organizer and an RNA-binding protein regulator to facilitate Zika viral replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 119, e2113909119. https://doi.org/10.1073/pnas.2113909119
- Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., Wang, C., 2020. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. Front. Mol. Neurosci. 13, 137. <u>https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137</u>
- Zhao, M., Li, X.-J., Tang, Z.-M., Yang, F., Wang, S.-L., Cai, W., Zhang, K., Xia, N.-S., Zheng, Z.-Z., 2015. A Comprehensive Study of Neutralizing Antigenic Sites on the Hepatitis E Virus (HEV) Capsid by Constructing, Clustering, and Characterizing a Tool Box. Journal of Biological Chemistry 290, 19910–19922. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M115.649764</u>
- Zhao, Y., Zhang, X., Zhu, F., Jin, H., Wang, B., 2016. A preliminary cost-effectiveness analysis of hepatitis E vaccination among pregnant women in epidemic regions. Human Vaccines & Immunotherapeutics 12, 2003–2009. <u>https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1141844</u>
- Zhou, R., Yang, G., Guo, X., Zhou, Q., Lei, J., Shi, Y., 2019. Recognition of the amyloid precursor protein by human γ-secretase. Science 363, eaaw0930. <u>https://doi.org/10.1126/science.aaw0930</u>
- Zhu, F.-C., Zhang, J., Zhang, X.-F., Zhou, C., Wang, Z.-Z., Huang, S.-J., Wang, H., Yang, C.-L., Jiang, H.-M., Cai, J.-P., Wang, Y.-J., Ai, X., Hu, Y.-M., Tang, Q., Yao, X., Yan, Q., Xian, Y.-L., Wu, T., Li, Y.-M., Miao, J., Ng, M.-H., Shih, J.W.-K., Xia, N.-S., 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet 376, 895–902. <u>https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61030-6</u>
- Zizioli, D., Geumann, C., Kratzke, M., Mishra, R., Borsani, G., Finazzi, D., Candiello, E., Schu, P., 2017. γ2 and γ1AP-1 complexes: Different essential functions and regulatory mechanisms in clathrindependent protein sorting. Eur J Cell Biol 96, 356–368. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.03.008
- Zlatic, S.A., Grossniklaus, E.J., Ryder, P.V., Salazar, G., Mattheyses, A.L., Peden, A.A., Faundez, V., 2013. Chemical-genetic disruption of clathrin function spares adaptor complex 3–dependent endosome vesicle biogenesis. MBoC 24, 2378–2388. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0860</u>