

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »**

Année : 2023

N° : 10

**THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Maryam MOUSALLI

Née le 11/06/1996 à Bourges (18)

**PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10 MARS 2023**

**CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION DE  
LA PROTÉINE ORF2 DU VIRUS DE L'HÉPATITE E ET DE  
L'APOLIPOPROTÉINE E EN LIGNÉES HÉPATIQUES**

**JURY**

**PRÉSIDENTE** : Mme Martine BRAIBANT, Enseignant-Chercheur, Maître de Conférences, Faculté de pharmacie – Tours

**MEMBRES :**

Mr Denys BRAND, Enseignant-Chercheur, Professeur des Universités, Faculté de pharmacie – Tours

Mr Julien MARLET, Enseignant-Chercheur, Maître de Conférences et Praticien hospitalier, Faculté de pharmacie – Tours

Mme Maryam MARICHATOU, Pharmacienne d'officine – Orléans

**ANNEE : 2022 - 2023**

**Directeur : Pr Denys BRAND**

**Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE**

**Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD**

**ENSEIGNANTS**

**12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

**6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS**

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

**2 PROFESSEURS ÉMERITES**

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

**36 MAITRES DE CONFÉRENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE

Mise à jour du 01/09/2022

HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### 3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### 3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

POUPIN	Pierre	BIOSTATISTIQUES ET SANTE PUBLIQUE
RAMDANI	Yanis	IMMUNOLOGIE
TULOU	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

### 3 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

AMRANE	Dyhia	CHIMIE ORGANIQUE
MEHENNI	Lyes	CHIMIE ANALYTIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE

### 1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### 1 contrat d'enseignement

GERBIER (contrat enseig)	Soledad	ANGLAIS
--------------------------	---------	---------

### 3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date : 10/03/2023

L'étudiant



Le Doyen de la Faculté  
Professeur Denys BRAND

## **Remerciements**

Tout d'abord, mes remerciements vont à mon directeur de thèse, Monsieur BRAND, Professeur des Universités et Doyen de la faculté de pharmacie de Tours. Je vous remercie pour la qualité des enseignements en virologie fournis tout au long de mes études, pour vos conseils avisés ainsi que la supervision dans la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également Madame BRAIBANT, Maître de Conférences à l'université de Tours, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à mon travail.

À Monsieur MARLET, Maître de Conférences à l'université de Tours, merci d'avoir été l'un des premiers à épancher ma curiosité concernant le domaine de la virologie en m'expliquant votre parcours et en acceptant de me faire visiter le laboratoire il y a de ça quelques années. Merci de faire partie de mon jury aujourd'hui.

À Madame MARICHATOU, Docteur en pharmacie, sache que tu es une belle personne et que je suis très fière de t'avoir auprès de moi aussi bien en tant que jurée qu'en tant qu'amie.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres de l'équipe MAVIVH, qui m'ont apporté une formation de qualité, et ont su m'orienter, m'aider et me conseiller durant mes travaux et ce toujours dans la bienveillance et la bonne humeur.

Merci à ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines pour votre aide et votre soutien au quotidien. Je serai à jamais reconnaissante et fière de ces liens forts qui nous unissent.

À mes parents, « merci » reste un mot trop simple pour vous exprimer toute la gratitude que j'éprouve envers vous. Merci d'avoir fait en sorte que je ne manque de rien, de m'avoir élevée, éduquée et inculquée les valeurs qui font de moi celle que je suis. Merci de m'accompagner dans chaque moment de ma vie, de me rendre confiante dans les moments de doute et de m'encourager à être la meilleure.

À mes petites sœurs, même si on est trop têtues pour se le dire sachez que je vous aime. Je serai toujours là pour vous, votre bonheur est ma priorité.

Je remercie du plus profond de mon cœur mes grands-parents qui étaient si fiers de mon parcours. Merci de m'avoir encouragée, valorisée et réconfortée. Vous avez été et resterez pour moi une grande source de force et d'inspiration. Vous me manquez tous les jours.

Merci à mes amies Amneh, Line, Serve et Mélissa, qui m'ont toujours épaulée et remontée le moral durant ces études. Merci pour ces bons souvenirs que l'on a construit ensemble.

## **Table des matières**

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux .....	10
Liste des abréviations .....	10
Introduction .....	12
<b>1. <u>Partie 1 : Généralités sur le virus de l'hépatite E</u></b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Découverte du virus de l'hépatite E</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2. Organisation moléculaire du virus de l'hépatite E</b> .....	<b>14</b>
1.2.1. Protéines virales.....	14
1.2.1.1. Protéine <i>ORF1</i> .....	14
1.2.1.2. Protéine <i>ORF4</i> .....	15
1.2.1.3. Protéine <i>ORF2</i> .....	16
1.2.1.4. Protéine <i>ORF3</i> .....	20
1.2.2. Quasi-enveloppe virale.....	22
<b>1.3. Cycle de multiplication viral</b> .....	<b>24</b>
1.3.1. Attachement.....	24
1.3.1.1. <i>Virus de l'hépatite E nu</i> .....	24
1.3.1.2. <i>Virus de l'hépatite E quasi-enveloppé</i> .....	25
1.3.2. Pénétration.....	26
1.3.3. Décapsidation.....	27
1.3.4. Réplication.....	27
1.3.5. Assemblage.....	30
1.3.6. Libération.....	30
1.3.6.1. <i>Libération des particules virales</i> .....	30
1.3.6.2. <i>Sécrétion de la protéine ORF2s</i> .....	31
<b>2. <u>Partie 2 : Epidémiologie, pathogénèse et thérapeutiques</u></b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. Épidémiologie</b> .....	<b>33</b>
2.1.1. Génotypes 1 et 2.....	36
2.1.2. Génotypes 3 et 4.....	36
2.1.1. Autres génotypes.....	38

<b>2.2. Pathogénèse.....</b>	<b>38</b>
2.2.1. Physiopathologie.....	38
2.2.2. Manifestations cliniques.....	40
2.2.1.1. Hépatite E aiguë.....	40
2.2.1.1.1. Pathogénèse chez les femmes enceintes.....	41
2.2.1.1.2. Insuffisance Hépatique aiguë-sur-chronique.....	42
2.2.1.2. Hépatite E chronique.....	42
2.2.1.3. Manifestations extra-hépatiques.....	43
2.2.3. Diagnostic et traitement.....	44
2.2.2.1. Diagnostic.....	44
2.2.2.2. Traitement.....	45
 <b>3. <u>Partie 3</u> : L'apolipoprotéine E .....</b>	<b>47</b>
3.1. Généralités sur l'apolipoprotéine E.....	47
3.2. L'apolipoprotéine E en virologie.....	49
 <b>4. <u>Partie 4</u> : Travail expérimental .....</b>	<b>52</b>
4.1. Matériels et méthodes.....	52
4.1.1. Matériels.....	52
4.1.1.1. Cellules PLC/PRF/5 et Huh7.5.....	52
4.1.1.2. Plasmides codant pour la protéine ORF2 ou le VHE complet.....	52
4.1.1.3. Anticorps.....	53
4.1.2. Méthodes.....	54
4.1.2.1. Électroporation des cellules PLC/PRF/5 pour expression du génome complet du VHE.....	54
4.1.2.2. Transfection des cellules PLC/PRF/5 et Huh7.5 avec un plasmide contenant la séquence de la protéine ORF2 du VHE.....	55
4.1.2.3. Étude de la co-immunoprécipitation de l'apoE et de la protéine ORF2..	56
4.1.2.4. Détection des protéines ORF2, ORF3, apoE et apoB par Western Blot..	56
4.1.2.5. Marquage des protéines ORF2, apoE et apoB par immunofluorescence..	57

<b>4.2. Résultats</b>	58
4.2.1. Co-Immunoprécipitation	58
4.2.1.1. Co-Immunoprécipitation de l'apoE avec la protéine ORF2 en système VHEcc	58
4.2.1.2. Co-immunoprécipitation de l'apoE avec la protéine ORF2 en système hétérologue	59
4.2.2. Immunofluorescence	61
4.2.2.1. Comparaison de différents agents de transfection sur l'efficacité de transfection	61
4.2.2.2. Étude de la localisation de la protéine ORF2 et de l'apoE en système hétérologue	63
4.2.2.3. Comparaison de la colocalisation de l'apoE et la protéine ORF2 entre différentes lignées cellulaires hépatiques	63
4.2.2.4. Étude de la colocalisation la protéine ORF2 et de l'apoB en système hétérologue	66
<b>4.3. Discussion</b>	67
Conclusion	71
Références bibliographiques	73



## **Liste des figures**

**Figure 1 :** Génome du virus de l'hépatite E.

**Figure 2 :** Représentation schématique des séquences des protéines ORF1 et ORF4 du VHE.

**Figure 3 :** Représentation schématique de la séquence de protéine de capside ORF2 du VHE.

**Figure 4 :** Représentation tridimensionnelle des potentiels sites de N-glycosylation de la protéine ORF2 du VHE.

**Figure 5 :** Représentation de la séquence de la protéine de capside ORF2.

**Figure 6 :** Représentation de la séquence de la protéine ORF3 du VHE.

**Figure 7 :** Représentation schématique des particules non-enveloppées et quasi-enveloppées du VHE ainsi que d'un virus enveloppé.

**Figure 8 :** Schéma de l'endocytose clathrine dépendante du virus de l'hépatite E.

**Figure 9 :** Étapes de la réplication du VHE.

**Figure 10 :** Régulation temporelle de la transcription des ARN génomiques et sous-génomiques du VHE.

**Figure 11 :** Analyse structurale en microscopie électronique de cellules PLC/PRF/5 infectées par le virus de l'hépatite E.

**Figure 12 :** Cycle de multiplication du virus de l'hépatite E.

**Figure 13 :** Taxonomie du virus de l'hépatite E.

**Figure 14 :** Localisation mondiale des zones hautement endémiques et endémiques à VHE. (A) et des différents génotypes du VHE responsables d'infections chez l'Homme (B).

**Figure 15 :** Répartition géographique des cas d'infection par le VHE en France en 2020.

**Figure 16 :** Transport du VHE à travers l'organisme.

**Figure 17 :** Possible facteurs déclenchants du syndrome de Guillain-Barrée après infection par le VHE.

**Figure 18 :** Évolution des marqueurs virologique et sérologique après une hépatite virale E.

**Figure 19 :** Constitution d'une lipoprotéine.

**Figure 20 :** Représentation schématique de l'apolipoprotéine E humaine.

**Figure 21 :** (A) Plasmide contenant le génome complet du clone p6 de la souche Kernow-C1 du VHE. (B) Plasmide contenant le gène de la protéine ORF2 du VHE.

**Figure 22 :** Analyse par Western Blot des co-immunoprécipitations anti-apoE en système VHEcc (A) et en système hétérologue (B) sur lignée PLC/PRF/5.

**Figure 23 :** Comparaison de différents agents transfectants sur l'efficacité de transfection et la localisation intracellulaire de la protéine ORF2.

**Figure 24 :** Observation en microscopie confocale de la localisation de l'apoE et de la protéine ORF2 en système hétérologue.

**Figure 25 :** Observation en microscopie confocale de la localisation de l'apoB et de la protéine ORF2 en système hétérologue.

## **Liste des tableaux**

**Tableau I:** Composition de la solution de transfection en fonction des agents de transfection utilisés.

## **Liste des abréviations**

**aa :** Acide aminé

**ACLF :** Insuffisance hépatique aiguë-sur-chronique

**ApoE :** Apolipoprotéine E

**ASGPR :** Récepteurs aux asialoglycoprotéines

**ATP5B :** Sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase

**CMV :** Cytomégalovirus

**ESCRT :** Complexes de tri endosomaux nécessaires au transport

**eVHE :** Virus de l'Hépatite E quasi-enveloppé

**GTP :** Guanosine triphosphate

**GRP78 :** Protéine régulée par le glucose de 78 kDa

**HDL :** Lipoprotéines de haute densité

**hnRNP :** Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène

**HSPGs :** Protéoglycanes à héparane sulfate

**HSP70 :** Protéine de choc thermique de 70 kDa

**Huh 7.5 :** *Human Hepatocarcinoma cells*

**HRP :** Peroxydase de Raifort

**HVR :** Région hypervariable

**HVH-6 :** Herpèsvirus humain de type 6

**IDL :** Lipoprotéines de densité intermédiaire

**IgG :** Immunoglobulines G

**IgM :** Immunoglobulines M

**ITGA3 :** Intégrine  $\alpha 3$

**kDa :** kilo Dalton

**LDL :** Lipoprotéines de basse densité

**LDLR :** Récepteurs des LDL

**LRP :** Protéine apparentée au récepteur de LDL

**MVB :** Corps multivésiculaires

**neVHE** : Virus de l'Hépatite E nu

**nt** : Nucléotide

**ORF** : Cadre ouvert de lecture

**ORF2c** : Forme clivée de la protéine ORF2

**ORF2g** : Forme glycosylée de la protéine ORF2

**ORF2i** : Forme infectieuse de la protéine ORF2

**ORF2s** : Forme sécrétée de la protéine ORF2

**pb** : Paire de bases

**PCP** : Papaine Cystéine Protéase

**PLC/PRF/5** : *Primary Liver Carcinoma/Poliomyelitis Research Foundation/5*

**PSAP** : Proline-Sérine-Alanine-Proline

**RdRp** : ARN polymérase ARN dépendante

**SNP** : Système Nerveux Périphérique

**SGB** : Syndrome de Guillain-Barré

**SVF** : Sérum de Veau Fœtal

**Tsg101** : Gène 101 de sensibilité aux tumeurs

**TIM-1** : Immunoglobuline à cellules T et de domaine de la mucine

**VHA** : Virus de l'Hépatite A

**VHB** : Virus de l'Hépatite B

**VHC** : Virus de l'Hépatite C

**VHE** : Virus de l'Hépatite E

**VHEcc** : Virus de l'Hépatite E issu de culture cellulaire

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**VLDL** : Lipoprotéines de très basse densité

## **Introduction**

L'infection par le virus de l'hépatite E est la première cause d'hépatite aiguë à travers le monde entraînant chaque année plus de 20 millions de cas et 70 000 décès. Les génotypes 1 et 2 du VHE sont retrouvés majoritairement dans les pays en développement où ils sont responsables d'épidémies. Dans les pays industrialisés, où les génotypes 3 et 4 circulent, l'infection est souvent sporadique.

L'hépatite E se manifeste généralement par une infection aiguë nécessitant rarement une prise en charge. Cependant, les femmes enceintes infectées sont exposées à un risque accru d'hépatite fulminante, de perte fœtale et de mortalité. Les patients immunodéprimés infectés peuvent aussi développer une infection chronique pouvant évoluer en cirrhose et entraîner le décès. Il n'existe à ce jour aucun traitement antiviral spécifique contre l'hépatite E. C'est pour ces raisons que le VHE représente actuellement un problème de santé publique majeur, et s'impose comme un fardeau sanitaire aussi bien pour les pays industrialisés que les pays en développement.

Même si les recherches menées durant ces dernières années ont permis d'en apprendre plus sur le VHE, peu de données sont réunies concernant son cycle de multiplication et son mécanisme de virulence. Une meilleure compréhension des facteurs cellulaires impliqués dans la réplication et/ou la pathogénèse virale serait essentielle au développement de thérapies antivirales contre l'hépatite E.

L'apolipoprotéine E est une protéine constitutive des lipoprotéines jouant un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique et le transport du cholestérol. Elle est impliquée dans le cycle de multiplication et la pathogénèse de nombreux virus dont certains virus des hépatites. Des études menées durant la dernière décennie lui prêteraient un rôle dans le cycle du VHE. De plus des résultats préliminaires obtenus par l'équipe INSERM U1259 MAVIVH montrent une interaction de l'apoE avec la protéine ORF2 du VHE.

L'objectif de cette thèse est de caractériser l'interaction entre la protéine ORF2 du VHE et l'apolipoprotéine E en lignées cellulaires hépatiques. Ainsi, nous débiteront par une première partie traitant des généralités concernant le VHE, son organisation moléculaire et son cycle de multiplication. Dans une seconde partie seront présentées la situation épidémiologique, la transmission du virus ainsi que ses manifestations cliniques et sa prise en charge thérapeutique. La troisième partie se concentrera sur l'apolipoprotéine E, de son rôle physiologique et son implication dans certaines pathologies notamment celles d'ordre virales. Pour finir, la dernière partie traitera du travail expérimental réalisé, les résultats obtenus seront présentés et discutés.

# **1. Partie 1 : Généralités sur le virus de l'hépatite E**

## **1.1. Découverte du virus de l'hépatite E**

L'hépatite E a été décrite pour la première fois en 1978, à la suite d'une épidémie d'hépatite aiguë survenue dans la vallée du Cachemire en Inde (1). Sur 16 620 habitants, 275 ont développé une hépatite dont l'agent causal n'était pas détectable par les tests de diagnostic de l'hépatite A (VHA) ou de l'hépatite B (VHB) (2). L'observation d'une augmentation du taux d'incidence, en se rapprochant du fleuve servant de source d'eau aux habitants, a permis de mettre en évidence une contamination fécale de ce cours d'eau dans lequel les eaux usées et les ordures de la localité étaient déversées. Les habitants utilisant d'autres sources d'eau, en particulier l'eau de puit, ne souffraient pas d'hépatites, montrant que le fleuve était la source de transmission (1). Une incidence et une sévérité plus élevées ont été mises en évidence chez les femmes enceintes infectées, ainsi qu'un taux élevé de morts périnatales dus à des avortement et accouchements prématurés ainsi que des fausses couches (1,3) .

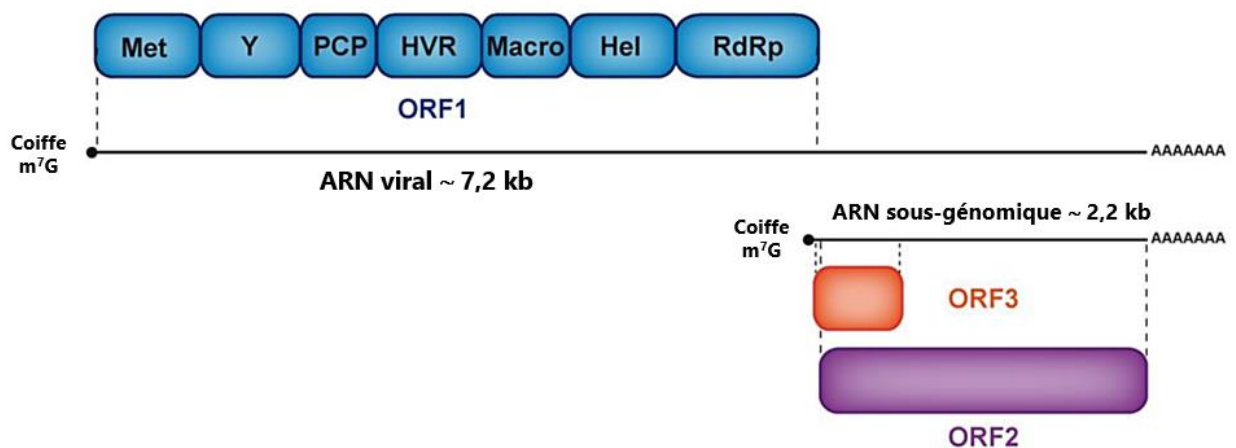
L'hypothèse d'une épidémie d'hépatite C, qualifiée d'hépatite non-A non-B à l'époque, avait aussi été écartée car aucune transmission parentérale n'avait été observée (4). En 1981, une épidémie ressemblant fortement à celle décrite au Cachemire, s'est développée dans un camp militaire soviétique en Afghanistan. Afin d'en déterminer l'agent causal, le virologue Mikail Balayan a ingéré une suspension de selles provenant de 9 patients contaminés. Il a déclaré des symptômes d'hépatite aiguë semblables à ceux d'une infection par le virus de l'hépatite A après un temps d'incubation de 36 jours, soit 10 jours de plus que celui du VHA (5). L'observation en microscopie électronique de ses selles, lui a permis d'identifier des particules virales, qui, une fois inoculées à des macaques, reproduisaient des symptômes similaires à une hépatite (5).

Ces découvertes ont permis de confirmer l'existence d'un nouveau virus responsable d'hépatite aiguë chez l'Homme, différent des agents déjà identifiés jusque-là. Le virus de l'hépatite E (VHE) fut initialement classé dans la famille des *Caliciviridae* du fait de ses propriétés morphologiques proches des calicivirus (6) et ce, malgré une forte apparenté génomique avec les *Togaviridae* (7,8). C'est en 1990, que l'intégralité de son génome fut séquencé pour la première fois (9). Il fut finalement exclu de cette famille car chez le VHE, la région codant la capsid se situe à l'extrémité 3' du génome et non en 5' comme chez les calicivirus (10). C'est finalement en 2001, à la suite de l'analyse approfondie de son génome, que lui sera accordé sa propre famille, celle des *Hepeviridae*, qui regroupe aujourd'hui les différents génotypes du VHE (11,12).

## 1.2. Organisation moléculaire du virus de l'hépatite E

### 1.2.1. Protéines virales

Le VHE est un virus nu, à capside icosaédrique, mesurant entre 40 et 70 nm de diamètre (13). Son génome est constitué d'un ARN de polarité positive (**Fig. 1**) d'environ 7,2 kb portant une coiffe de 7-méthylguanosine à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3' (**Fig. 1**). Il contient également 2 régions non-transcrites : une région de 27 nucléotides en 5' et une autre de 65 nucléotides en 3' (14). Son génome comporte 3 cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame*) codant pour 3 protéines différentes : la protéine ORF1, la protéine ORF2 et la protéine ORF3 (**Fig. 1**).



**Figure 1 : Génome du virus de l'hépatite E.** Le brin d'ARN viral positif de 7,2 kb comporte 3 ORFs qui codent pour les protéines ORF1, ORF2 et ORF3. L'ORF1 code pour une polyprotéine comportant différents domaines fonctionnels. Elle est directement traduite à partir du génome viral. L'ORF2 code pour la protéine virale de capside et l'ORF3 code pour une petite protéine impliquée dans la sécrétion. Ces protéines virales sont traduites à partir d'un ARN subgénomique de 2,2 kb généré pendant la réplication virale. m<sup>7</sup>G : 7 méthyl-guanosine, MetT : domaine méthyl-transférase, Y : domaine Y, PCP : domaine papaine cystéine protéase, HVR : domaine hypervariable, Macro : macrodomaine, Hel : domaine hélicase, RdRp : domaine ARN polymérase ARN-dépendante. (Oechslin *et al.*, *Cells* 2020)

#### 1.2.1.1. Protéine ORF1

La protéine ORF1 est codée par un cadre ouvert de lecture de 5 081 pb constituant 70% du génome viral. Cette polyprotéine non structurale est directement transcrite de l'ARN (**Fig. 1**) (15,16). Elle comporte 7 domaines ayant diverses activités nécessaires à la réplication (**Fig. 2**). Plusieurs études montrent que les patients ayant une hépatite E aiguë sont infectés par des virus contenant des mutations au sein de l'ORF1 (17).

Le domaine méthyltransférase de l'ORF1 permet le transfert d'un groupement méthyl vers du guanosine triphosphate (GTP). Cette méthylation permet la formation d'un groupement m7-GTP qui se liera de façon covalente à l'extrémité 5' du génome viral permettant ainsi la formation de la coiffe 7-méthylguanosine (18,17).

Les fonctions des domaines X et Y restent encore peu connues. Le domaine X aurait un rôle dans la réplication virale et/ou la traduction. La séquence du domaine Y comporte différents motifs communs à plusieurs génotypes du VHE et serait essentiel à sa pathogénicité (19).

Le domaine papaine cystéine protéase (PCP) cliverait la polyprotéine ORF1 en différentes protéines fonctionnelles (20) ou cliverait des protéines cellulaires (16).

La séquence du domaine hypervariable de l'ORF1 présente le plus de divergence entre les différents génotypes du VHE. Son rôle spécifique reste à déterminer. Cette région riche en proline est une zone charnière qui octroierait une certaine flexibilité à la protéine ORF1 (21,22). Des délétions ou substitutions dans cette séquence entraînent une réduction de l'efficacité de la réplication virale, montrant un potentiel rôle du domaine hypervariable dans ce processus (23).

D'après divers études, le domaine hélicase du VHE posséderait une activité 5' nucleoside-triphosphatase (NTPase) (24,25), retrouvée également chez beaucoup de virus ARN (26), qui permettrait d'hydrolyser l'ATP et serait essentiel à la formation de la coiffe.

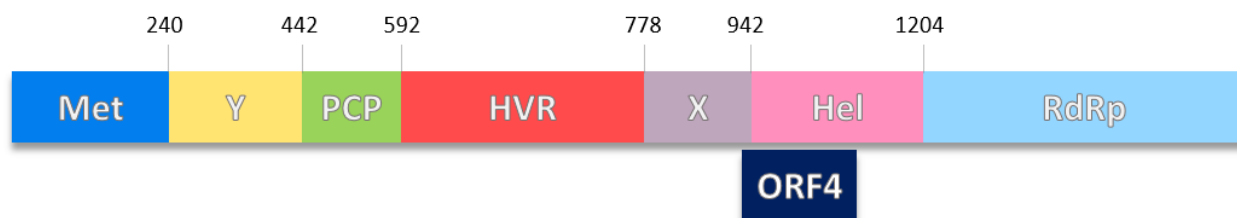
Le domaine ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) catalyse la réplication de l'ARN viral. Ce domaine interagirait avec les domaines PCP, méthyltransférase et hélicase puisqu'ils exercent ensemble des fonctions complémentaires dans la transcription de l'ARN viral (27). De plus, il interagit avec le système immunitaire ainsi que plusieurs protéines cellulaires (28,29).

Lors de la réplication, la protéine ORF1 permet la production d'un ARN subgénomique codant pour les protéines ORF2 et ORF3, dont les séquences sont chevauchantes sur 330 nucléotides (**Fig. 1**)(16,30).

#### *1.2.1.2. Protéine ORF4*

La protéine ORF4, identifiée récemment, est spécifique aux souches de VHE appartenant au génotype 1 (31). Elle est codée par un cadre ouvert de lecture de 479 nucléotides, chevauchant celui de la protéine ORF1 (**Fig. 2**)(31). Cette protéine n'est produite que sous conditions de stress du réticulum endoplasmique permettant ainsi une réplication optimale du VHE (31). Elle permet l'assemblage d'un complexe protéique, favorisant la réplication virale, grâce à son interaction directe avec les domaines hélicase et le domaine X de l'ORF1, et

indirecte avec la RpRd. L'ORF4 interagit également avec la protéine ORF3 du VHE (31). Des études plus approfondies pourront permettre de mieux caractériser les fonctions de l'ORF4 dans la réplication et la physiopathologie du VHE de génotype 1, notamment chez les femmes enceintes.

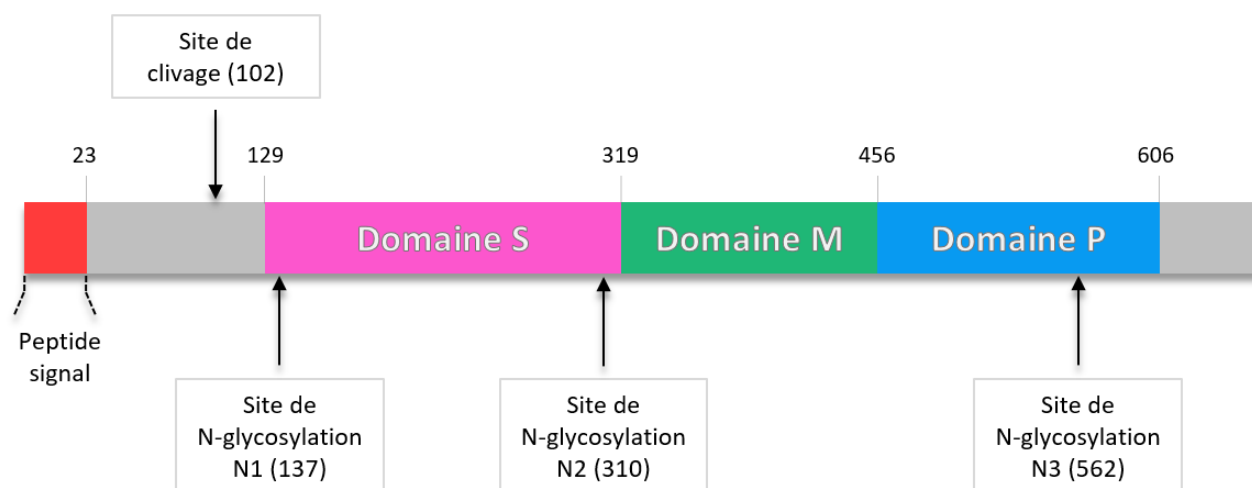


**Figure 2 : Représentation schématique des séquences des protéines ORF1 et ORF4 du VHE.** Ici les séquences représentées sont celles codées par la souche de VHE de génotype 1. La protéine ORF1 est codée par un cadre ouvert de lecture de 5 081 pb. Sa séquence protéique, composée de 1 693 aa, est divisée en 7 domaines différents. La protéine ORF4 est codée par un cadre ouvert de lecture de 479 pb chevauchant celui de la protéine ORF1. Sa séquence protéique est composée de 158 aa. Elle est spécifique aux souches de VHE appartenant au génotype 1. Sont indiqués au-dessus la position des acides aminés délimitant les différents domaines de l'ORF1. MetT : domaine méthyl-transférase, Y : domaine Y, PCP : domaine papaine cystéine protéase, HVR : domaine hypervariable, Macro : macrodomaine, Hel : domaine hélicase, RdRp : domaine ARN polymérase ARN-dépendante.

#### 1.2.1.3. Protéine ORF2

L'ORF2 de 1 983 nucléotides code pour la protéine de capsid (16). Elle est constituée de 3 domaines distincts : S (*Shell* - capsid), M (*Middle* - milieu) et P (*Protruding* - protubérance) (**Fig. 3**). L'interaction des domaines S (aa 129 - 319), des différentes sous-unités permet la formation de la capsid virale de symétrie icosaédrique et est impliquée dans sa stabilité (32,33). Le domaine M (aa 320 - 455), localisé à la surface de la capsid, est étroitement fixé au domaine S (**Fig. 3**) (34). L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le domaine M neutralise l'interaction du virus avec la cellule hôte, suggérant son importance dans l'infection virale (35). Les domaines M et P sont reliés par une région charnière riche en proline permettant une certaine flexibilité de la protéine ORF2. Le domaine P (aa 456 – 606), situé à l'extrémité C-terminale, s'assemble en dimère formant une protubérance impliquée dans l'interaction du virus avec le récepteur cellulaire (**Fig. 3**). Il serait la cible des anticorps neutralisants (34,36).

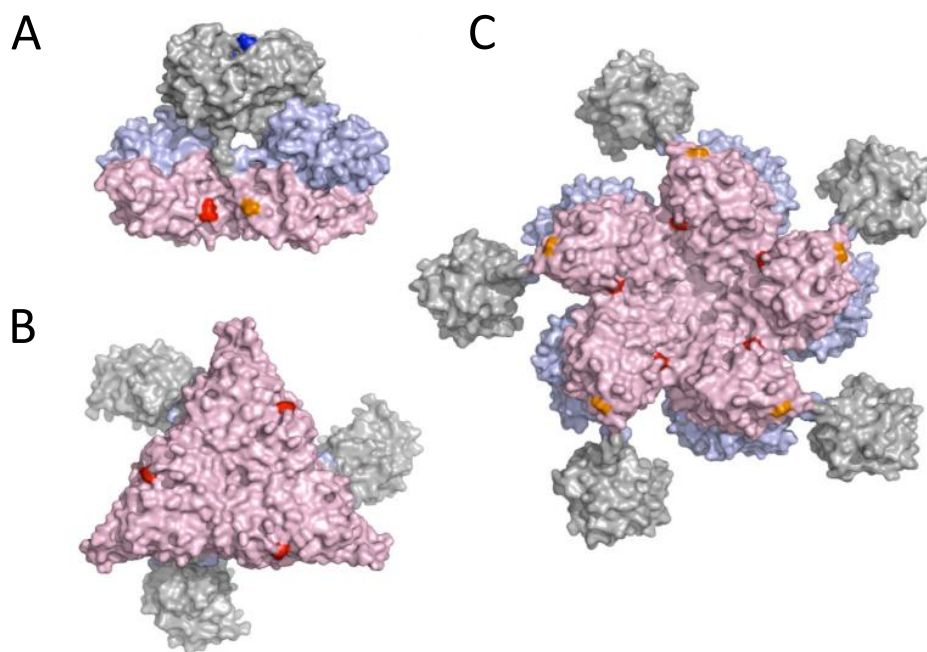




**Figure 3 : Représentation schématique de la séquence de protéine de capsid ORF2 du VHE.** La protéine ORF2 est codée par un cadre ouvert de lecture de 1 983 pb. Sa séquence protéique est constituée de 660 aa, dans laquelle on retrouve un peptide signal, 1 site de clivage et 3 potentiels sites de N-glycosylation. La séquence de la protéine de capsid regroupe 3 domaines ayant des fonctions distinctes : le domaine S formant la capsid icosaoédrique, le domaine M impliqué dans l'infection et le domaine P formant la protubérance virale ciblée par les anticorps neutralisants. Ces domaines sont représentés respectivement en rose, vert et bleu. Sont indiqués au-dessus la position des acides aminés délimitant les différents domaines de l'ORF2.

Différentes structures de la protéine ORF2 ont été mises en évidence avec notamment une forme issue de l'ORF2i (infectieuse) associée aux néo-virions et une forme issue de l'ORF2s (sécrétée) empruntant les voies de sécrétion et libérée dans le milieu extracellulaire (13). La forme ORF2i, de 80 kDa, n'est pas glycosylée et constitue la capsid virale. Elle rejoint le site d'assemblage des virions et se lie en 5' du génome viral afin de l'encapsider pour former des particules infectieuses (**Fig. 12**)(13). La forme ORF2s est glycosylée et sialylée après translocation dans le réticulum endoplasmique avant d'être sécrétée sous forme de dimères (**Fig. 12**). Elle est retrouvée en extra-cellulaire sous 2 formes : la protéine ORF2g (glycosylée) de 90 kDa, elle-même clivée ensuite dans sa partie N-terminale pour donner la protéine ORF2c (clivée) de 75 kDa (**Fig. 5**). Ce clivage serait probablement dû à l'action d'une protéase *furine-like* qui reconnaît le motif R-R-R présent en amont de l'extrémité N-terminale de l'ORF2c (**Fig. 5**)(13). Ces 2 formes sont sécrétées rapidement sans accumulation intracellulaire. Elles sont présentes en grande quantité dans le sérum de patients infectés, même lorsque le virus ne se réplique plus. Elles constitueraient un leurre immunologique inhibant l'action des anticorps neutralisants.

Une forme nucléaire de la protéine ORF2 a récemment été décrite et observée dans les biopsies de foie de patients infectés (37). Elle serait transloquée dans le noyau, où elle contrôlerait certaines fonctions cellulaires afin de promouvoir la réplication virale et/ou d'altérer la réponse immunitaire (38).

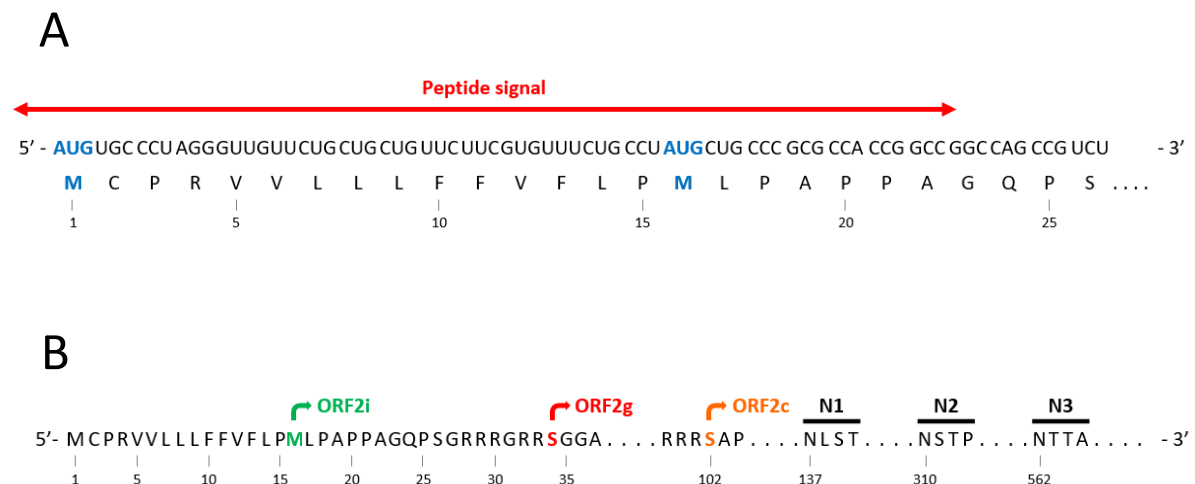


**Figure 4 : Représentation tridimensionnelle des potentiels sites de N-glycosylation de la protéine ORF2 du VHE.** La protéine ORF2 est ici représentée sous forme dimérique (A), trimérique (B) et pentamérique (C). Cette cartographie représente une particule pseudo-virale de VHE dérivée du génotype 3. Les résidus asparagine des potentiels sites de N-glycosylation sont représentés sur les différentes vues en rouge pour le résidu  $^{137}\text{N}$  du site N1, en orange pour le résidu  $^{310}\text{N}$  du site N2 et bleu pour le résidu  $^{562}\text{N}$  du site N3. Les domaines S, M et P sont indiqués respectivement en rose, bleu et gris. (Yamashita *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009)

L'ORF2 comporte dans sa séquence 3 motifs consensus de N-glycosylation (N-X-S/T avec  $X \neq P$ ) donc 3 potentiels sites de N-Glycosylation (**Fig. 3, 4 et 5**): le site N1 au résidu 137 ( $^{137}\text{N-L-S-T}$ ), le site N2 au résidu 310 ( $^{310}\text{N-S-T-P}$ ) et le site N3 au résidu 562 ( $^{562}\text{N-T-T-A}$ ) (39,40). Des études menées par Ankavay *et al.* (38) montrent que la déglycosylation enzymatique ou l'inhibition de la N-glycosylation des sites N1 ou N3 entraîne une diminution du poids moléculaire des protéines ORF2g et ORF2c mutées. A l'inverse, le profil de migration et le poids moléculaire de ces protéines reste identique avec ou sans inhibition de la N-glycosylation sur leur site N2, suggérant une faible probabilité de glycosylation de ce site. Cette hypothèse semble confirmée par la présence d'un résidu proline immédiatement en aval du motif consensus N2, qui réduirait fortement la probabilité de glycosylation dû à un

encombrement stérique (41). Le site N3 est situé au sommet de la protubérance virale et exposé à la surface de la capsid (Fig. 4). Sa glycosylation pourrait gêner la liaison au récepteur d'entrée mais pourrait cependant jouer un rôle dans la pathogénèse du VHE (34).

L'ORF2s est également O-glycosylée et sialylée comme le montre sa sensibilité à la digestion par le couple d'enzyme neuraminidase/O-glycosidase dans différentes études (13,42).



**Figure 5 : Représentation de la séquence de la protéine de capsid ORF2.** La séquence est issue du génome de la souche Kernow C1/p6 de génotype 3 (A) La protéine ORF2 du virus de l'hépatite E comporte 660 acides aminés, les 23 premiers correspondant à un peptide signal. Sa séquence nucléotidique contient 2 codons *Start* (représentés en bleu) distants de 45 nucléotides l'un de l'autre. L'isoforme ORF2s, dont la traduction est initiée à partir du 1<sup>er</sup> codon *Start*, contient le peptide signal et sera adressée aux voies de sécrétions cellulaires. (B) La séquence protéique de la protéine ORF2i débute par le résidu méthionine en position 16 (représenté en vert). La séquence de la protéine ORF2g débute par l'aa sérine en position 34 (représenté en rouge), après excision de son peptide signal. La séquence peptidique de l'isoforme ORF2c débute par l'aa sérine en position 32, après clivage de l'ORF2g par une protéase *furine-like*. Sont également représentés en gras les 3 potentiels sites de N-glycosylation de la protéine ORF2.

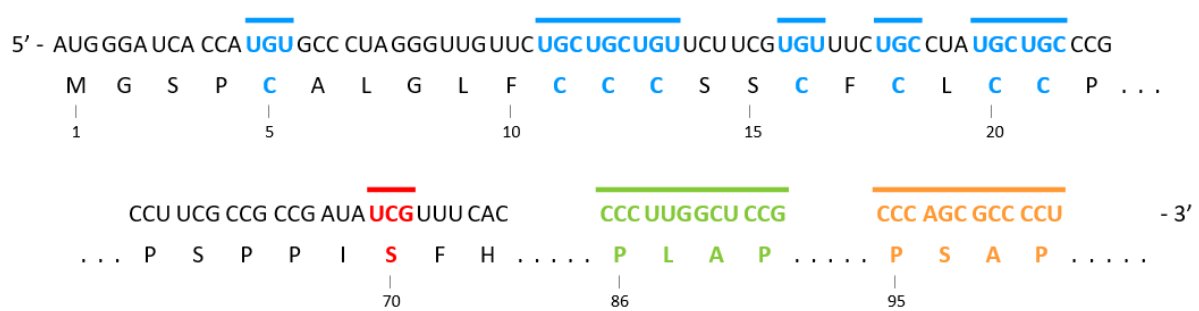
Les différences fonctionnelles entre les protéines ORF2i et ORF2s résultent de leurs séquences nucléotidiques. En effet, la séquence nucléotidique de l'ORF2 contient 2 codons *Start* (AUG) distants de 45 nucléotides l'un de l'autre (Fig. 5). La traduction initiée à partir du 1<sup>er</sup> codon *Start* permet la formation de la protéine ORF2s comportant en N-terminal un peptide signal (aa 1 - 23) permettant son adressage aux voies de sécrétions cellulaires (Fig. 5)(42). La traduction initiée à partir du 2<sup>ème</sup> codon *Start*, permet la production de la protéine ORF2i, exempt de peptide signal et qui, de ce fait, ne sera pas sécrétée et participera à la formation de la particule infectieuse (Fig. 5)(42).

#### 1.2.1.4. Protéine ORF3

L'ORF3 de 344 nucléotides (16) code pour une petite phosphoprotéine transmembranaire hydrophobe que l'on retrouve dans les membranes des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (43,44). Elle est capable de former des complexes multimériques après oligomérisation, probablement grâce à des interactions homophiles (44). Elle intervient dans les étapes tardives du cycle infectieux en créant entre autre un environnement favorable à la réplication virale et à la pathogénèse (45). En effet, elle bloquerait l'expression de plusieurs gènes hépatocytaires en régulant l'activité et la localisation de facteurs de transcription (45). La protéine ORF3 du VHE peut s'assembler en complexes multimériques pour former des viroporines rendant la membrane plus perméable et facilitant la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire (44). Similaire aux viroporines de classe IA, elle fonctionne comme un canal ionique sans avoir de sélectivité pour un ion particulier (44). Son extrémité N-terminale est orientée vers la lumière du RE tandis que son extrémité C-terminale est située côté cytosol et phosphorylée sur un résidu sérine en position 70 (**Fig. 6**)(44). Cet acide aminé est essentiel à l'interaction de la protéine ORF3 avec la protéine de capsid ORF2i non glycosylée (46). Une telle interaction suggère un potentiel rôle de l'ORF3 dans l'assemblage des particules virales.

La protéine ORF3 participe au pouvoir viral infectieux en interférant avec la dynamique du cytosquelette (47,48). Elle augmente la stabilité des microtubules, avec lesquelles elle interagit via ses 2 domaines hydrophobes situés en N-terminal probablement via des protéines motrices (47). Ainsi, le VHE tout comme plusieurs autres virus dont les virus de la grippe et l'herpès simplex, utiliserait le système microtubulaire pour son transport au sein de la cellule afin de faciliter son infection (49,50).

Cette protéine aurait également plusieurs fonctions dans la pathogénèse dont un rôle dans le remaniement des processus cellulaires durant l'infection et la propagation virale. Elle permettrait l'évasion du virus face au système immunitaire en atténuant la réponse innée lors de la phase aiguë de l'infection, en interférant au niveau de cascades de signalisation (51–53) ou en empêchant le processus de phagocytose des macrophages (54). Elle dérégulerait l'expression de gènes impliqués dans certaines fonctions moléculaires et processus biologiques perturbant entre autre l'intégrité membranaire et dérégulant le processus d'apoptose (55).



**Figure 6 : Représentation de la séquence de la protéine ORF3 du VHE.** La séquence est issue du génome de la souche Kernow C1/p6 de génotype 3. La protéine ORF3 est codée par un cadre ouvert de lecture de 344 pb. Cette petite protéine transmembranaire est phosphorylée sur un résidu sérine en position 70 (représenté sur en rouge). Son extrémité N-terminale est riche en résidus cystéine (mis en évidence en bleu), dont certains seront palmitoylés. Le motif PSAP situé en C-terminale, (aa 95 - 98, représenté en orange) de la protéine ORF3 interagit avec la protéine cellulaire Tsg101 permettant au VHE d'emprunter la voie de sécrétion exosomale et de produire sa quasi-enveloppe.

La protéine ORF3 est palmitoylée au niveau de sa région N-terminale riche en cystéine (**Fig. 6**)(56). Les palmitoyltransférases cellulaires lient de façon covalente un acide palmitique à certains résidus cystéine. Cette modification post-traductionnelle est essentielle pour la sécrétion des particules virales. Elle permet de lier la protéine ORF3 à la membrane plasmique et aux membranes subcellulaires ce qui permet l'association des virions aux corps multivésiculaires (**Fig. 11 et 12**). Ces derniers fusionneront à la membrane plasmique entraînant ainsi la libération des virions néoformés. Une fois palmitoylée la protéine sera entièrement exposée du côté cytosolique, attachée à la membrane plasmique via son ancre S-palmitoylée insérée dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (56).

Étant une protéine multifonctionnelle, l'ORF3 pourrait adopter différentes topologies pour exercer ces différentes fonctions tout comme la protéine d'enveloppe du VHB ou la protéine non structurale 4B du VHC (57,58). De ce fait il est concevable qu'une sous-catégorie de protéines ORF3 puissent s'assembler en complexe multimérique afin d'exercer son activité de canal ionique citer précédemment.

La protéine ORF3 intervient dans le bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées. Elle possède deux motifs de type PXXP dans sa région C-terminale, un compris entre les aa 86 à 89 (PLAP) et un autre entre les aa 95 à 98 (PSAP) (**Fig. 6**). Ce dernier est conservé dans toutes les souches de VHE connues (59). Ce motif interagit avec la protéine Tsg101 appartenant au complexe ESCRT impliqué dans la formation des endosomes tardifs et des corps

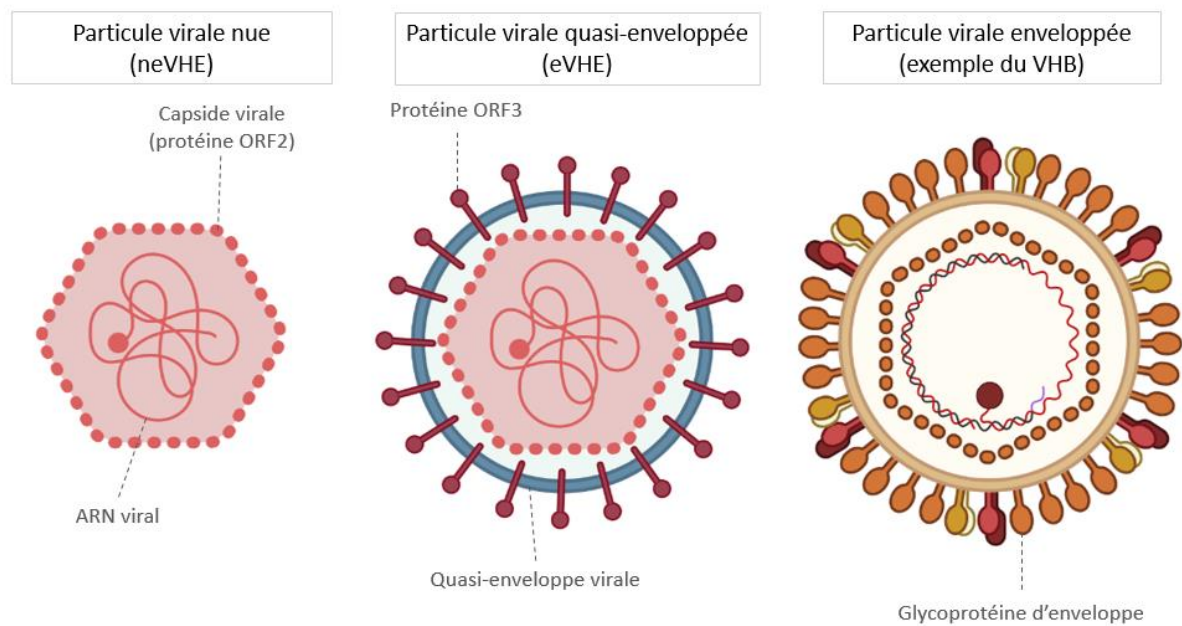
multivésiculaires (**Fig. 12**) (60). Le complexe ESCRT est impliqué dans le bourgeonnement à la membrane des virus des hépatites A, B et C (61–63) ainsi que de plusieurs virus enveloppés tels que le VIH ou Ebola (64,65). L'interaction entre les protéines ORF3 et Tsg101 permettrait au VHE d'utiliser la voie exosomale, plus précisément les corps multivésiculaires qui, après fusion avec la membrane plasmique, permettront aux particules virales de quitter la cellule hôte infectée (**Fig. 11 et 12**)(66). Cette interaction serait indispensable à la biogénèse de la quasi-enveloppe du VHE (**Fig. 7**)(66).

Aussi, l'ORF3 est considérée comme une protéine structurale du VHE bien qu'elle ne soit retrouvée associée à la particule virale que lorsqu'elle est observée dans un sérum de patient ou un surnageant de culture cellulaire du virus (67).

### 1.2.2. Quasi-enveloppe virale

Dans le milieu extracellulaire, le VHE est retrouvé entouré d'une bicouche lipidique d'origine exosomale (**Fig. 7 et 13**). En microscopie électronique les particules virales quasi-enveloppées sont complètement recouvertes d'une bicouche lipidique ressemblant à celle des exosomes (68). Elle empêche leur immunocapture par des anticorps ciblant la protéine de capsid ORF2 ou la phosphoprotéine ORF3 (69). La présence de la protéine 2 du réseau trans-golgien à la surface des virions quasi-enveloppés indique que leur bicouche lipidique dérive des membranes intracellulaires et non de la membrane plasmique (70). Les virions infectieux quasi-enveloppés (eVHE) sont retrouvés dans le sérum des patients infectés et en système de culture cellulaire *in vitro* alors que dans les fèces ne sont présentes que des particules infectieuses nues (neVHE) (67,71). Des tests d'immunocaptures menés sur les eVHE, après destruction de leur quasi-enveloppe par des détergents, ne permettent pas la capture des particules virales nues avec des anticorps ciblant la protéine ORF3 (67). Ces observations semblent montrer que la protéine ORF3 est associée aux lipides de la quasi-enveloppe virale des eVHE (72).

Au même titre que le virus de l'hépatite A, le VHE est qualifié de « quasi-enveloppé » car son génome ne code pour aucune protéine d'enveloppe qui pourraient potentiellement interagir avec un récepteur membranaire (**Fig. 7**)(73,68). La quasi-enveloppe confère une protection contre la reconnaissance de la capsid virale par les anticorps neutralisants, empêchant ainsi une baisse de l'infectivité et facilitant la propagation virale (74). Les eVHE ont cependant une infectivité moindre comparée à celle des virions nus (neVHE), qui est probablement liée à un attachement moins efficace à la surface des cellules (75). La forme nue serait plus stable dans l'environnement et optimisée pour la transmission entre les différents hôtes.



**Figure 7 : Représentation schématique des particules non-enveloppées et quasi-enveloppées du VHE ainsi que d'un virus enveloppé.** En milieu extracellulaire, le VHE est retrouvé entouré d'une bicouche lipidique d'origine exosomale ne comportant pas de glycoprotéine d'enveloppe. (Figure créée avec Biorender.com)

La dégradation intracellulaire de la quasi-enveloppe du VHE reste à ce jour un processus mal connu. La protéine transmembranaire NPC1, permettant le transport du cholestérol, y jouerait un rôle majeur comme observé dans le cas du VHA (76). Située dans les membranes endosomales et lysosomales, elle permettrait d'extraire le cholestérol de la membrane des eVHE entrant dans la cellule, entraînant ainsi la déstabilisation puis la dégradation de la quasi-enveloppe (75). De même, l'acide lysosomale lipase serait importante dans cette dégradation. En effet, l'inhibition de cette enzyme réduit de manière dose-dépendante l'infectivité des eVHE (75). Une fois la quasi-enveloppe dégradée, la capside virale serait capable d'interagir avec les récepteurs présents sur le feuillet interne de la membrane endosomale permettant ainsi la décapsidation.

Dans le tractus intestinal, la dégradation de la quasi-enveloppe des eVHE excrétés serait due à l'action des protéases digestives et des acides biliaires (**Fig. 12**)(77). Seront alors présents dans les fèces des particules virales non-enveloppées hautement stable dans l'environnement, optimisant la transmission et la propagation de l'épidémie.

### 1.3. Cycle de multiplication viral

Bien que le VHE puisse aujourd'hui être produit *in vitro* au sein de différentes lignées cellulaires, très peu de données sont disponibles sur son cycle de multiplication (72,78). L'ingestion des virions non-enveloppés est nécessaire à la mise en place du premier cycle d'infection. Même s'il est principalement transmis par voie entérique, il n'existe aucune étude concrète sur l'entrée ou la réplication du VHE dans les cellules intestinales et sur son passage dans la circulation sanguine.

#### 1.3.1. Attachement

Il n'existe à ce jour aucune étude caractérisant le processus d'attachement des eVHE, ni de caractérisation du récepteur permettant l'entrée des particules virales (79). Cependant de nombreux co-facteurs cellulaires semblent impliqués dans ce processus.

##### 1.3.1.1. Virus de l'hépatite E nu

La GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78*) est la protéine chaperonne la plus abondante du réticulum endoplasmique. Elle fait partie de la famille des HSP70 et aide au repliement correct des protéines dans la lumière du RE (80,81). En cas d'infection, elle peut faciliter la repliement ou l'assemblage des protéines virale, comme observé avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC (82). Une colocalisation partielle des protéines GRP78 et ORF2 a été observée au niveau de la membrane plasmique de cellules d'hépatocarcinome humain (83). Une étude a montré *in vitro* leur interaction suggérant un potentiel rôle de la protéine chaperonne GRP78 dans le processus d'attachement cellulaire du virus de l'hépatite E (84).

Les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR), exprimés en abondance à la membrane basolatérale des hépatocytes, participent à l'élimination des glycoprotéines du plasma (85). Ce récepteur est utilisé par les virus hépatotropes afin de faciliter leur attachement et leur entrée cellulaire (86–91). *In vitro*, la capacité de liaison du VHE aux cellules est corrélée positivement au niveau d'expression des ASGPR à leur surface (92). Une interaction directe entre la protéine de capsid du VHE et aux ASGPR a été mise en évidence. Le blocage de cette interaction entraîne une diminution significative de l'entrée des virions et mais pas de leur libération (92). Les ASGPR serait impliqués dans les étapes précoces du cycle du VHE (92).

La sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase (ATP5B) catalyse la synthèse de l'ATP dans le processus de respiration mitochondriale (93). Une petite fraction de cette protéine est exprimée



à la membrane plasmique, cette expression ectopique est entre autre impliquée dans certaines infections virales (94–99). Des études ont permis de mettre en évidence une liaison entre la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase et la protéine de capsid du VHE au niveau de la membrane plasmique (100). Le masquage à la surface de l'ATP5B par des anticorps ou l'inhibition de son expression via des petits ARN interférents réduisent la liaison du VHE à la surface des cellules confirmant ainsi une potentielle implication de l'ATP5B dans l'adsorption virale (100).

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires participant à de nombreuses fonctions biologiques et sont impliquées dans l'adhésion de la matrice extra-cellulaire à la cellule (101). Cette famille est composée de 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  pouvant former ensemble 24 hétérodimères différents, autorisant une reconnaissance spécifique de différents ligands (101). La sous-unité  $\alpha 3$  (ITGA3) est largement exprimée à la surface des cellules humaines dont celles connues *in vivo* pour être des sites de répllication du VHE. Des études en lignée cellulaire hépatique ont permis de l'identifier comme un facteur d'entrée du neVHE *via* son interaction direct avec la protéine ORF2 (102). De par son faible niveau d'expression à la surface des hépatocytes, l'ITGA3 ne jouerait pas un rôle majeur dans l'infection mais serait impliquée dans les manifestations extra-hépatiques notamment au niveau intestinal (103–105).

Les HSPGs (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules (106) et impliqués dans l'adsorption de nombreux virus tels que les virus de l'herpès, de la dengue ou encore de l'hépatite C (107–109). Ces protéoglycanes permettraient l'attachement *in vitro* des neVHE. Des études montrent une réduction dose-dépendante de l'infection par les particules virales nues lorsque l'expression des HSPGs est diminuée (110). Cependant, aucune réduction significative de l'infection par les eVHE n'a été mise en évidence, suggérant que les HSPGs ne seraient pas essentiels à leur adsorption sur les cellules cibles (75).

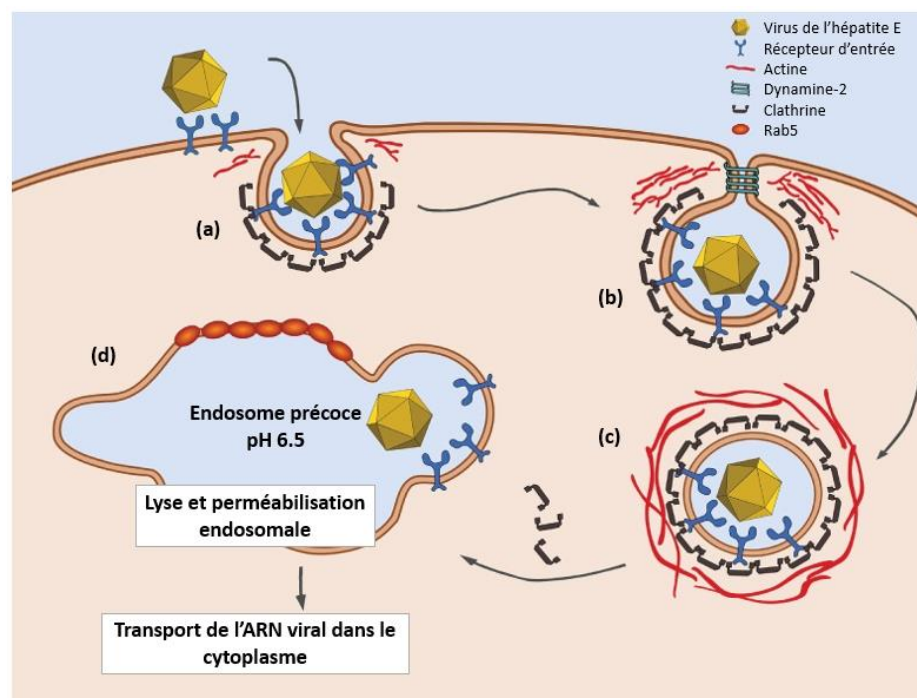
#### 1.3.1.2. *Virus de l'hépatite E quasi-enveloppé*

Lors de leur adsorption les virions quasi-enveloppés, utiliseraient un récepteur cellulaire et/ou des co-facteurs différents de ceux utilisés par les neVHE. Les eVHE présentent sur leur quasi-enveloppe des phosphatidylsérines ayant une haute affinité de liaison avec le récepteur cellulaire TIM-1. Ce récepteur, impliqué dans l'adsorption de nombreux virus enveloppés ou quasi-enveloppés (111,112), pourrait également servir de récepteur d'entrée aux eVHE.

### 1.3.2. Pénétration

Le mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite E reste encore mal compris. Le VHE est internalisé suite à une endocytose dépendante de la clathrine (**Fig. 8**)(113). Des études montrent une inhibition de l'entrée des deux formes du VHE, quasi-enveloppées ou non, après déplétion des chaînes lourdes de clathrine ou de la dynamine-2 (75,113,114). Cette baisse d'infectivité est plus prononcée pour les particules quasi-enveloppées (75). Lors de l'endocytose l'actine aide à l'invagination des vésicules puis, après détachement de la surface, permet leur migration intracellulaire jusqu'au site de réplication viral (**Fig. 8**)(113). Des étapes additionnelles seraient requises pour permettre l'entrée des particules quasi-enveloppées, vraisemblablement au sein des endolysosomes.

Le cholestérol présent à la membrane plasmique, et en particulier au niveau des radeaux lipidiques, est requis pour l'entrée de nombreux virus (115–117). La diminution de son expression induit une réduction significative de l'entrée de particules pseudo-virales de VHE sans pour autant en diminuer l'adsorption. L'implication du cholestérol dans la pénétration du VHE n'est cependant pas systématiquement observée en fonction de la lignée cellulaire utilisée, suggérant une variation du processus d'entrée du VHE en fonction du type cellulaire (113).



**Figure 8 : Schéma de l'endocytose clathrine dépendante du virus de l'hépatite E.** (a) La liaison du VHE à son récepteur d'entrée induit l'invagination des vésicules recouvertes de clathrine internalisant le virus. L'actine aide à ce processus d'invagination. (b) La dynamine s'enroule en hélice autour du cou de la vésicule causant sa scission de la membrane plasmique. (c) La particule virale internalisée est acheminée au sein du cytoplasme, l'actine étant impliquée dans sa migration jusqu'au site de réplication

virale où la particule fusionnera avec un endosome précoce. **(d)** Après lyse et perméabilisation de la membrane endosomale, le génome viral sera libéré dans le cytoplasme où il sera répliqué. L'entrée des virions quasi-enveloppés requiert les petites GTPases Rab5 impliqués dans le trafic endosomal (75). (Holla *et al.*, *Traffic* 2015)

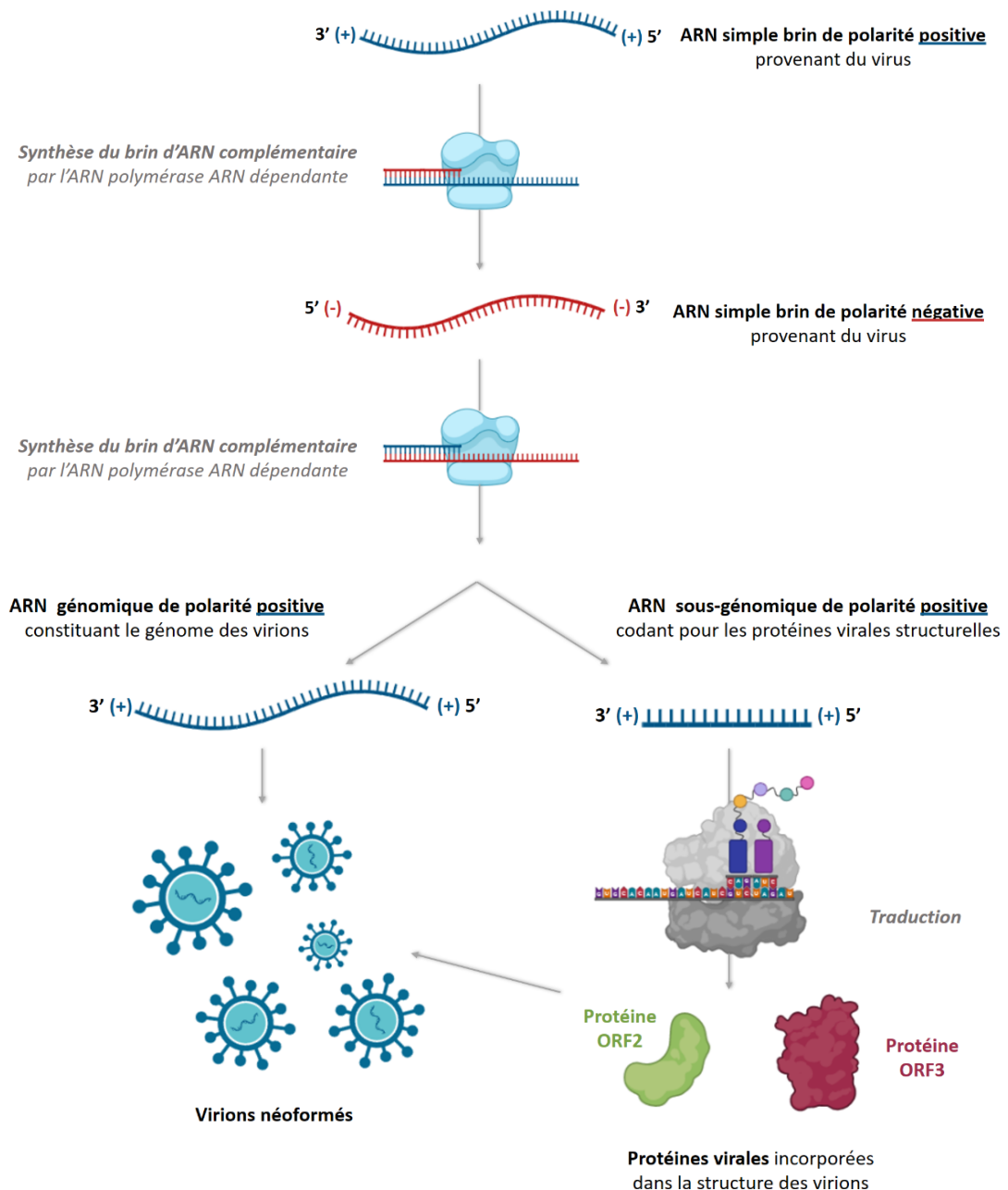
### 1.3.3. Décapsidation

Le processus de décapsidation du virus de l'hépatite E reste encore mal compris. La présence de la quasi-enveloppe pourrait présenter un obstacle au désassemblage de la capside virale. Une fusion de cette bicouche lipidique à celle de la membrane plasmique est impossible car la capside virale serait libérée intact au sein du cytoplasme sans libérer son génome, entraînant une impasse à la réplication. Sachant que le VHE est internalisé par endocytose clathrine dépendante, le génome viral des eVHE devrait traverser 2 bicouches lipidiques afin d'être délivré dans le cytoplasme. Une dégradation préalable de la quasi-enveloppe par les enzymes présentent au sein des endolysosomes est vraisemblablement nécessaire (75).

Une fois la quasi-enveloppe dégradée le processus de décapsidation des eVHE serait identique à celui particules virales nues. La capside des virions internalisés sera capable d'interagir avec un récepteur présent sur le feuillet interne de la membrane endosomale permettant ainsi son désassemblage. Le domaine P de la protéine ORF2 pourrait être impliqué dans l'interaction de la capside avec ce récepteur, qui reste non défini à ce jour (35).

### 1.3.4. Réplication

Le génome du virus de l'hépatite E se compose d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Sa réplication intra-cytoplasmique débute par la traduction de la polyprotéine non structurale ORF1 (**Fig. 9 et 11**). Du fait de son activité ARN polymérase ARN dépendante elle va permettre la transcription d'un ARN antisens complet de polarité négative directement à partir du génome viral (**Fig. 9 et 11**). Ce brin nouvellement synthétisé servira de matrice à la transcription de brins d'ARN de polarité positive constituant le génome des virions néoformés. Il permettra également la synthèse d'un brin d'ARN sous-génomique positif de 2,2 kb à partir duquel seront traduites la protéine de capside ORF2 et la phosphoprotéine multifonctionnelle ORF3 (**Fig. 9 et 11**)(30).

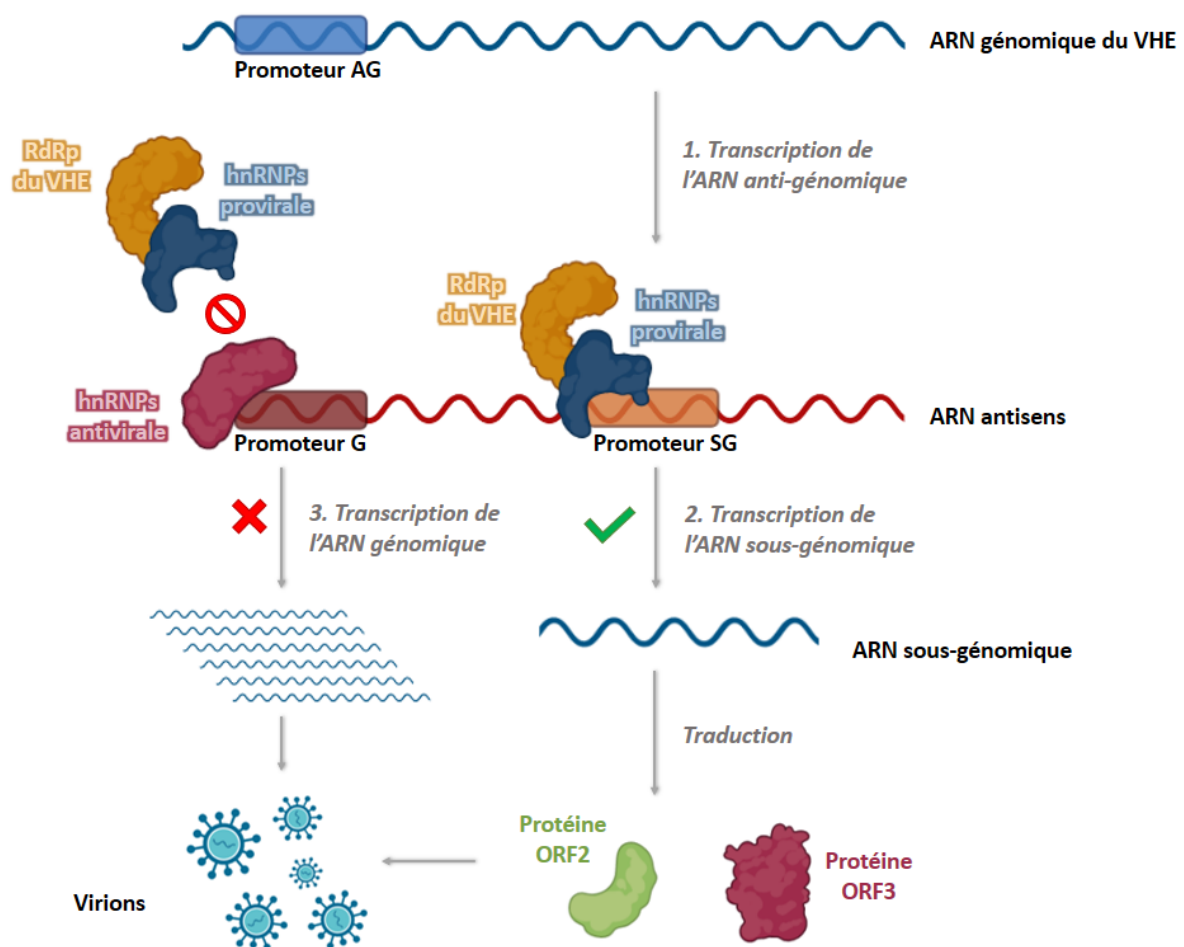


**Figure 9 : Étapes de la réplication du VHE.** Le génome du virus de l'hépatite E est composé d'un ARN monocaténaire de polarité positive. La RdRp virale va permettre la synthèse d'un brin d'ARN antisens à partir du génome viral. Il servira de matrice à la synthèse de brins d'ARN génomiques, incorporés aux virions, et sous-génomiques codant les protéines ORF2 et ORF3. Ces protéines virales participent à la structure des virions. Le VHE exploite la présence des ribosomes cellulaires pour assurer la traduction de l'ARN sous-génomique. (Figure créée avec Biorender.com)

L'ARN antisens synthétisé par la protéine ORF1 comporte 2 promoteurs (**Fig. 10**). Le promoteur G à l'extrémité 3' contrôle la synthèse du brin d'ARN génomique. Le promoteur SG contrôle la synthèse de l'ARN sous-génomique et est situé avant les séquences ORF3/ORF2 (118,119). Ces promoteurs seront reconnus de façon différentielle par la RdRp afin de permettre une synthèse temporellement régulée de ces 2 types de brin d'ARN (**Fig.10**). Il est nécessaire

pour le virus de générer préférentiellement des copies d'ARN sous-génomique à partir desquelles seront produites les protéines virales. La coordination des hnRNPs à fonction virales et antivirales permettrait de réguler temporellement cette production (119).

Les hnRNPs sont des nucléoprotéines contribuant entre autre au métabolisme des acides nucléiques et capables de moduler la répllication de différents virus à ARN (120). D'après les résultats de Pingale *et al.*, certaines hnRNPs interagissent *in vitro* avec les promoteurs et la RdRp du VHE permettant une répllication virale efficace. D'autres hnRNPs empêcheraient la fixation de la RdRp au promoteur G du VHE, inhibant de ce fait sa répllication (119)(**Fig.12**).



**Figure 10 : Régulation temporelle de la transcription des ARN génomiques et sous-génomiques du VHE.** La RdRp virale se fixe sur le promoteur SG de l'ARN viral afin de transcrire un ARN génomique ou sous-génomique de polarité négatif. La fixation de hnRNPs à activité provirale permettrait une meilleure fixation de la RdRp à ces promoteurs d'où une transcription virale plus efficace. Certaines hnRNPs empêchent la fixation de la RdRp sur le promoteur G, diminuant le taux de transcription de l'ARN génomique. La coordination des hnRNPs à fonctions virales et antivirales permettrait de réguler temporellement la production des ARN génomique et sous-génomique. (119) (Illustration d'après Pingale *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 2020, créée avec Biorender.com)

### 1.3.5. Assemblage

Les étapes d'assemblage des particules virales sont peu caractérisées. La constitution de la bicouche lipidique des eVHE, enrichie en protéines 2 du réseau trans-golgien, suggère une participation de l'appareil de Golgi dans l'assemblage des virions quasi-enveloppés (70). La forme infectieuse de la protéine de capsid (ORF2i) interagirait spécifiquement avec la région 5' du génome du VHE permettant son empaquetage et l'assemblage de la particule virale (**Fig.12**) (121). Il est probable que la localisation du signal d'encapsidation à l'extrémité 5' du génome soit une stratégie de réplication virale afin d'assurer l'empaquetage du génome complet uniquement et non de l'ARN sous-génomique codant pour les protéines ORF3 et ORF2 (**Fig.1**) (121).

La phosphoprotéine ORF3 interagit avec la protéine de capsid ORF2. Cette association est dépendante de la phosphorylation du résidu sérine en position 70, contenu dans le site d'interaction (**Fig. 6 et 12**) (46). De plus, la protéine ORF3 interagit préférentiellement avec la forme non-glycosylée de l'ORF2, associée aux particules infectieuses (ORF2i). De ce fait, il est possible que cette phosphoprotéine participe au processus d'assemblage de la capsid virale ou qu'elle permette la reconnaissance des particules virales qui seront libérées en extracellulaire (46).

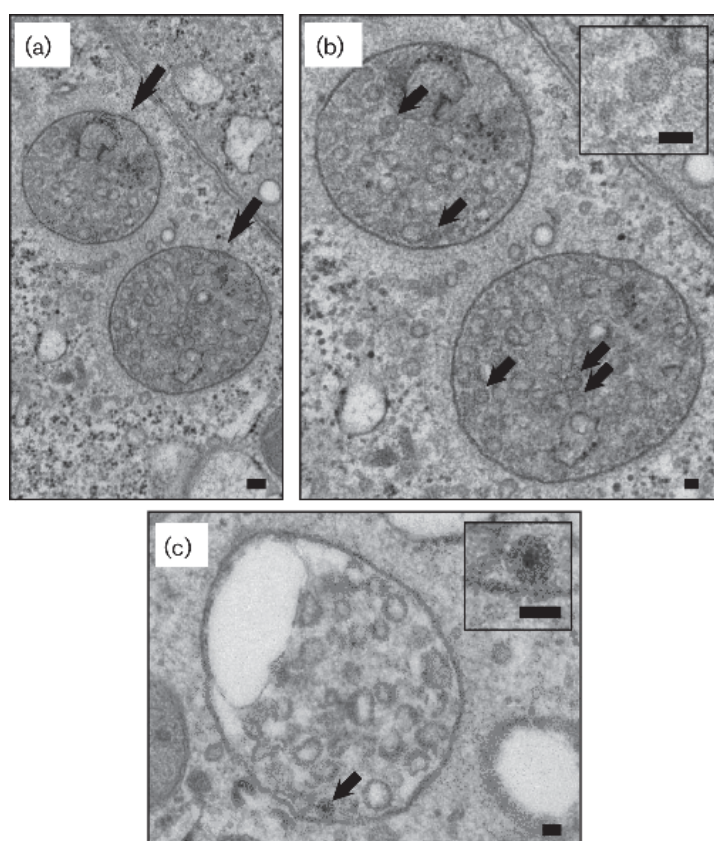
### 1.3.6. Libération

#### 1.3.6.1. Libération des particules virales

La protéine ORF3 joue un rôle majeur dans la libération des particules virales, processus qui reste à ce jour peu caractérisé. Son extrémité N-terminale interagit avec le système microtubulaire, augmentant leur stabilité et permettant le transport intracellulaire des virions néo-formés (47). Les endosomes tardifs et plus particulièrement les corps multivésiculaires, dont la biogénèse est dépendante de la machinerie ESCRT, sont impliqués dans la libération du VHE (122). Des études d'immunofluorescence montrent que les protéines virales ORF2 et ORF3 et la protéine CD63, marqueur des MVB, colocalisent partiellement dans le cytoplasme (123). L'interaction du motif PSAP de la protéine ORF3 et de la Tsg101 permettrait aux virions d'exploiter la machinerie ESCRT et de bourgeonner au sein des corps multivésiculaires comme observé en microscopie électronique (**Fig. 6 et 12**) (123). Les particules de VHE seraient libérées après fusion des corps multivésiculaires à la membrane plasmique (**Fig. 11 et 12**) (123). Cette libération dépendante des corps multivésiculaires est connue chez les virus enveloppés tels que le VHB, le VHC ou encore le HVH-6 (124–126). De plus, du fait de sa fonction canal

ionique, la protéine ORF3 s'insère dans la membrane plasmique des cellules infectées, crée un environnement favorable à la libération des virions et stimule leur bourgeonnement (44).

Les particules quasi-enveloppées libérées au pôle basolatéral des hépatocytes rejoindraient la circulation sanguine afin de se propager au sein de l'organisme infecté. La majorité des particules virales, plus infectieuses, seraient libérées au pôle apical des hépatocytes dans les voies biliaires où leur quasi-enveloppe serait dégradée sous l'action détergente des acides biliaires et des protéases intestinales. Elles seraient ensuite excrétées sous forme non-enveloppées dans les selles (**Fig. 12**)(127).

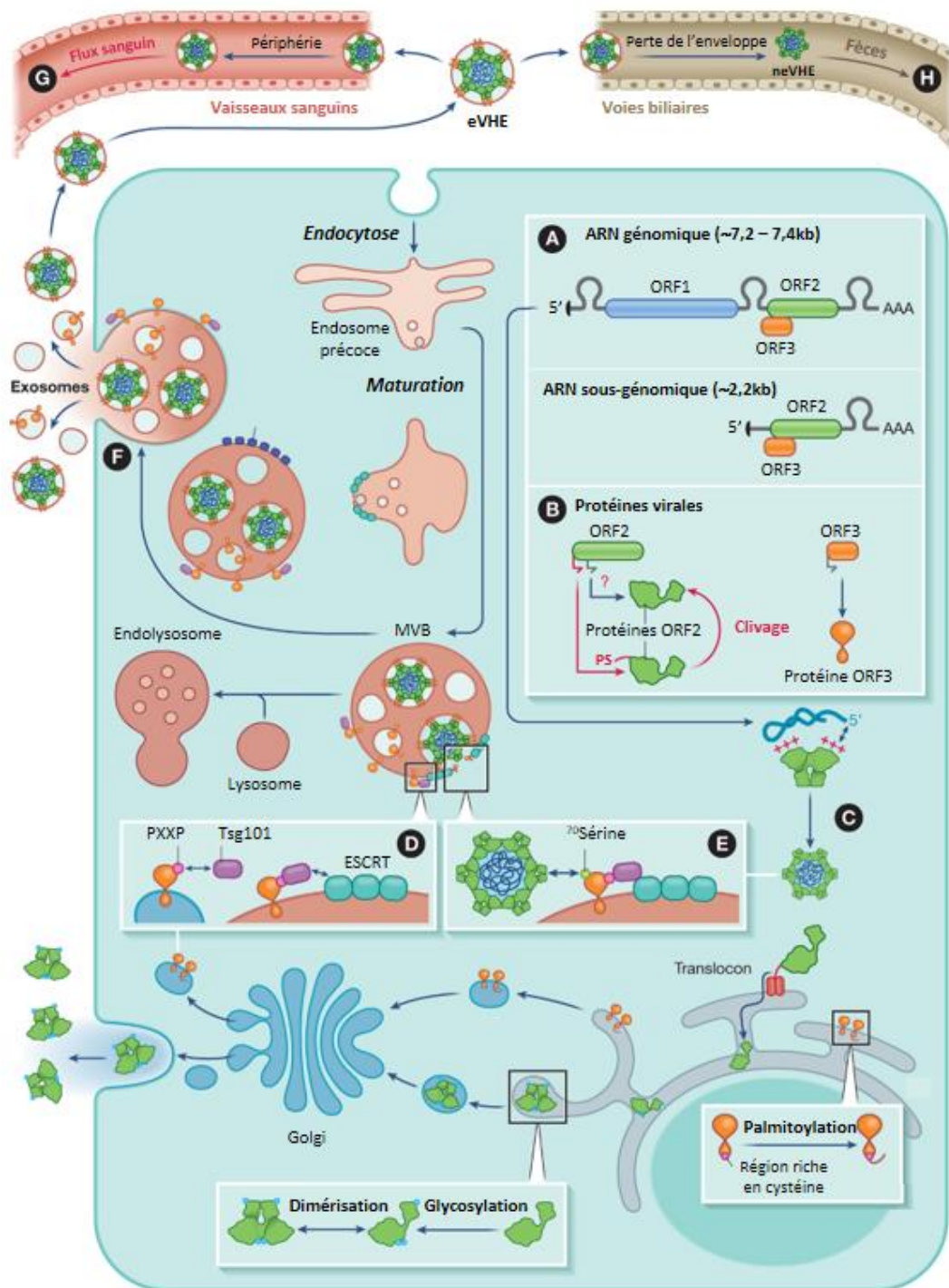


**Figure 11 : Analyse structurale en microscopie électronique de cellules PLC/PRF/5 infectées par le virus de l'hépatite E.** (a) Dans le cytoplasme de cellules infectées sont observés des corps multivésiculaires, indiqués par une flèche (barre d'échelle 100 nm). (b,c) Au sein de ces MVB sont présentes une multitude de petites vésicules ainsi que des particules virales de VHE quasi-enveloppées indiquées par une flèche (barre d'échelle 50 nm). (Nagashima *et al.*, *Journal of General Virology* 2014)

#### 1.3.6.2. Sécrétion de l'ORF2s

L'isoforme glycosylé ORF2s de la protéine de capside est le plus exprimé et sera sécrété à la membrane sous forme de dimère par les voies de sécrétion classiques (**Fig. 12**). Cet isoforme constitue l'antigène majoritaire dans les sérums de patients infectés par le VHE (13). Il ne participe pas à la constitution de la capside et n'est pas associé aux particules virales mais serait impliqué dans l'échappement du virus face aux défenses immunitaires (13). Il est sécrété massivement dans le milieu extracellulaire et constituerait un leurre immunologique afin d'épuiser le système immunitaire et de retarder l'établissement d'une protection efficace contre l'infection (13,128).





**Figure 12 : Cycle de multiplication du virus de l'hépatite E.** (A) Le génome du VHE est constitué d'un ARN monocaténaire comportant 3 cadres ouverts codant respectivement les protéines ORF1, ORF2 et ORF3. Ces deux dernières sont codées par un ARN sous-génomique. (B) L'ORF2 code pour la protéine de capsid virale. (C) La forme ORF2s, comportant un peptide signal, est adressée aux voies de sécrétion. Elle sera ainsi glycosylée dans le RE puis dimérisera avant d'être transportée dans l'appareil de Golgi puis sécrétée. A l'inverse, la forme ORF2i ne comporte pas de peptide signal et s'associera à l'extrémité 5' de l'ARN viral afin de constituer la capsid des virions. (D) La protéine ORF3 est palmitoylée à son extrémité N-terminale. Cette palmitoylation lui permet de s'associer aux membranes subcellulaires, en particulier celles des MVB, où elle interagit *via* son motif PxxP avec la



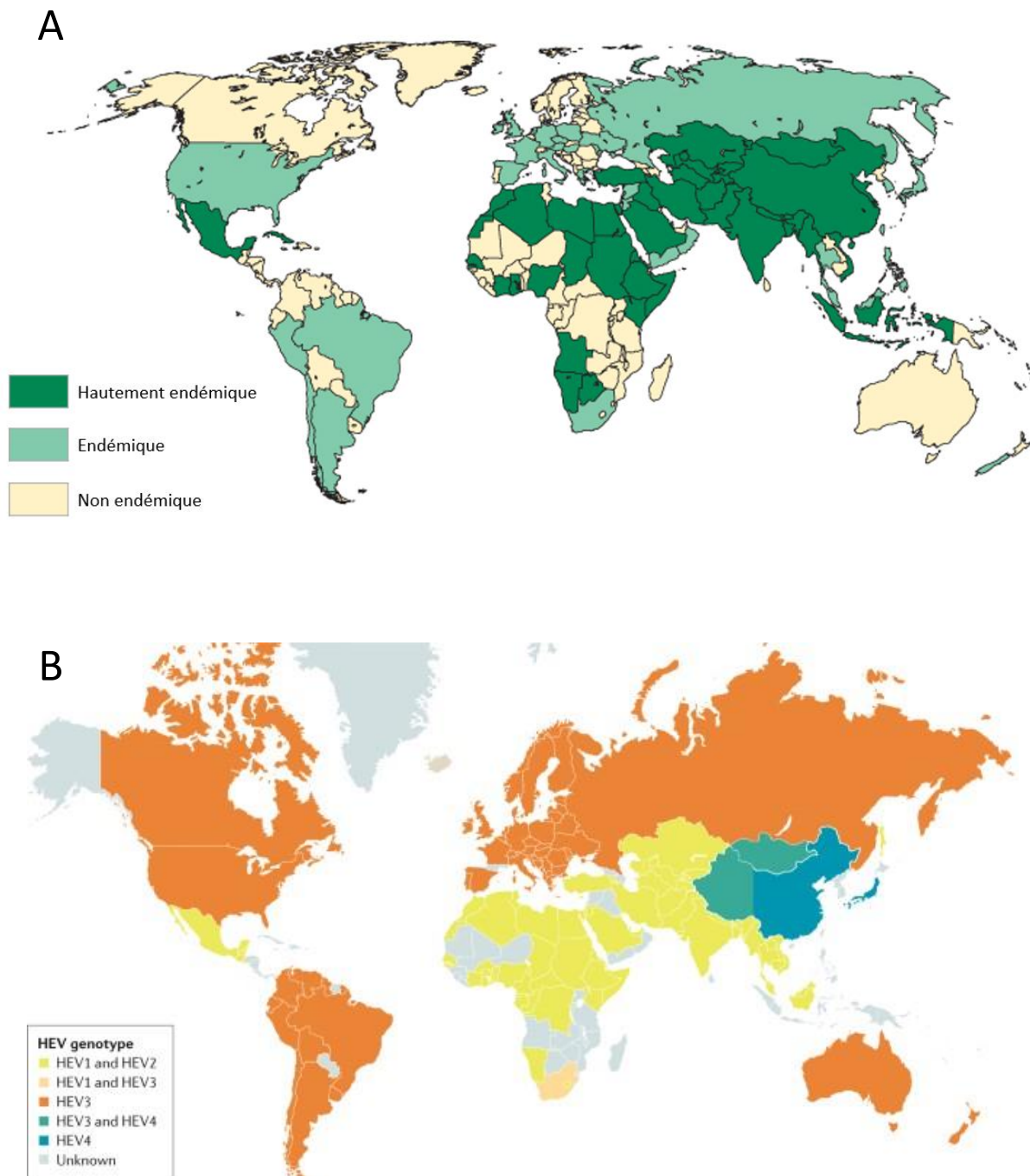
protéine cellulaire Tsg101 du complexe ESCRT. (E) La capside virale se lie à la protéine ORF3 phosphorylée déclenchant la formation au sein des MVB de vésicules intraluminales contenant les virions. (F) Les virions quasi-enveloppés seront libérés après fusion des MVB à la membrane plasmique. (G) Cette quasi-enveloppe est conservée dans le sérum des patients infectés (H) mais pas dans le tractus intestinal où elle serait dégradée entraînant l'excrétion de virions nus. (Glitscher et Hildt., *Cellular Microbiology* 2021)

## **2. Partie 2 : Epidémiologie, pathogénèse et thérapeutiques**

### **2.1. Épidémiologie**

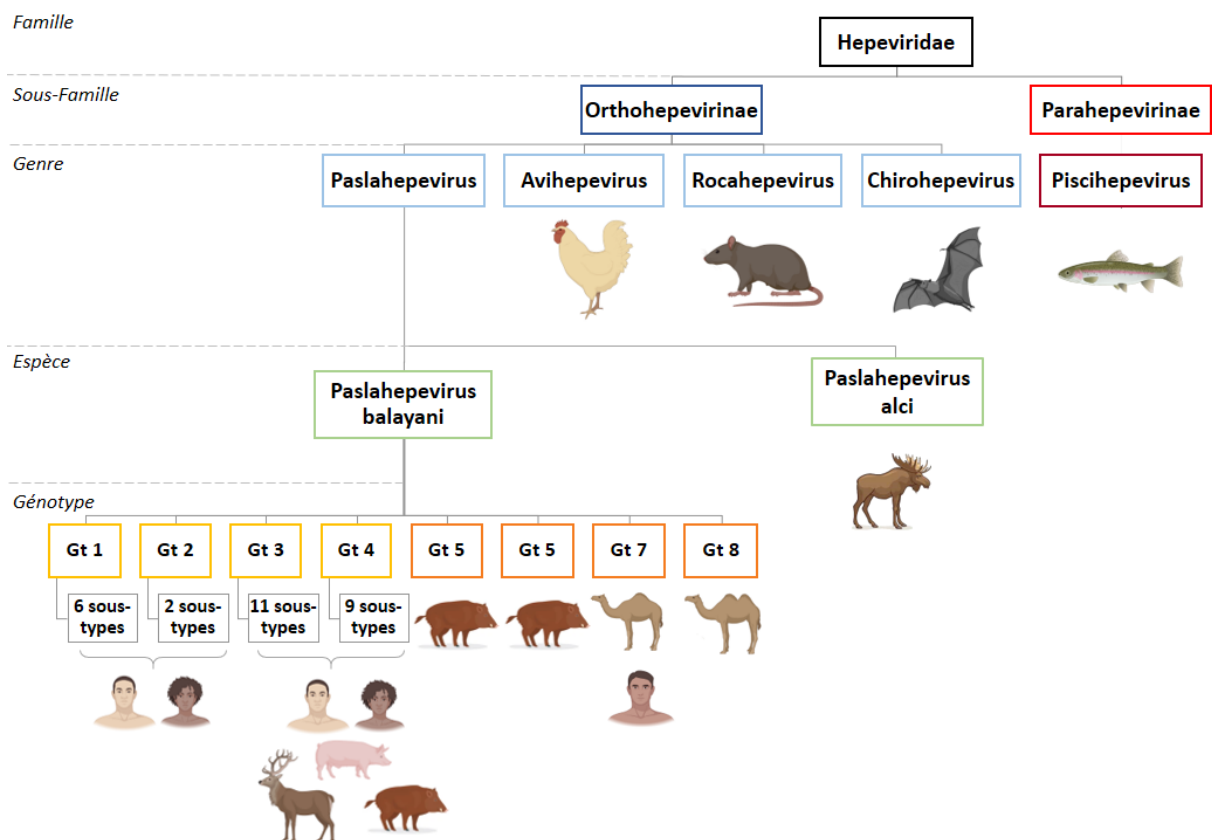
L'incidence mondiale de l'infection par le VHE est de 20,1 millions de nouveaux cas par an dont 3,3 millions symptomatiques (**Fig. 13**) (129,130). En 2015, on comptait 44 000 décès avec un taux de mortalité important chez les femmes enceintes (131). Le taux de létalité varie entre 0,5% à 4% dans la population générale (132). Plus de 2000 cas sont rapportés en France chaque année dont plus de 70% de cas autochtones, plus particulièrement dans sud du pays dû à la consommation de produits à base de foie de porc (**Fig. 15**)(133,134). Le virus affecte majoritairement les sujets jeunes, entre 15 et 30 ans, dans les pays en développement, à l'inverse des pays industrialisés où il infecte les sujets âgés de plus de 55 ans (130,14). L'infection par le VHE représente un problème de santé publique majeur dans les pays à faible revenu où elle constitue en fonction du pays la première ou la seconde cause d'hépatite aiguë, derrière l'hépatite B (135). L'Asie, le Moyen Orient, l'Afrique et l'Amérique centrale connaissent des urgences sanitaires et humanitaires qui entraînent la manifestation de flambées épidémiques et de cas sporadiques. L'accès limité aux services d'assainissement des eaux et aux services de santé, particulièrement dans les camps de réfugiés et les zones de conflits, favorisent la transmission oro-fécale du virus. Dans les pays industrialisés où les conditions d'hygiène sont de meilleure qualité, la circulation du virus est moins fréquente. Les infections sporadiques restent occasionnelles et surviennent le plus souvent chez les voyageurs de retour de zone endémique (136,137).

Les sujets immunodéprimés sont plus vulnérables et développent des infections pouvant conduire à une chronicité potentiellement mortelle (138). Plusieurs maladies et manifestations extra-hépatiques ont été décrites chez les patients infectés par le VHE (139). Des cas des transmissions parentérales *via* des greffes d'organes contaminés ou de transfusions sanguines ont également été décrits (140,141).



**Figure 13 : Localisation mondiale des zones hautement endémiques et endémiques à VHE (A) et des différents génotypes du VHE responsables d'infections chez l'Homme (B).** (A) Le virus de l'hépatite E constitue un problème de santé publique majeur dans les pays en développement où les conditions d'hygiène sont insuffisantes, principalement en Asie, Afrique et Moyen Orient. L'Europe et l'Amérique comprennent également des zones endémiques. (B) Les génotypes 1 et 2, se transmettant par voie oro-fécale, sont retrouvés majoritairement dans les pays en développement. Les génotypes 3 et 4 à transmission zoonotique sont prédominants dans les pays industrialisés. (Figure 13A: Rodriguez et Carey, *Virtual Medical School* 2013. Figure 13B: Kamar *et al.*, *Nature Reviews Disease Primers*, 2017)

La famille des *Hepeviridae* est subdivisée en 2 sous-familles selon la spécificité d'hôte : les *Parahepevirinae* comportant les souches virales infectant les poissons, et *Orthohepevirinae* comportant les souches aviaires et celles infectant les mammifères (**Fig. 14**). Le virus de l'hépatite E appartient à l'espèce *Paslahepevirus balayani* et comportent 8 génotypes dont 4 capables d'infecter l'humain (**Fig. 14**). Les protéines virales détermineraient le tropisme d'espèce des différents génotypes (142–145). La confirmation de cette hypothèse nécessite des recherches plus poussées notamment l'identification du récepteur cellulaire du VHE.



**Figure 14 : Taxonomie du virus de l'hépatite E.** La famille des *Hepeviridae* comprend les sous-familles *Orthohepevirinae* et *Parahepevirinae* qui comportent une organisation génomique identique mais une phylogénie distincte. Les *Orthohepevirinae* sont divisés en 4 genres différents, le VHE appartenant à celui des *Paslahepevirus*. Les membres de l'espèce *Paslahepevirus balayani* sont assignés à 8 génotypes différents dont 4 susceptibles d'infecter l'espèce humaine. L'espèce *Parahepevirinae alci* comporte un variant découvert chez l'élan en Suède (146). La sous-famille *Parahepevirinae* comporte un seul genre comprenant un variant isolé chez la truite aux États-Unis (147). Les VHE du genre *Avihepevirus*, ont été retrouvés chez différentes espèces aviaires (148,149). Les *Rocahepevirus* ont été découvert en Allemagne chez le rat brun (150,151). Plusieurs chauve-souris à travers le monde sont porteuses du VHE de genre *Chirohepevirus* (152). Gt = Génotype

### 2.1.1. Génotypes 1 et 2

Les génotypes 1 et 2 du virus de l'hépatite E infectent uniquement l'espèce humaine. Il n'existe pas d'animaux réservoir connus pour ces 2 génotypes (**Fig. 14**). Leur épidémiologie et leurs manifestations cliniques sont assez similaires (153). Ils sont transmis par voie oro-fécale *via* la contamination des eaux de boisson et sont causes d'endémies majoritairement dans les pays en développement en raison de la faiblesse des infrastructures sanitaires (**Fig. 13**)(153). La consommation d'eaux contaminées peut entraîner à moindre échelle des cas sporadiques, principalement dû aux infections par les souches de VHE de génotype 1 et moins fréquemment par celles de génotype 2 (130). En Asie du sud les épidémies d'hépatites E ont souvent lieu pendant la saison des moussons où les pluies diluviennes entraînent des crues responsables de la contamination des réservoirs et conduits d'eau potable (154). En Afrique, ces épidémies sont plutôt liées aux crises humanitaires et au manque d'accès à l'eau potable, aux services essentiels d'hygiène et de santé notamment dans les camps de réfugiés (155).

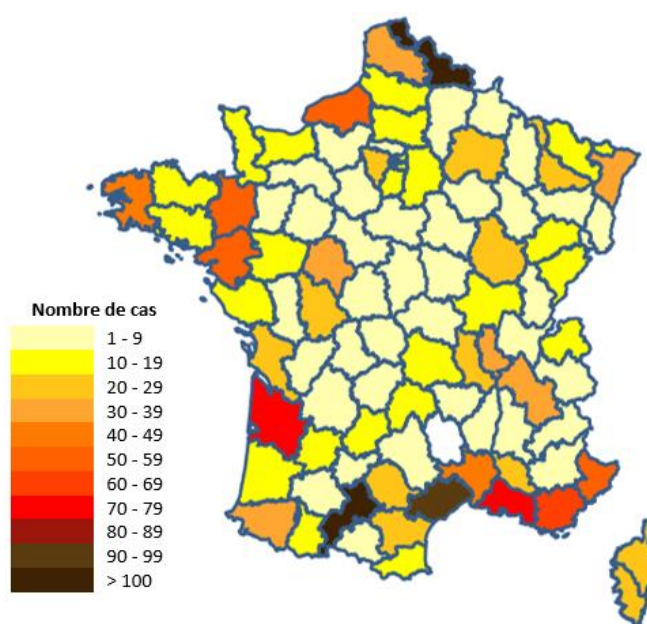
Les génotypes 1 et 2 du VHE causent des infections principalement chez les adolescents et les jeunes adultes (entre 20 et 40 ans) de sexe masculin (156). Pour des raisons inconnues, les enfants de moins de 10 ans présentent des taux d'infection plus faibles. Leur consommation moins importante d'eaux de boisson contaminées les exposerait sûrement à des doses virales non infectieuses. Aussi, des études montrent qu'ils perdraient leur taux d'anticorps détectable rapidement, compliquant l'interprétation des études épidémiologiques transversales (153). Pour des raisons peu connues, le taux de mortalité après infection par le génotype 1 est élevé chez les femmes enceintes et les nourrissons ainsi que chez les patients infectés ayant une maladie hépatique chronique sous-jacente (131,157).

### 2.1.2. Génotypes 3 et 4

Les génotypes 3 et 4 du VHE sont prévalents dans les pays industrialisés à revenus élevés, principalement en Europe, en Amérique du Nord et en Asie Orientale (**Fig. 13**)(132). Ils sont capables d'infecter plusieurs espèces animales dont le sanglier, les cervidés, le lapin et les bovins mais le réservoir principal reste le porc domestiqué (**Fig. 14**)(133). Ces génotypes sont cause d'infections zoonotiques sporadiques chez l'Homme via la consommation de fruits de mer, de viande et d'abats contaminés, crues ou insuffisamment cuits (158). Plusieurs études suggèrent également une transmission directe de l'animal à l'Homme après mise en évidence d'une séroprévalence plus élevée chez les professionnels en contact avec les espèces réservoirs, comme les vétérinaires d'élevages porcins, les bouchers ou les employés d'abattoirs (159–161).

La plupart des infections causées par les génotypes 3 et 4 sont asymptomatiques. Moins de 2% des patients infectés présenteront des symptômes, généralement les hommes âgés ou les patients ayant une maladie hépatique sous-jacente. Des formes chroniques, ont été décrites exclusivement chez les patients immunodéprimés (dont les personnes transplantées, présentant une hémopathie, co-infectées par le VIH ou sous chimiothérapie) le plus souvent porteurs du génotype 3 (162). La progression en forme chronique semble dépendre de la réponse immunitaire de l'hôte (163,164). Chez les immunodéprimés, l'hépatite E chronique peut évoluer en une cirrhose hépatique pouvant entraîner le décès (162).

En France, le nombre de cas diagnostiqués par le Centre National de Référence des virus à transmission entérique (VHA/VHE) a augmenté, passant de 13 à 2 158 entre 2002 et 2020 (165). En plus de la progression du VHE, cette incidence croissante du nombre de cas est aussi due à une meilleure connaissance de l'infection et à l'augmentation de la prescription des tests diagnostiques sérologiques et moléculaires plus performants. Entre 2007 et 2016, le génotype 3 représentait plus de 90% des souches diagnostiquées en France, la majorité étant des cas autochtones. Les quelques cas recensés d'infections par les génotypes 1 et 2 étaient importés. En 2020, sur 2 158 cas recensés, 5 étaient importés (165). En moyenne, les hommes âgés de 55 ans sont plus à risques (165). On observe une augmentation régulière des personnes hospitalisées pour hépatite E en France métropolitaine entre 2004 et 2006 avec un taux d'incidence annuelle plus élevé dans les régions du Sud (**Fig. 15**). Des épisodes de cas groupés d'infection au VHE y sont régulièrement recensés le plus souvent suite à la consommation de viande de foie de porc crue.



**Figure 15 : Répartition géographique des cas d'infection par le VHE en France en 2020.** En 2020, sur 90 000 personnes testées par le Centre National Référence VHA/VHE, 2 158 étaient infectées par virus de l'hépatite E. La moyenne d'âge des cas positifs était de  $55 \pm 16$  ans avec une prédominance masculine, le risque d'infection chez les hommes étant 1,3 plus élevé que chez les femmes. Les cas recensés étaient plus élevés dans la moitié sud de la France métropolitaine, en particulier dans les départements de l'Haute Garonne et de l'Hérault. (D'après le rapport annuel d'activité 2021 du CNR Virus des hépatites à transmission entérique).

### 2.1.1. Autres génotypes

D'autres souches de VHE provenant des *Paslahepevirus* ont été identifiées, accroissant la diversité des *Hepeviridae*. Celles de génotype 5, 6 et 8 ont été isolées seulement chez l'animal (**Fig. 14**). Les VHE-5 et VHE-6 ont été mise en évidence uniquement au Japon, chez des sangliers (166–168) et le VHE-7 chez le dromadaire en Arabie Saoudite (168). Un cas isolé d'infection chronique par le VHE-7 a été décrit chez un patient transplanté consommant régulièrement de la viande et du lait de chameau, suggérant une possible transmission du génotype 7 du dromadaire à l'Homme (169). Le VHE-8 a lui été récemment isolé en Chine et en Mongolie chez le chameau de Bactriane (**Fig.14**) (170,171). Des réservoirs secondaires ou nouveaux pourraient potentiellement exister ou apparaître par transmission zoonotique de ces génotypes. En effet, il a été démontré après inoculation expérimentale du VHE-5 au singe que ce génotype pouvait infecter une autre espèce que le sanglier (172). Le VHE-5 peut également se répliquer dans des lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinome ou d'adénocarcinome humain (172). Ces résultats soulèvent la question d'une possible transmission zoonotique de ce génotype aux primates et potentiellement à d'autres espèces dont l'Homme.

## 2.2. Pathogénèse

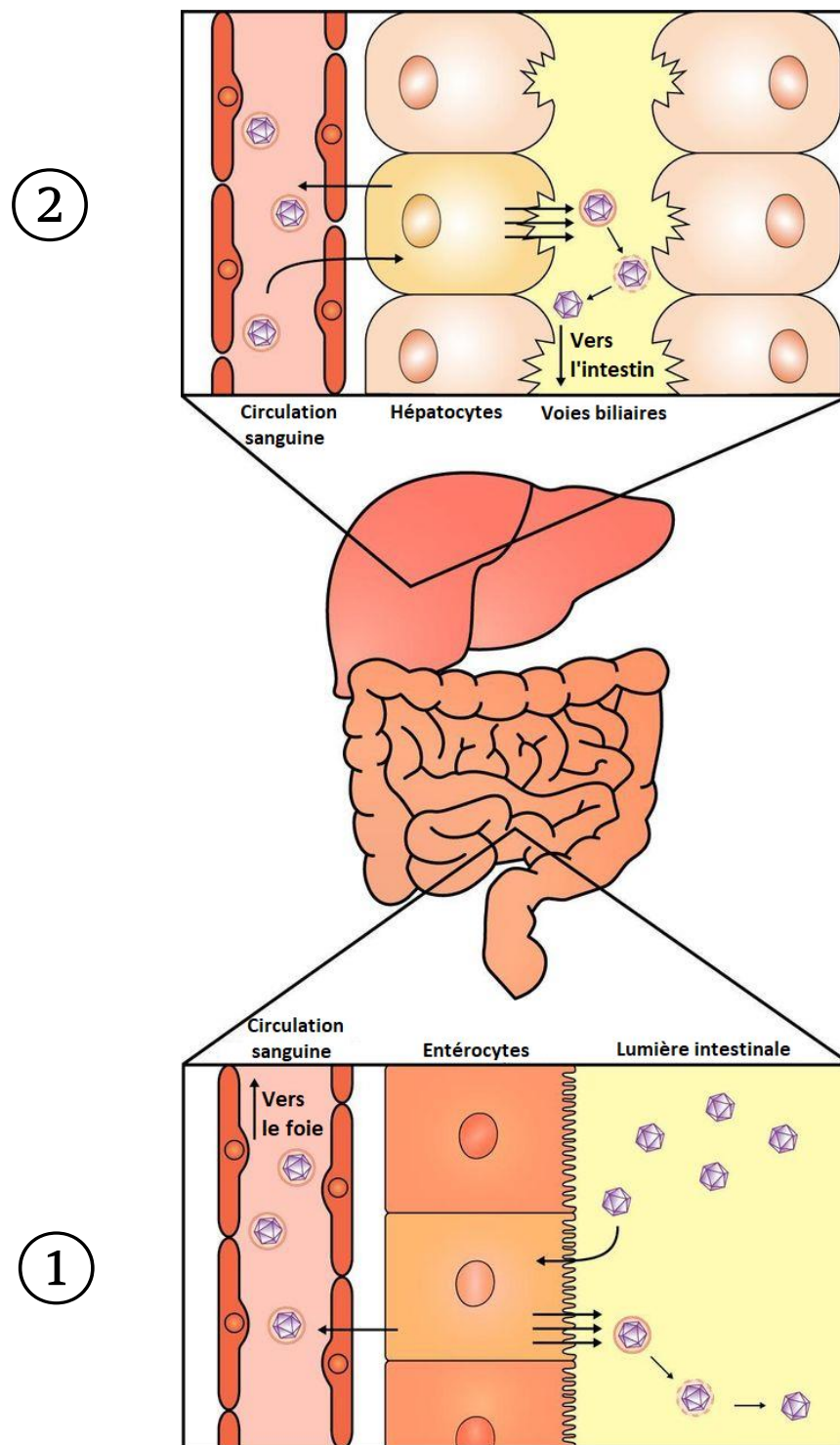
### 2.2.1. Physiopathologie

La pathogénèse du virus de l'hépatite E reste peu connue. Transmis par voie oro-fécale, la manière dont le virus franchis la barrière épithéliale intestinale pour atteindre le foie doit encore être caractérisée. Du génome viral a été détecté dans le foie, signe de sa réplication hépatique, mais également dans l'intestin grêle, les ganglions lymphatiques et le colon de porc infectés, indiquant la présence de sites de réplication extra-hépatiques (173). Chez l'humain, le VHE peut se répliquer dans les cellules intestinales et atteindre le foie sous forme quasi-enveloppée (174). La protéine de capsid ORF2 a été mise en évidence dans les biopsies duodénales et iléales d'une patiente immunodéprimée infectée chroniquement par le VHE supposant une réplication virale intestinale (174).

Absorbé par voie digestive, le site de réplication primaire du VHE se situerait probablement dans le tractus intestinal. Après amplification virale, il serait transporté jusqu'au foie par la veine porte où il se répliquera dans le cytoplasme des cellules hépatocytaires (**Fig. 16**)(175). Les virions seraient libérés dans la circulation sanguine et les voies biliaires puis éliminés dans les selles sous forme nues (**Fig. 16**) (127). Le VHE n'étant pas cytopathique



(176,177), les dommages hépatiques induits par l'infection ne seraient pas médiés par un effet viral direct mais par la réponse immunitaire de l'hôte, notamment par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (*Natural Killer*) (178,179).



**Figure 16 : Transport du VHE à travers l'organisme. (1)** Les particules virales ingérées, supposées non-enveloppées, pénétreraient au niveau de la barrière intestinale. Elles se répliqueraient au sein des entérocytes, et traverseraient la barrière intestinale afin d'atteindre la circulation sanguine. Elles seraient transportées sous forme quasi-enveloppées jusqu'au foie *via* la veine porte hépatique. **(2)** Elles atteindraient le foie, leur organe cible, et se répliquent dans les hépatocytes. Les virions néo-formés

quasi-enveloppés seront soit sécrétés au pôle basolatéral dans la circulation sanguine, soit libérés au pôle apical dans les canalicules biliaires où leur enveloppe lipidique serait dégradée. (Oechslin *et al.*, *Gut* 2020)

### 2.2.2. Manifestations cliniques

L'infection par le VHE entraîne des signes cliniques similaires à ceux d'autres hépatites. Dans la majorité des épisodes épidémiques, pour une exposition identique au virus, les hommes sont 2 à 3 fois plus infectés que les femmes (156). L'infection est pour 95% asymptomatique et spontanément résolutive (14). Les enfants sont rarement symptomatiques (180,181).

Les personnes infectées présentent des symptômes non spécifiques, typiques d'une hépatite, la phase prodromique se traduisant par la présence de fièvre, nausées, vomissements et anorexie (130). Certaines souffrent également de douleurs abdominales, d'hépatomégalie, d'arthralgies ou de myalgies (130). Un ictère peut survenir à la suite des lésions hépatiques entraînant une accumulation de la bilirubine dans le sang se caractérisant par des urines foncées, des selles décolorées et une coloration jaunâtre du fond de l'œil. Les substances biliaires peuvent également se déposer dans la peau et causer des démangeaisons sans lésions cutanées (130). La phase de convalescence, qui résulte par la disparition progressive des symptômes, dure entre 2 à 6 semaines (130). Cependant, la maladie peut évoluer en formes graves voire mortelles chez certains patients notamment les immunodéprimés ou les femmes enceintes (162,131). L'évolution clinique dépend du génotype à l'origine de l'infection.

#### 2.2.2.1. Hépatite E aiguë

L'hépatite E est la cause majoritaire d'hépatite virale aiguë à travers le monde (135). Même si l'infection aiguë est en générale asymptomatique ou légèrement symptomatique, 5 à 30% des patients infectés développent un ictère. L'infection aiguë par les génotypes 1 ou 2 du VHE semble être plus sévère (182,183). Au contraire, les génotypes 3 et 4 semblent moins virulents chez les personnes immunocompétentes infectées dont moins de 2% développent des hépatites aiguës symptomatiques (184,185). Plusieurs études japonaises et européennes suggérèrent une différence de pathogénicité entre les VHE-3 et VHE-4. Les sujets infectés par le VHE-4 présentent des manifestations cliniques plus sévères que ceux infectés par le VHE-3 (186–190).



### 2.2.2.1.1. *Pathogénèse chez les femmes enceintes*

Le VHE peut causer des hépatites aiguës graves ou fulminantes dues à une nécrose massive et rapide du parenchyme hépatique, notamment chez les femmes enceintes (191–193). Lors des épisodes épidémiques, ces dernières sont plus susceptibles de contracter une infection par le VHE que la population générale, particulièrement lors des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse (194). L'infection peut évoluer d'une hépatite aiguë à une insuffisance hépatique fulminante, entraînant un taux de mortalité maternel de 30% (195). Les décès sont souvent dus à des complications obstétriques graves incluant des coagulations intravasculaires disséminées, des encéphalopathies, des hémorragies post-partum, des hypertensions portales, des éclampsies ou des comas hépatiques (196). La transmission verticale du virus de la mère au fœtus est possible et est associée à un taux de mortalité périnatal élevé (197,198). Chez les nouveau-nés survivants l'infection est spontanément résolutive (199).

Les modifications transitoires du système immunitaire maternel durant la grossesse pourraient favoriser les infections par le VHE, en altérant la clairance du virus et renforçant de ce fait la sévérité de la pathologie (200).

Une étude menée en Inde montre que les taux hormonaux sont plus élevés chez les femmes enceintes déclarant une hépatite E fulminante que chez les femmes non-infectées (201). L'œstradiol favorise la réplication du VHE en système de culture cellulaire (202). De plus, les taux élevés d'œstrogène sont associés aux accouchements prématurés et à une survie fœtale réduite due à une dysfonction placentaire (203).

Les géotypes 1 et 2 du VHE sont les plus couramment associés aux infections et décès durant la grossesse. Ils sont les plus prévalent dans les pays en développement, et c'est dans ces régions hautement endémiques où les cas de femmes enceintes infectées et la transmission verticale sont les plus importants (197). Le placenta serait un potentiel site extra-hépatique de réplication du VHE avec un meilleur tropisme pour le géotype 1 (204,205). Le VHE-1 entraînerait une dérégulation de la sécrétion de nombreux facteurs inflammatoires d'où une réponse immunitaire déficiente et une clairance virale inefficace (205).

La cause des conséquences fatales de l'infection au VHE chez les femmes enceintes reste peu connue, de même que les mécanismes qui sous-tendent la sévérité des manifestations cliniques et la transmission du virus au fœtus. Les facteurs hormonaux, immunologiques et viraux y auraient un potentiel rôle mais la pathogénèse durant la grossesse reste à étudier plus amplement.

#### 2.2.2.1.2. *Insuffisance Hépatique aiguë-sur-chronique*

Les personnes infectées par le VHE et atteintes d'une maladie hépatique chronique sous-jacente sont à risque de développer une insuffisance hépatique aiguë-sur-chronique (*Acute-on-Chronic Liver Failure*) (206,207). L'ACLF est causée par une détérioration des fonctions hépatiques et associée à une ou plusieurs défaillances d'organes ainsi qu'une mortalité élevée à court terme (206). Elle se manifeste cliniquement par un ictère et une coagulopathie associés à des ascites et/ou encéphalopathies chez des patients présentant une hépatopathie chronique. Ce syndrome est défini par une soudaine décompensation hépatique aiguë résultant de la combinaison de cette hépatopathie et d'un événement déclencheur (208).

#### 2.2.2.2. *Hépatite E chronique*

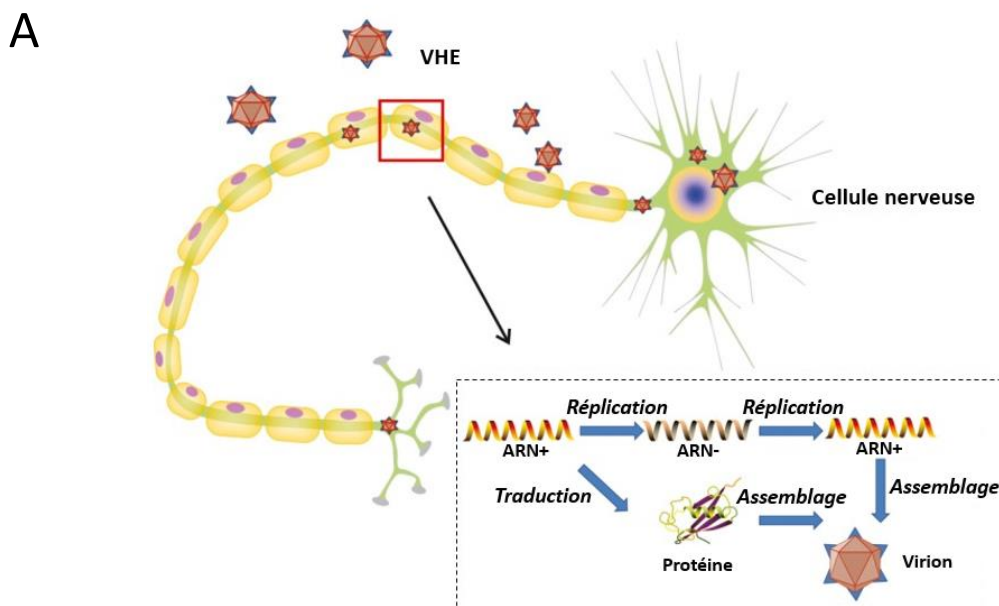
Chez les sujets immunodéprimés pour lesquels la clairance virale est diminuée, l'hépatite E aiguë peut évoluer dans 60% des cas en forme chronique (209). Elle est généralement asymptomatique avec une clairance spontanée du virus. Pour 10% des sujets, cette infection chronique mène à des lésions hépatiques incluant des nodules et une fibrose, et aboutit en l'espace de 2 à 5 ans en une cirrhose potentiellement mortelle (210). Cette chronicité constitue un problème de santé publique croissant dont les causes restent mal connues. L'atteinte par l'hépatite E est considérée comme chronique lorsque la virémie persiste et que l'ARN viral est détectable plus de 3 à 6 mois après l'infection, dans le sérum et/ou les fèces (211). Les patients à risque de développer une chronicité sont principalement les sujets transplantés mais également les individus atteints d'hémopathies malignes sous chimiothérapie et/ou immunothérapie, ainsi que ceux infectés par le VIH ou souffrant d'affection rhumatismales sous traitement immunosuppresseur ou immunomodulateur (211–214).

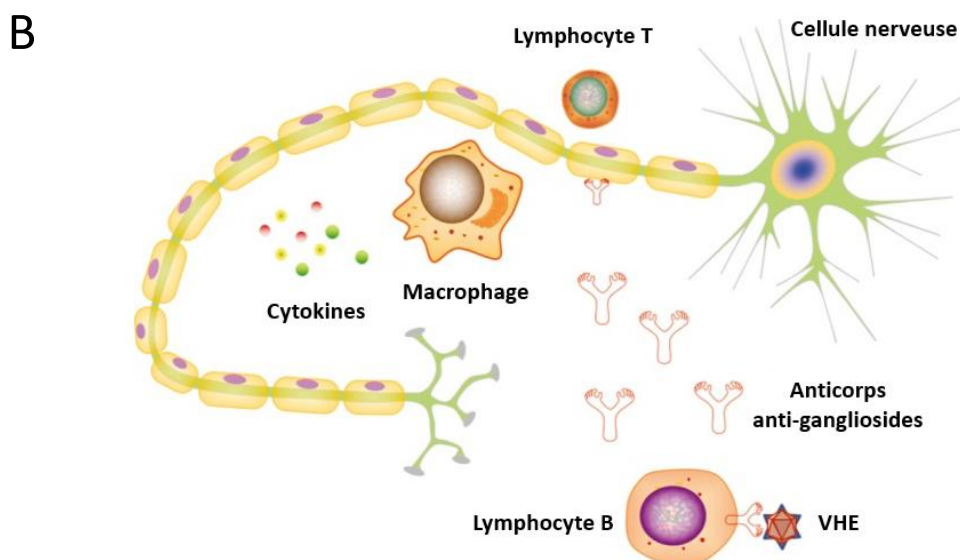
La chronicité serait liée à une déficience de la réponse lymphocytaire T et associée au faible compte de lymphocytes, de plaquettes et à la thérapie immunosuppressive utilisée notamment au tacrolimus (163,209,210). Le VHE comme tous virus ARN, constitue une quasi-espèce du fait de sa variabilité génétique créant une population de variants dont l'hétérogénéité est impliquée dans la pathogénèse virale (215,216). La majorité des cas chroniques reportés font suite à une infection par le génotype 3 mais quelques infections persistantes ont récemment été observées avec les génotypes 1, 4 et 7 (211,217–220,169).

### 2.2.2.3. Manifestations extra-hépatiques

Des manifestations extra-hépatiques, affectant divers organes sont parfois associées à des infections par le VHE. Ces dernières peuvent entraîner des désordres d'ordre neurologiques, hématologiques, ou pancréatiques, des troubles rénaux ou encore des myocardites, arthrites ou maladies auto-immunes (221). Le lien causal de certaines de ces manifestations reste à établir.

Les troubles neurologiques sont les manifestations extra-hépatiques les plus souvent associées à l'infection par le VHE, le plus commun étant le syndrome de Guillain-Barré (SGB). Cette neuropathie inflammatoire acquise affecte le système nerveux périphérique entraînant un déficit sensitivo-moteur ascendant et rapidement progressif dû à une atteinte axonale ou une démyélinisation (222). Elle fait le plus souvent suite à une stimulation immunitaire secondaire à une infection (222). Le mécanisme par lequel le VHE induit un syndrome de Guillain-Barré reste peu clair, même si 2 hypothèses sont plausibles selon différentes études. La pathologie pourrait se déclarer suite à une action directe du virus sur les neurones du système nerveux périphérique qui les endommagerait en s'y répliquant (223). La seconde hypothèse propose une action virale indirecte via une réaction croisée induite par les similitudes structurelles des antigènes viraux et ceux des gangliosides présents à la membrane des cellules du SNP. Ce mimétisme moléculaire serait à l'origine d'une réaction auto-immune qui expliquerait un syndrome de Guillain-Barré post-infection. (223). Différentes études montrent une présence du VHE dans des cellules neuronales, placentaires, dans le lait maternel et également les urines (224,204,225,226). Une réplication secondaire du virus hors du site d'infection primaire ou des réactions croisées pourraient également être à l'origine de manifestations multi-systémiques.





**Figure 18 : Possible facteurs déclenchants du syndrome de Guillain-Barrée après infection par le VHE.** (A) La réplication du VHE au sein des neurones causerait des lésions virales direct sur le système nerveux périphérique. (B) L'infection virale déclencherait une réponse auto-immune due à un mimétisme moléculaire entre l'agent infectieux et les gangliosides présents à la surface des axones et de la gaine de myéline des neurones du SNP. Les lymphocytes T et une variété de cytokines seraient également impliqués dans ce processus pathologique en activant la production d'oxyde nitrique par les macrophages, assistant ainsi la production d'anticorps par les lymphocytes B (223). (Liu et Ma, *Brain and Behavior* 2019).

### 2.2.3. Diagnostic et traitement

#### 2.2.3.1. Diagnostic

Des méthodes de diagnostic direct et indirect peuvent être effectuées afin de détecter une infection par le virus de l'hépatite E. Les tests sérologiques sont communément réalisés et permettent de mettre en évidence les anticorps spécifiques IgG et IgM dirigés contre le VHE (227). La réponse immunitaire implique une élévation du titre des IgM dans le sérum témoignant d'une infection récente. Les IgM resteront détectables durant 3 à 12 mois après le début des symptômes (227). S'en suit une réponse IgG plus durable, dont le pic de sécrétion se situe 4 semaines après celui des IgM. Ces IgG anti-VHE restent détectables plus d'un an après l'apparition des symptômes (**Fig. 18**). Détectés isolément ces anticorps indiquent une infection antérieure au VHE (227). Cette méthode de diagnostic indirect est sensible mais peu spécifique, l'utilité des tests est limitée par leur non-standardisation et la discordance entre les différents kits. De plus les anticorps anti-VHE sont souvent indétectables chez les patients immunodéprimés et les femmes enceintes (227,228). Plus récemment, des études suggèrent

comme nouvelle méthode de diagnostic, une détection directe de la protéine de capside ORF2 dans le sang par méthode immuno-enzymatique ou sur des biopsies du foie par immunohistochimie (229,230).

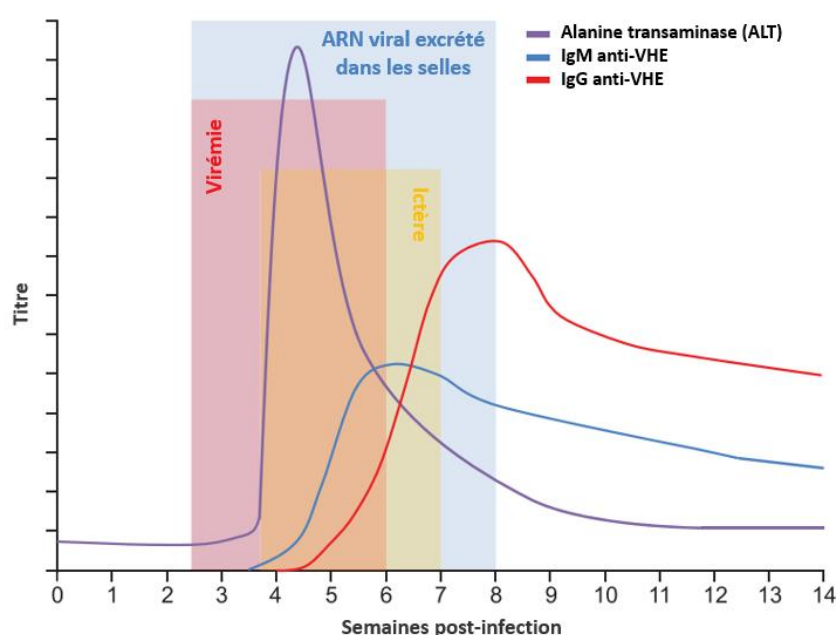
Le diagnostic direct du VHE par RT-PCR est le test de référence pour la détection du VHE et permet la recherche du génome viral dans le sang et/ou les selles des patients infectés parfois avant l'apparition des symptômes (231). La virémie étant de courte durée, l'ARN viral n'est détectable dans le plasma que lors de la phase aiguë de l'infection (227). Le virus continue cependant à être excrété dans les selles plus de 2 semaines suivant l'absence de détection de la charge virale dans le sang (232). Cette technique de biologie moléculaire, bien qu'étant la plus spécifique pour établir un diagnostic d'infection au VHE, a une utilisation limitée. Elle nécessite une expertise et des installations spécialisées, parfois onéreuses pour les pays à faible revenus où la maladie est très répandue. Cette méthode est généralement réalisée afin de confirmer le diagnostic chez les patients immunodéprimés avec une sérologie négative, de surveiller la réponse aux antiviraux, à des fins épidémiologique ou pour déterminer le génotype viral (233).

#### *2.2.3.2. Traitement*

À ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique contre le virus de l'hépatite E, la prise en charge est symptomatique. Ainsi, l'étude du cycle de vie de ce virus est primordiale afin de trouver des pistes de traitements spécifiques à son infection. Dans la majorité des cas chez les personnes immunocompétentes, une hépatite E aiguë a une résolution spontanée qui ne nécessite pas de traitement (130). Dans les rares cas où elle évolue en hépatite fulminante, une hospitalisation est requise nécessitant parfois à une transplantation hépatique. Chez les patients immunodéprimés souffrant d'une infection chronique, la première recommandation est la réduction des doses de leur traitement immunosuppresseur dans la mesure du possible (132). En cas de persistance du virus, la ribavirine en monothérapie ou associée à des interférons pegylés peut être administrée (234–236). Un traitement de 3 mois de ribavirine à la posologie de 600 mg par jour permet l'éradication du virus dans 80% des cas (237,238). Chez les femmes enceintes infectées par le VHE cette molécule est contre-indiquée car tératogène (239). Le mécanisme antiviral exacte de la ribavirine reste peu connu. Il s'agit d'un analogue nucléosidique agissant sur l'ARN polymérase ARN dépendante du VHE. En s'incorporant dans le génome viral nouvellement synthétisé elle exerce un effet mutagène empêchant la réplication de nombreux virus ARN dont le VHE (240–243). Étant donnée l'absence d'autres alternatives thérapeutiques contre l'infection au VHE, la ribavirine et les interférons pegylés sont prescrits

hors AMM. L'efficacité du traitement peut être évaluée en mesurant la charge virale par RT-PCR. Récemment, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré une action anti-VHE du sofosbuvir, un inhibiteur de l'ARN polymérase du VHC (244,245). Il pourrait constituer une alternative à la ribavirine chez les patients réfractaires au traitement où chez les femmes enceintes chez lesquelles la molécule ne peut être administrée.

Le vaccin recombinant Hecolin<sup>®</sup>, mis sur le marché en Chine depuis 2011, contient la protéine HEV239, forme tronquée de la protéine de capsid ORF2 (aa 368-606) du VHE de génotype 1 (246). Elle est produite à grande échelle par *E.Coli* et s'assemble en particules pseudo-virales de structure hautement similaire à la capsid du VHE. Elles sont purifiées puis incluse dans le vaccin (247). Le schéma vaccinal complet consiste en 3 injections à 0, 1 et 6 mois d'intervalle (248–250). Ce vaccin n'est pas homologué pour une utilisation dans les autres pays en raison du manque de données sur son efficacité, son immunogénicité et son innocuité notamment chez les personnes âgées, les enfants et les femmes enceintes (249). D'après l'OMS, des études supplémentaires sont nécessaires afin de juger de la protection d'Hecolin<sup>®</sup> contre les autres génotypes du VHE infectant l'Homme, ainsi que lorsqu'il est co-administré avec d'autres vaccins (249,251).



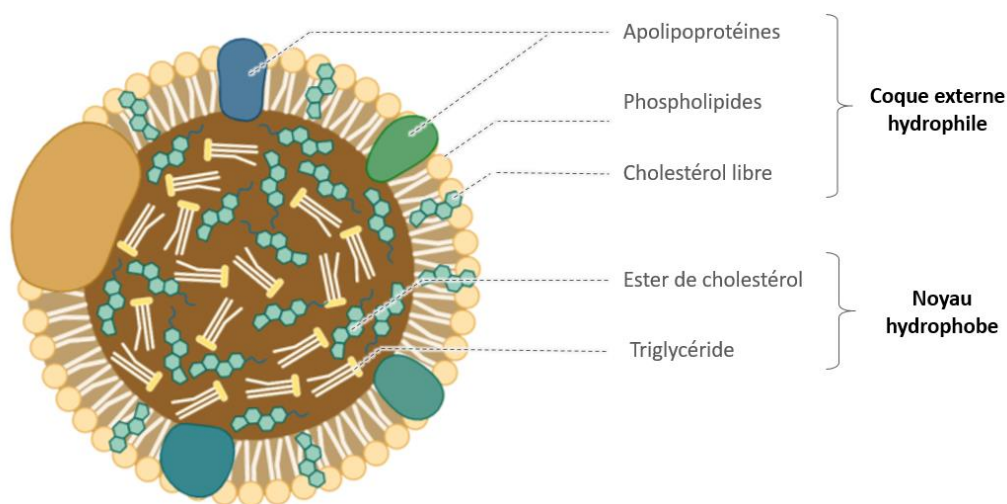
**Figure 18 : Évolution des marqueurs virologique et sérologique après une hépatite virale E.** Les signes cliniques de l'hépatite E se déclarent quelque semaine après l'exposition au virus. L'apparition des symptômes coïncide avec une forte hausse du taux d'alanine aminotransférase (ALT) qui retourne à la normal en période de convalescence. Le génome viral est détectable dans les selles durant la phase aiguë de l'infection, la virémie est difficilement détectable à ce stade. Le titre d'IgM anti-HEV est élevé lors de la phase aiguë de l'infection, tandis que les IgG apparaissent plus tardivement. (Webb et Dalton, *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 2019)

### 3. Partie 3 : L'apolipoprotéine E

#### 3.1. Généralités sur l'apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E est une protéine multifonctionnelle ayant un rôle central dans le métabolisme et le transport des lipides à travers le système lymphatique et le plasma (252,253). Cette apolipoprotéine interchangeable peut être retrouvée dans le plasma sous forme libre ou associée à des lipoprotéines (254). Il existe plusieurs types de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL et les HDL. Les triglycérides, le cholestérol et les esters de cholestérol sont des lipides hydrophobes insolubles dans le sang nécessitant un transport *via* des lipoprotéines (**Fig. 19**) (255). L'apoE entre dans la composition des chylomicrons, des VLDL et des IDL qu'elle va pouvoir adresser à différents tissus et organes notamment le foie (256). En se liant spécifiquement aux récepteurs de surface cellulaire de la famille des LDL (LDLRs) et aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs), elle permet l'internalisation et le catabolisme des lipoprotéines (**Fig.20**) (257,258). L'apoE participe ainsi à la clairance et à l'homéostasie des lipides du plasma.

Sous forme libre l'apoE participe à la modulation de différents processus cellulaires, physiologique ou pathologique dont l'assemblage et la stabilité du cytosquelette, la structure et la fonction mitochondriales ou la morphologie et la fonction des cellules dendritiques (259–262).



**Figure 19 : Constitution d'une lipoprotéine.** Les lipoprotéines sont des particules complexes associant des lipides insolubles et des protéines très hydrophiles, qui vont permettre leur acheminement dans le sang et autres fluides extracellulaires jusqu'à leur site d'utilisation. Leur structure de base et leur composition sont identiques, seule varie la quantité relative des composants ainsi que la taille et la fonction de ces particules. Leur noyau hydrophobe, non polaire, est enveloppé d'une coque externe hydrophile. Les apolipoprotéines les composant assurent leur cohésion et stabilité, leur reconnaissance







Chez l'Homme l'apolipoprotéine E est codée par le gène polymorphe APOE pouvant présenter 3 variants alléliques différents ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ ) (275). L'apoE existe donc sous 3 isoformes majoritaires qui diffèrent par leurs acides aminés en position 112 et 158 : l'apoE2 (Cys<sup>112</sup>, Cys<sup>158</sup>), l'apoE3 (Cys<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>) et l'apoE4 (Arg<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>) (275). Ce polymorphisme altère la structure de la protéine en particulier au niveau de son site d'interaction aux récepteurs affectant l'homéostasie lipidique (272). La forme apoE3 est la plus prévalente et considérée comme la forme physiologique normale essentielle à la métabolisation des lipides (276,277). A l'inverse, les isoformes apoE2 et apoE4 ayant des affinités différentes avec les récepteurs LDL affectent la clairance des lipides circulants, ce qui entraîne le développement de certaines pathologies. L'isoforme apoE2 serait beaucoup moins affin pour les LDLR que l'isoforme apoE3 lui-même moins affin que l'isoforme E4 ( $E4 < E3 < E2$ ) (271,278).

Les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  à l'état homozygote ont un risque plus élevé de présenter une hyperlipoprotéïnémie de type III dû à la diminution du captage des lipoprotéines par les cellules. L'augmentation de la concentration plasmatique des triglycérides (hypertriglycémie) et du cholestérol (hypercholestérolémie) entraîne un dépôt de ces lipides en excès sur les parois artérielles formant des plaques d'athéromes (253). Chez les patients exprimant l'apoE2, le risque de développer des pathologies cardiovasculaires est donc élevé notamment lorsqu'il est associé à d'autres facteurs environnementaux.

L'apoE4 constitue un facteur de risque au développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (279). L'altération des fonctions neurologiques serait en partie due à une structure protéique tertiaire anormale entraînant l'interaction des domaines C-terminal et N-terminal (280). Cette structure altérée génère des fragments neurotoxiques d'apoE4 causant entre autre une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau (281) et de la production de peptide  $\beta$ -amyloïde (282).

### **3.2. L'apolipoprotéine E en virologie**

De nombreuses études ont démontré l'implication de l'apolipoprotéine E dans la morphogénèse et/ou la pathogénicité de différents virus. Ainsi, l'apoE4 se lie aux virus herpès simplex de type 1 et permet son acheminement jusqu'au SNC favorisant ainsi l'apparition d'encéphalite herpétique (283). De plus, les patients infectés par l'HSV-1 et porteur de l'allèle  $\epsilon 4$  sont prédisposés au développement de maladie d'Alzheimer ou d'herpès labial (284). Chez les femmes infectées par le VZV ou l'EBV, l'expression de l'apoE3 constituerait un facteur de risque au développement respective de névralgie post-zostérienne ou de mononucléose

infectieuse. A l'inverse, la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  à l'état homozygote conférerait une protection contre ces manifestations virales (285).

La protéine d'enveloppe du virus Zika interagit spécifiquement avec l'apolipoprotéine E lors des étapes précoces de son cycle infectieux. Cette interaction persiste lors du transport et de la libération des virions et est conservée au sein des particules virales sécrétées (286).

L'apoE est aussi impliquée dans la persistance du virus de l'immunodéficience humaine au sein des macrophages (287). Il a été démontré que le génotype  $\epsilon 4/\epsilon 4$  augmente *in vitro* l'entrée cellulaire du virus, et accélère sa progression (288). L'apoE4 influence les effets du VIH sur les fonctions neurologiques. Chez les patients infectés, l'expression de cet isotype augmente le risque développer des maladies neurodégénératives et des neuropathies périphériques (289,290).

L'apoE a plusieurs rôles avérés dans le cycle infectieux de virus des hépatites. Présente au sein de l'enveloppe du virus de l'hépatite B, elle favorise son infection et sa production en permettant entre autre l'adsorption du virus (291). Elle jouerait également un rôle important dans la persistance cellulaire du VHB en participant potentiellement à son échappement face à la réponse immunitaire (291). Dans le cas du VHC, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de l'apolipoprotéine E dans la morphogénèse du virus, notamment lors de l'assemblage et de l'exocytose du virus, en se liant à ses glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (292,293). Elle est présente à la surface des lipo-viro-particules néoformées et participe à leur infectivité en permettant leur attachement et internalisation au sein des hépatocytes ainsi que leur transmission intercellulaire (292,294–296). Comme pour le VHB, l'apoE contribue à l'échappement du VHC face au système immunitaire, favorisant l'établissement d'une infection chronique (297). L'affinité différentielles des isotypes de l'apoE aux récepteurs de surfaces peuvent moduler l'infectivité et la clairance virale, et de ce fait la susceptibilité des patients à contracter une infection par le VHC (298). Les porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  sont résistants à l'infection par le VHC, contrairement aux porteurs de l'allèle  $\epsilon 3$  qui constituerait un facteur de risque au développement d'une hépatite C chronique (298). L'apoE4 serait bénéfique à l'élimination du virus et au rétablissement des patients sous traitement (299).

Plusieurs analyses protéomiques quantitatives menées chez le porc montrent que l'apolipoprotéine E est surexprimée lors d'une infection aiguë par le VHE et serait potentiellement impliquée dans la pathogénèse virale (300,301). Dans une étude transversale menée par Zhang *et al.*, l'expression des isotypes apoE3 et apoE4 conférerait une protection contre l'infection par le VHE chez les patients afro-américains non hispaniques (302). En

Chine, les travaux de Gu *et al.* ont mis en évidence une association significative entre le polymorphisme génétique de l'APOE et la susceptibilité de contracter une hépatite E. En effet, la présence de certaines variations dans la séquence nucléotidique du gène de l'apoE entraîne une diminution du risque d'infection chez les hommes de la population Han (303). L'ensemble de ces données soulignent une potentielle implication de l'apolipoprotéine E dans la morphogénèse du VHE. L'engagement de cette protéine dans le cycle viral serait possible selon un mécanisme d'action qui reste à ce jour inconnu.

## 4. Partie 4 : Travail expérimental

Lors de ce projet de thèse nous avons cherché à caractériser l'interaction de la protéine ORF2 du VHE et de l'apoE en lignées cellulaires hépatiques. Une étude a montré une lipdation différentielles des particules de VHE quasi-enveloppées, mettant en évidence une association des eVHE avec les lipides (13). De plus, des données préalablement acquises par des membres de l'unité INSERM U1259 MAVIVH en collaboration avec le CIIL (Centre d'Infection et d'Immunité de Lille) avaient suggéré l'existence d'une colocalisation de l'apoE et de la protéine ORF2 du VHE dérivé de culture cellulaire observé en microscopie confocale après immunomarquage (données non présentées). Nous avons donc pour objectif de confirmer cette colocalisation à l'aide d'immunomarcages observés en microscopie confocale. Nous avons tenté ensuite de démontrer cette interaction entre la protéine ORF2 du VHE et de l'apoE par des approches de co-immunoprécipitation. Pour ce faire, nous avons exprimé la protéine virale de façon isolée, mais aussi le génome complet du VHE, dans 2 lignées hépatiques différentes. Des immunomarcages de l'apolipoprotéine B ont été réalisés afin de juger de la spécificité de l'interaction entre la protéine ORF2 et l'apoE.

### 4.1. Matériels et méthodes

#### 4.1.1. Matériels

##### 4.1.1.1. Cellules PLC/PRF/5 et Huh7.5

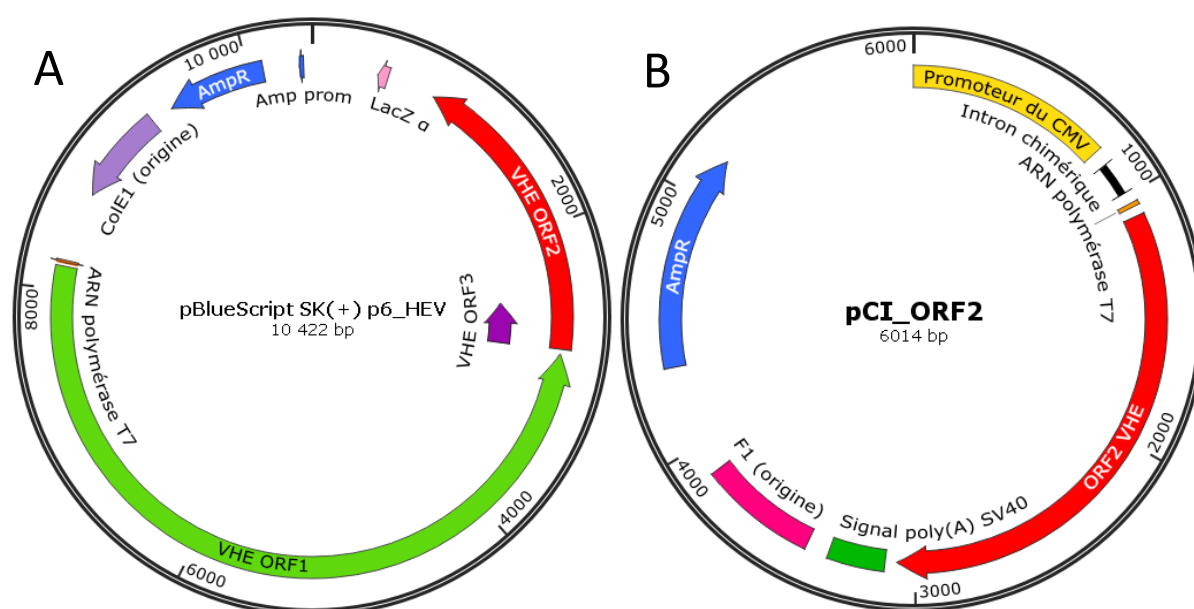
Les lignées cellulaires PLC/PRF/5 et Huh7.5 sont issues de carcinomes hépatocellulaires humains. La lignée PLC/PRF/5 est une lignée polyclonale alors que les cellules Huh7.5 sont un sous-clone de la lignée Huh7 isolée d'un patient japonais de 57 ans en 1982 (304). Ces lignées sont adhérentes et cultivées à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) GlutaMAX™ (Gibco®, Life Technologie™, Carlsbad, Californie, États-Unis) – 10 % SVF décomplémenté – 1 % Pénicilline/Streptomycine (appelé DMEM complet). Elles expriment l'apoE de façon constitutive.

##### 4.1.1.2. Plasmides codant pour la protéine ORF2 ou le VHE complet

Le plasmide pCI-ORF2 de 6 014 pb (**Fig. 21a**) contient la séquence de la protéine ORF2 de la souche VHE Kernow-C1 de génotype 3 ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur, conçu par Alain Moreau (Ingénieur - INSERM U1259 MAVIVH) et Yannick Tréguier

(doctorant - INSERM U1259 MAVIVH), a été utilisé pour exprimer la protéine virale de manière isolée en cellules hépatocytaires.

Le plasmide pBlueScript SK(+) p6-HEV (**Fig. 21b**) est un vecteur de 10 422 pb contenant la séquence complète du génome de la souche VHE Kernow-C1 de génotype 3 (clone p6). Cette construction nous a été donnée par S.U. Emerson (*Molecular Hepatitis and Hepatitis Viruses sections, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Le plasmide code pour les 3 ORFs du VHE ainsi que pour un gène de résistance à l'ampicilline et permet d'obtenir le génome complet du VHE sous forme d'ARN après transcription *in vitro* à l'aide du kit mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis).



**Figure 21 : (A) Plasmide contenant le génome complet du clone p6 de la souche Kernow-C1 du VHE.** Cette souche appartient au génotype 3 du VHE. L'expression du génome est sous la dépendance du promoteur du phage T7. Ce plasmide contient aussi une cassette de résistance à l'ampicilline. **(B) Plasmide contenant le gène de la protéine ORF2 du VHE.** Ce plasmide contient la séquence de la protéine ORF2 de la souche de VHE Kernow-C1 de génotype 3 ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. L'expression du gène de la protéine ORF2 est sous la dépendance du promoteur du CMV.

#### 4.1.1.3. Anticorps

Différents anticorps ont été utilisés pour les techniques d'immunoprécipitation et/ou d'immunofluorescence. Un anti-ORF2 monoclonal de souris (clone 1E6, MAB8002, Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, États-Unis), un anti-apoE polyclonal de chèvre

(AB947, Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, États-Unis), un anticorps anti-apoE monoclonal de lapin, un anti-apoE monoclonal de souris et un anti- $\beta$ -actine (ab52607, ab1907 et ab8227, respectivement, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) ont permis la détection des protéines d'intérêt.

Pour la technique d'immunoprécipitation, un anticorps IgG1 de souris (MAB002, R&D Systems Minneapolis, Minnesota, États-Unis), un anticorps IgG de lapin (AB-105-C, R&D Systems Minneapolis, Minnesota, États-Unis) et un anticorps IgG de chèvre (ab21179, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) ont été utilisés comme contrôles isotypiques. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris, anti-IgG de chèvre et anti-IgG de lapin (ab6820, ab6885 et ab6802, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), tous produits chez l'âne et couplés à la peroxydase de raifort (HRP), ont été utilisés pour les analyses par Western Blot.

Les anticorps secondaires utilisés pour les techniques d'immunofluorescence étaient aussi produits chez l'âne. Un anti-IgG de souris couplé à un AlexaFluor 594, un anti-IgG de chèvre couplé à un AlexaFluor 488 et deux anti-IgG de lapin, couplés à un AlexaFluor 405 pour l'un et un AlexaFluor 488 pour l'autre, ont servi aux immunomarquages (A21203, A11055, A32790, A32790, respectivement, Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis).

#### 4.1.2. Méthodes

##### 4.1.2.1. *Électroporation des cellules PLC/PRF/5 pour expression du génome complet du VHE*

Les cellules ont été détachées par traitement à la Trypsine-EDTA (Gibco®, Life Technologie™, Carlsbad, Californie, États-Unis) puis récoltées dans du milieu DMEM complet. Quatre millions cellules ont été centrifugées à 500 g à température ambiante pendant 4 min, les culots ont été repris dans 2 mL de PBS stérile (*Phosphate-Buffered Saline*, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis), puis à la suite d'une 2<sup>ème</sup> étape de centrifugation identique à la première, le culot cellulaire a été repris dans 1 mL de PBS stérile. Les cellules ont ensuite été électroporées avec 20  $\mu$ g d'ARN p6-VHE avant d'être transférées dans 10 mL de milieu MEM (Gibco™) contenant 2 % SVF, 2 mM L-Glutamine, 1 % NEAA, 100 U/mL Penicilline G, 100  $\mu$ g/mL Streptomycine, 2,5  $\mu$ g/mL Amphotéricine B et 30 mM MgCl<sub>2</sub>. La suspension cellulaire a étéensemencée dans un flacon T75 et mise à incuber dans le laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (L3) à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture a été renouvelé et remplacé par le même milieu contenant cette fois 10 % de SVF. Les cellules ont été récoltées 96 h post-électroporation pour réaliser les tests de co-immunoprécipitation.

#### 4.1.2.2. Transfection des cellules PLC/PRF/5 et Huh7.5 avec un plasmide contenant la séquence de la protéine ORF2 du VHE

Pour la réalisation des tests de co-immunoprécipitation,  $4.10^6$  cellules ont étéensemencées en flacon T75 puis transfectées après 24 h de culture. Afin d'obtenir les solutions de transfections, deux mélanges ont été réalisés : 15 µg de plasmide et 30 µL de JetPEI® (Polyplus transfection®, Illkirch, France) ont été ajoutés en tubes individuels dans un volume final de 250 µL de NaCl 150 mM stérile. Le mélange contenant le JetPEI® a ensuite été ajouté à celui contenant l'ADN et, après incubation de 20 min à température ambiante, ajouté dans le milieu de culture des flaconsensemencés. Six heures post-transfection, le milieu de culture a été renouvelé.

Pour les marquages par immunofluorescence, 150 000 cellules ont étéensemencées par puits de plaque p12 sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre préalablement stérilisées à l'éthanol 70 % et lavées 3 fois avec du PBS stérile. Trois méthodes de transfections différentes ont été réalisées afin de comparer le profil d'expression de la protéine ORF2 et de déterminer la méthode optimale à utiliser pour la suite du projet. Pour se faire, du JetPEI®, du FuGENE® (E2311, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, États-Unis) ou de la lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis) ont été utilisés comme agents de transfection. Pour obtenir les solutions de transfection finales, des mélanges ont été réalisés comme décrit dans le **tableau I**, le contenu du tube 1 étant ajouté dans celui du tube 2. Après 15 sec d'homogénéisation puis 20 min d'incubation à température ambiante, les 200 µL de solution de transfection ont été déposés dans les puits. La plaque a ensuite été incubée à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, le milieu a été renouvelé 6 h après. Les cellules ont ensuite été fixées 24 h post-transfection.

Agent de transfection	JetPEI®	FuGENE®	Lipofectamine
Tube 1	4 µL de JetPEI® + qsp 100 µL de NaCl	1 µg de plasmide + qsp 100 µL d'Opti-MEM™	1,6 µg de plasmide + qsp 100 µL d'Opti-MEM™
Tube 2	2 µg de plasmide + qsp 100 µL de NaCl	4,8 µL de FuGENE® + qsp 100 µL d'Opti-MEM™	4 µL de lipofectamine + qsp 100 µL d'Opti-MEM™

**Tableau I: Composition de la solution de transfection en fonction des agents de transfection utilisés.**

#### 4.1.2.3. *Étude de la co-immunoprécipitation de l'apoE et de la protéine ORF2*

Les cellules PLC/PRF/5 et Huh7.5 ont été lavées avec du PBS stérile puis détachées par traitement à la Trypsine-EDTA et récoltées avec du milieu DMEM complet. Après une étape de centrifugation à 500 g pendant 4 min à température ambiante, le culot cellulaire a été lysé dans 200 µL de tampon de lyse Triton 1 % - 2 mM d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (A32963, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Un dosage des protéines totales du lysat a été réalisé à l'aide de la trousse Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) dans le surnageant après centrifugation de l'échantillon à 16 600 g, pendant 10 min à 4°C.

Des billes de sépharose couplées à la protéine G (101243, Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis) ont été lavées 3 fois par des cycles de centrifugation d'1 min à vitesse maximale et re-suspension dans du PBS. Un mélange de 500 µL de PBS et de 2 µg d'anticorps isotypiques ou dirigés contre l'apoE ont été ajoutés aux billes qui ont ensuite été incubées 2 h sous agitation lente à température ambiante. Les billes ont ensuite été centrifugées puis reprises en PBS - 5 % BSA (*Bovine Serum Albumin*, Euromedex, Souffelweyersheim, France), préalablement filtré sur membrane en acétate de cellulose 0,2 µM (146560, Dutscher, Bernolsheim, Bruxelles), et incubées 45 min sous agitation à température ambiante afin de saturer les sites de fixation non-spécifiques. Après une nouvelle centrifugation d'1 min à vitesse maximale, les billes couplées aux anticorps ont été mises en contact avec 300 µg de surnageant de lysat de PLC/PRF/5 ou Huh7.5 transfectées avec le pCI-ORF2 ou 200 µg de surnageant de lysat de PLC/PRF/5 électroporées avec l'ARN de la souche Kernow C1 p6 du VHE à un volume final de 500 µL en PBS. Les échantillons ont ensuite été incubés sur la nuit sous agitation à 4 °C. Le lendemain, après centrifugation pendant 1 min à vitesse maximale, les échantillons ont été lavés trois fois en PBS - 0,2 % Triton X100 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis).

#### 4.1.2.4. *Détection des protéines ORF2, ORF3, apoE et apoB par Western Blot*

Les échantillons issus des diverses immunoprécipitations réalisées ont été repris en tampon Laemmli (S3401, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) – 1 % β-mercaptoéthanol puis chauffés à 96 °C pendant 6 min. Après centrifugation 1 min à température ambiante à 8 000 g permettant de dissocier les billes des protéines, les protéines d'intérêt ont été séparées selon leur poids moléculaire par SDS-PAGE (Électrophorèse sur gel de



polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) sous l'action d'un courant de 50 mA pendant 1 h 30 sur gel contenant 12 % polyacrylamide (ID-PA0121-015, Eurogentec, Liège, Belgique) puis transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, GE Life Sciences, Amersham, Royaume-Unis) préalablement activée au méthanol pur (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Après 1 h 30 de transfert en tampon TGS (Tris-glycine-SDS, Buffered Salin solution, Euromedex, Souffelweyersheim, France) – 0,2 % méthanol (*Buffered Salin solution*, Euromedex, Souffelweyersheim, France), les sites de fixation non spécifiques de la membrane ont été saturés en utilisant du TBS (*Tris Buffered Salin solution*, Euromedex, Souffelweyersheim, France) – 5 % BSA – 0,2 % Tween 20 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) pendant 30 min sous agitation lente. La membrane a ensuite été incubée sur la nuit sous agitation à 4 °C en présence des anticorps primaires dirigés contre les protéines ORF2, apoE et actine, dilués au 500<sup>ème</sup> en tampon de saturation. La membrane a été lavée par 3 incubations de 10 min sous agitation rapide à température ambiante en TBS – 0,5% Tween 20 puis incubée pendant 1 h avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP dilués au 10 000<sup>ème</sup> en tampon de saturation. Après 3 nouveaux lavages de 10 min en TBS – 0,5% Tween 20, les protéines d'intérêt transférées sur la membrane ont été détectées par chimioluminescence à l'aide du kit *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* ou *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

#### 4.1.2.5. Marquage des protéines ORF2, apoE et apoB par immunofluorescence

Vingt-quatre heures post-transfection des différentes lignées avec le pCI-ORF2, les cellules ont été fixées en PBS - paraformaldéhyde 4 % (PFA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvanie, États-Unis) à température ambiante pendant 20 min puis rincées 3 fois en PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées en PBS – 2 % BSA - 0,2 % Triton X100 sous agitation lente pendant 20 min à température ambiante puis les lamelles ont été incubées en atmosphère humide pendant 1 h avec les anticorps primaires ciblant les protéines d'intérêt ORF2 et apoE, dilués au 500<sup>ème</sup> dans du PBS – BSA 0,2 %. Après 10 allers-retours dans 4 bains de PBS différents, une incubation pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome dilué au 2 000<sup>ème</sup> en PBS – BSA 0,2 % a été réalisée. Après une nouvelle étape de lavage dans 4 bains de PBS, les lamelles ont été posées sur lame de verre à l'aide d'un milieu de montage. Ce milieu de montage était composé de Fluoromount-

G et 50 % (Southern Biotech, Birmingham, États-Unis). La polymérisation du milieu de montage a été effectuée sur la nuit à 4 °C.

Les lamelles ont ensuite été observées en microscopie confocale à balayage laser haute résolution (LEICA SP8 gSTED, LEICA, Wetzlar, Allemagne) afin d'observer les cellules. Une acquisition de piles d'images axiales (Z-stack) a été faite sur 10 cellules par lamelle. Un total de 3 lamelles par condition (n=3) a été étudié. Les cellules ont été détournées lors de l'analyse afin d'étudier uniquement les signaux de fluorescences présents dans la cellule sélectionnée. L'analyse de la distribution des signaux fluorescents de la protéine ORF2 et l'apoE ou de la protéine ORF2 et de l'apoB a permis de calculer le Coefficient de Corrélation de Pearson (CCP) moyen, après moyenne des CCP de chaque Z-stacks par condition. Le CCP exprime l'intensité et le sens de la relation linéaire (positive ou négative) entre ces 2 signaux, voxel par voxel.

## 4.2. Résultats

### 4.2.1. Co-Immunoprécipitation

#### 4.2.1.1. *Co-Immunoprécipitation de l'apoE avec la protéine ORF2 en système VHEcc*

Pour étudier l'interaction entre l'apoE et la protéine virale ORF2, des cellules PLC/PRF/5 ont été électroporées avec l'ARN de la souche Kernow C1 p6 du VHE (**Fig. 21A**) puis récoltées 24 h après. Deux cents microgrammes de lysat de cellules ont ensuite été soumis à une immunoprécipitation avec différents anticorps ciblant l'apoE. Les produits d'immunoprécipitation ont été séparés par SDS-PAGE puis transférés sur membrane PVDF et nos protéines d'intérêt ont été marquées avec un anti-apoE polyclonal de chèvre purifié, un anti-ORF2 monoclonal de lapin et un anti- $\beta$ -actine de lapin (**Fig. 22A**).

Une bande à 42 kDa correspondant au poids moléculaire de la  $\beta$ -actine (42 kDa) est visible dans les deux conditions témoins. Son intensité, identique au sein des cellules naïves et électroporées, permet d'attester que la quantité de lysat cellulaire déposée est identique dans les échantillons. La présence d'une bande à 34 kDa dans les lysats de cellules naïves et électroporées témoigne de l'expression constitutive de l'apoE dans les PLC/PRF/5 (**Fig. 22A**). Cette bande est retrouvée dans les produits d'immunoprécipitation de tous les anti-apoE utilisés. Cependant, son intensité varie selon les anticorps utilisés. En effet, elle est moins importante avec l'anti-apoE polyclonal de chèvre lorsque l'anticorps n'est pas purifié par rapport au même anticorps après purification et elle est extrêmement faible lorsque l'anticorps monoclonal de

lapin a été utilisé. Cela indique une différence dans la capacité des différents anticorps à précipiter la protéine d'intérêt.

Une bande à 80 kDa dans le lysat de cellules électroporées avec l'ARN de la souche Kernow C1 du VHE correspondant à la protéine ORF2 indique une expression de la protéine virale dans le système (**Fig. 22A**). Cette bande est retrouvée à différentes intensités selon les conditions dans les produits d'immunoprécipitation de l'anti-apoE de chèvre (purifié ou non) et monoclonal de lapin ce qui témoigne d'une co-immunoprécipitation de la protéine ORF2 lorsque l'apoE est précipitée. La spécificité de cette co-immunoprécipitation est validée par l'absence de bande à cette masse moléculaire dans les conditions où des anticorps isotypiques ont été utilisés pour réaliser les immunoprécipitations.

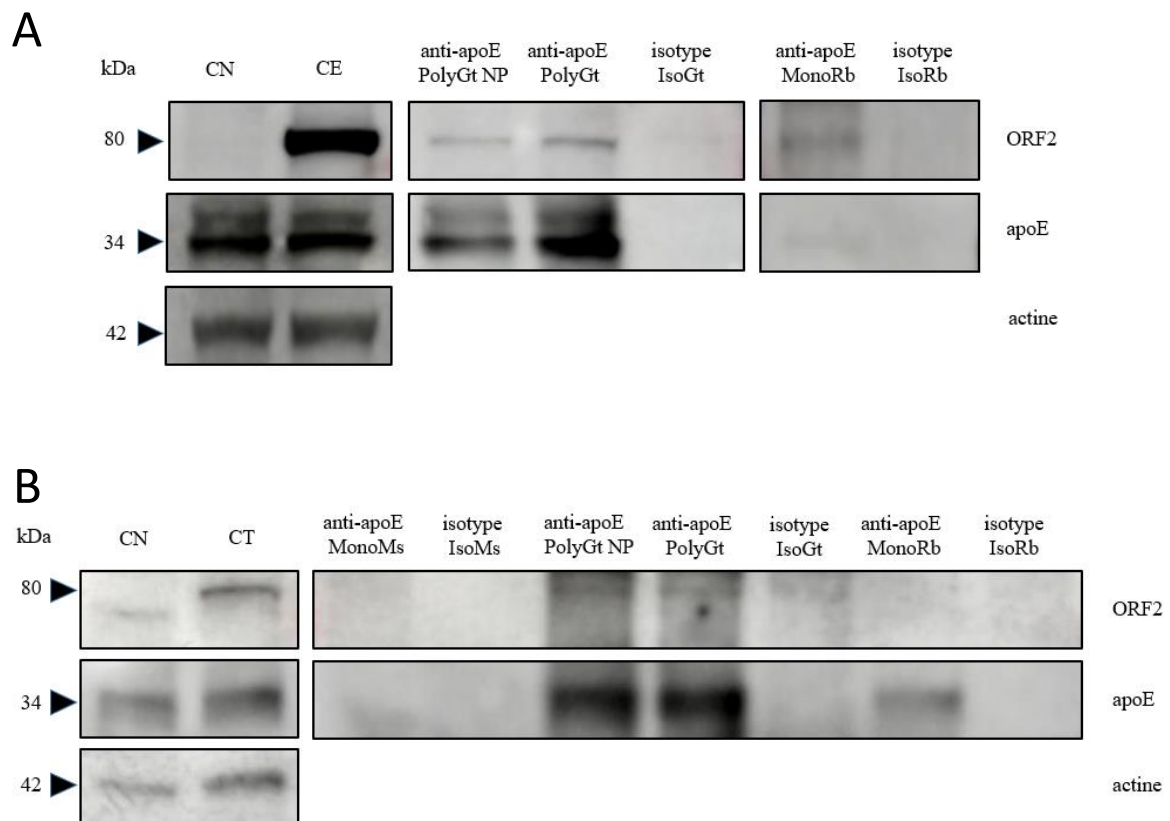
#### *4.2.1.2. Co-immunoprécipitation de l'apoE avec la protéine ORF2 en système hétérologue*

Un test de co-immunoprécipitation d'apoE et de la protéine ORF2 en système hétérologue a été conduit afin d'étudier l'interaction de l'apoE et de la protéine ORF2 exprimée de manière isolée. Des cellules PLC/PRF/5 ont été transfectées avec le pCI-ORF2 (**Fig. 21B**), puis récoltées 24 h après transfection. 300 µg de lysat de cellules transfectées ont été immunoprécipités avec les différents anticorps ciblant l'apoE. Les produits d'immunoprécipitation ont été séparés par SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane PVDF afin de réaliser un marquage avec un anti-apoE polyclonal de chèvre purifié, un anti-ORF2 monoclonal de lapin et un anti-β-actine (**Fig. 22B**). L'intensité de la bande correspondant à l'actine est identique dans les lysats de cellules naïves et transfectées, attestant l'équivalence quantitative des lysats contrôles déposés.

Une bande à 34 kDa dans les lysats de cellules naïves et transfectées traduit l'expression de l'apoE dans ces cellules (**Fig. 22B**). Cette bande, présente dans les produits d'immunoprécipitation de l'anti-apoE polyclonal de chèvre (purifié ou non) et monoclonal de lapin, indique la précipitation efficace de l'apoE. Cependant, moins d'apoE semble précipiter avec l'anti-apoE monoclonal de lapin, comme observée lors des co-immunoprécipitation sur cellules exprimant le génome complet du VHE. Lorsque l'anti-apoE monoclonal de souris a été utilisé, aucune bande correspondant à l'apoE n'a été observée contrairement à celle utilisée avec le monoclonal de lapin.

L'expression de la protéine ORF2 au sein des cellules est confirmée par la présence d'une bande à 80 kDa, correspondant au poids moléculaire de la protéine ORF2 dans le lysat

de cellules transfectées (**Fig. 22B**). Son expression en système hétérologue semble plus faible qu'en VHEcc. Une bande non spécifique est également présente dans le lysat de cellules naïves à quelques kDas de moins. L'absence de bande à 80 kDa lorsque l'anti-apoE monoclonal de lapin ou monoclonal de souris ont été utilisés indique une absence de co-immunoprécipitation de la protéine. En revanche, une infime bande à 80 kDa est observable lorsque apoE a été précipitée avec les anticorps polyclonal de chèvre (purifié et non-purifié). Ce résultat n'est pas clair et n'a pas pu être reproduit à l'heure actuelle.



**Figure 22 : Analyse par Western Blot des co-immunoprécipitations anti-apoE en système VHEcc (A) et en système hétérologue (B) sur lignée PLC/PRF/5.** La  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de charge protéique. Les 2 premières pistes correspondent aux échantillons contrôles : 40  $\mu$ g de lysat de cellules naïves (CN) (A), 40  $\mu$ g de lysat de cellules électroporées avec l'ARN de la souche Kernow C1 p6 HEV (CE) (A), 60  $\mu$ g de lysat de cellules naïves (CN) (B) et 60  $\mu$ g de lysat de cellules transfectées avec le pCI-ORF2 (CT)(B). Deux-cent  $\mu$ g de lysat de cellules électroporées (A) et 300  $\mu$ g de cellules transfectées (B) ont été immunoprécipités pour chaque condition. Les tests d'immunoprécipitation ont été conduits avec différents anticorps ciblant l'apoE : un anti-apoE monoclonal de souris (anti-apoE MonoMs), un anti-apoE polyclonal de chèvre purifié (anti-apoE PolyGt), un anti-apoE polyclonal de chèvre non purifié (anti-apoE PolyGt NP), un anti-apoE monoclonal de lapin (anti-apoE MonoRb). Des co-immunoprécipitations avec un isotype de souris (isotype IsoMs), un isotype de chèvre (isotype IsoGt) et un isotype de lapin (isotype IsoRb) ont servi de contrôle de spécificité.

## 4.2.2. Immunofluorescence

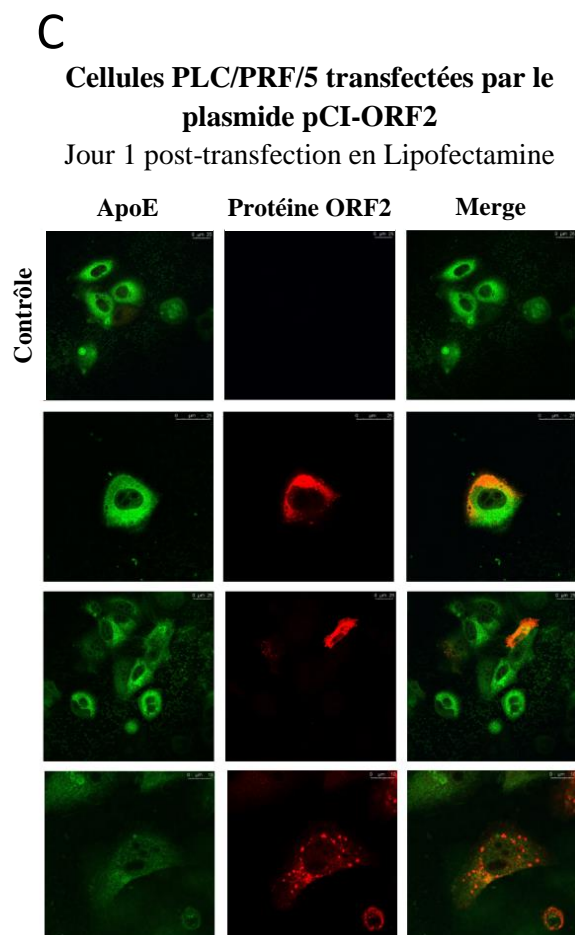
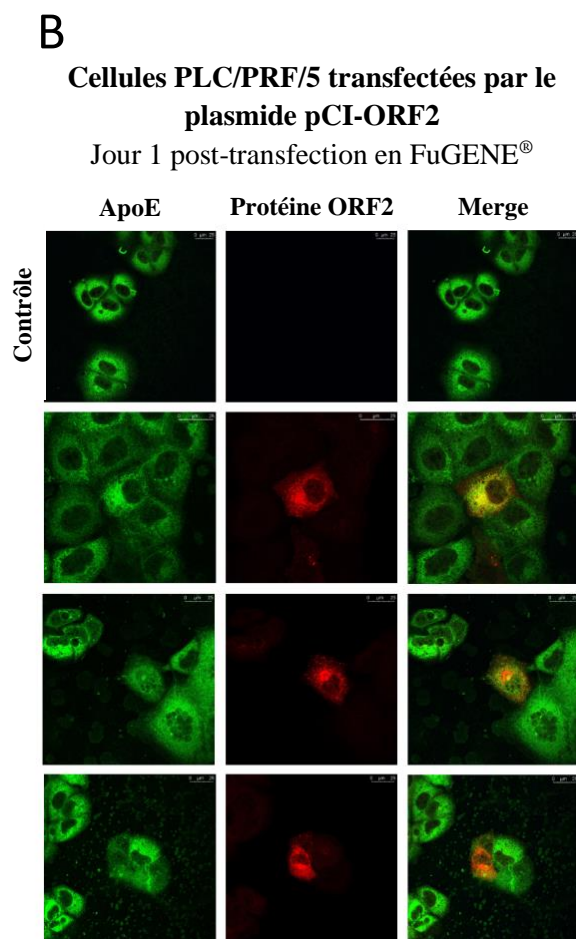
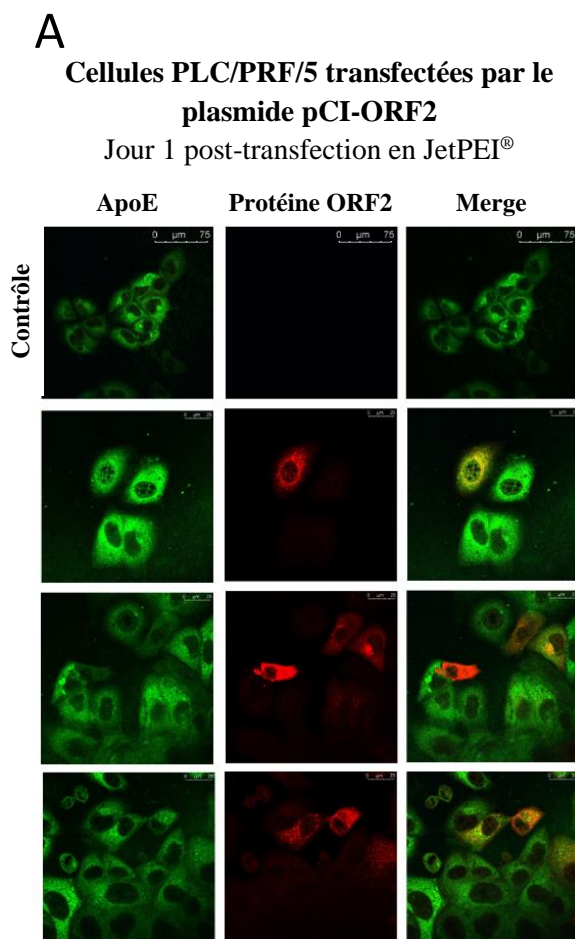
### 4.2.2.1. *Comparaison de différents agents de transfection sur l'efficacité de transfection*

Les cellules PLC/PRF/5 ont été transfectées avec le pCI-ORF2 (**Fig. 21B**) puis fixées 24 h après. L'observation des marquages par immunofluorescence de nos protéines d'intérêt ont permis de déterminer quel était l'agent de transfection le plus adapté pour les études de colocalisation ultérieures entre JetPEI®, FuGENE® et lipofectamine. L'objectif était de comparer leur impact sur l'efficacité de la transfection et la localisation intracellulaire de la protéine ORF2.

La présence de marquage spécifique pour chaque condition indique que nos protéines d'intérêt, ORF2 et apoE, sont exprimées quel que soit l'agent transfectant (**Fig. 23**). Dans l'ensemble des cellules observées, l'apoE présente un marquage diffus accentué dans la région périnucléaire à l'inverse de la protéine ORF2 qui présente différents phénotypes d'expression. A noter que l'efficacité de transfection est inférieure à 20 % et que les cellules présentant un marquage positif à la protéine ORF2 ont un marquage faible d'apoE en règle générale. L'inverse est aussi observé lorsque l'apoE est fortement marquée dans les cellules exprimant la protéine ORF2.

Un marquage de l'apoE est parfois présent au sein des noyaux lors de transfection en JetPEI® (**Fig. 23A**). Ce dernier est présent dans certaines cellules exprimant ou non un marquage de la protéine ORF2. Cela traduit potentiellement un stress cellulaire lié au protocole de transfection. Ce phénomène est retrouvé de manière moins fréquente dans les cellules transfectées en utilisant le FuGENE® (**Fig. 23B**). Très peu de cellules présentent un marquage par immunofluorescence 24 h après transfection en lipofectamine (**Fig. 23C**).

Malgré ces marquages d'apoE pouvant se retrouver en intranucléaire, une quantité plus importante de cellules exprimant la protéine ORF2 est observée lorsque la transfection a été réalisée avec du JetPEI®. Cet agent de transfection a donc été choisi pour les études suivantes.



**Figure 23 : Comparaison de différents agents transfectants sur l'efficacité de transfection et la localisation intracellulaire de la protéine ORF2.** Trois protocoles de transfection ont été réalisés avec des agents transfectants différents : JetPEI® (A), FuGENE®(B) et Lipofectamine (C). Les cellules PLC/PRF/5 ont été transfectées avec le plasmide pCI-ORF2 et utilisées pour le marquage par immunofluorescence à 24 h post-transfection. Des cellules transfectées avec de l'eau ultra stérile servent ici de témoins négatifs. Un anticorps anti-apoE polyclonal de chèvre purifié et un anti-ORF2 monoclonal de souris clone 1E6 ont été utilisés pour marquer respectivement l'apoE (vert) et la protéine ORF2 (rouge). (barre d'échelle 25 µm).

#### 4.2.2.2. *Étude de la localisation de la protéine ORF2 et de l'apoE en système hétérologue*

Les marquages par immunofluorescence ont été effectués sur des PLC/PRF/5 transfectées en JetPEI® et fixées 24 h post-transfection. La protéine ORF2 est marquée spécifiquement avec un anti-ORF2 monoclonal de souris. L'apoE est quant à elle marquée avec un anti-apoE polyclonal de chèvre purifié (**Fig. 24A et 24B**) ou monoclonal de lapin (**Fig 24B et 24D**). Les marquages par immunofluorescence de la protéine ORF2 et l'apoE sont observables respectivement en rouge et en vert. Le marquage de l'apoE par l'anti-apoE polyclonal de chèvre purifié (**Fig. 24A et 24C**) est plus diffus que celui obtenu avec l'anti-apoE monoclonal de lapin (**Fig. 24B et 24D**). Cependant, les deux marquages sont majoritairement présents en zone périnucléaire de la cellule.

Les **figures 24A et 24B** montrent les 3 marquages distincts mettant en évidence 3 profils d'expression de la protéine ORF2 retrouvés 24 h après fixation des PLC/PRF/5. Un marquage diffus, potentiellement cytoplasmique, de celle-ci est retrouvé majoritairement dans les cellules transfectées. Il peut aussi être retrouvé sous forme de petits amas répartis dans l'ensemble de la cellule ou regroupés aux abords du noyau traduisant une localisation périnucléaire de la protéine ORF2. Très rarement, une saturation du signal a pu être observée dans l'ensemble de la cellule en raison d'une surexpression de la protéine ORF2 mais aucune étude de colocalisation n'a été effectuée sur ce profil.

#### 4.2.2.3. *Comparaison de la colocalisation de l'apoE et la protéine ORF2 entre différentes lignées cellulaires hépatiques*

L'étude de la colocalisation avec l'apoE a été effectuée après marquage par immunofluorescence sur 2 lignées hépatiques différentes : la lignée polyclonale PLC/PRF/5 et la lignée monoclonale Huh7.5. Les cellules ont été transfectées en JetPEI® et fixées 24 h post-transfection.

En lignée Huh7.5, le marquage de la protéine ORF2 est dans 90 % des cas présent aux abords du noyau traduisant une localisation périnucléaire de la protéine. Quelques cellules présentant un marquage diffus sont observables de façon minoritaire (**Fig. 24C et 24D**). Le taux de transfection des Huh7.5 est moins important que celui des PLC/PRF/5. Environ 20 % des PLC/PRF/5 présentent un marquage positif pour la protéine ORF2 contre environ 10 % pour les Huh7.5. Dans ces cellules, l'apoE présente le même marquage qu'au sein des cellules non transfectées.

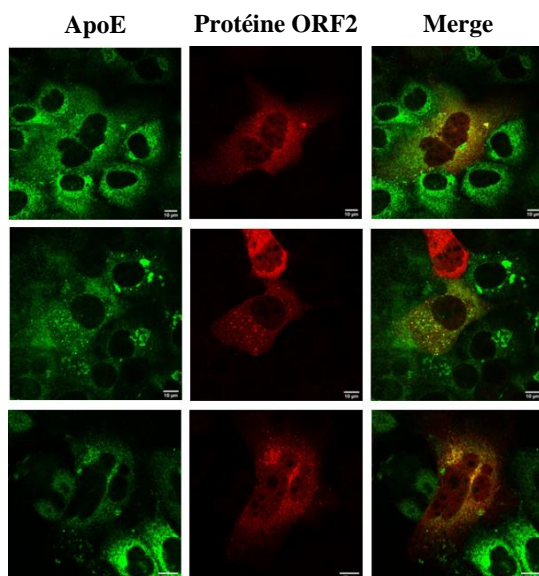
Une acquisition de piles d'images axiales (Z-stack) a été faite sur 10 cellules transfectées présentant les marquages de nos protéines d'intérêt. Trois lamelles ont été étudiées par condition (n=3). La colocalisation de la protéine ORF2 et de l'apoE est traduite par un cumul des deux signaux, respectivement rouge et vert, donnant du jaune. En lignée PLC/PRF/5, la colocalisation des deux protéines a lieu dans la région périnucléaire ou de manière plus étendue dans la cellule. Le CCP moyen est de 0,64 avec l'anti-apoE polyclonal de chèvre et de 0,62 avec l'anti-apoE monoclonal de lapin (**Fig. 24E**). En lignée Huh7.5, la colocalisation est en très grande majorité observée proche du noyau, dans la région périnucléaire. Pour cette lignée, le CCP moyen est de 0,50 lorsque l'apoE est marquée par un anti-apoE polyclonal de chèvre et de 0,53 lorsqu'elle est marquée par un anti-apoE monoclonal de lapin (**Fig. 24E**). Ces données montrent que dans chaque lignée cellulaire le CCP moyen calculé est proche quel que soit l'anticorps permettant le marquage de l'apoE.

**A**

**Cellules PLC/PRF/5 transfectées par le plasmide pCI-ORF2**

Jour 1 post-transfection en JetPEI®

*Marquage avec anti-apoE polyclonal de chèvre purifié*

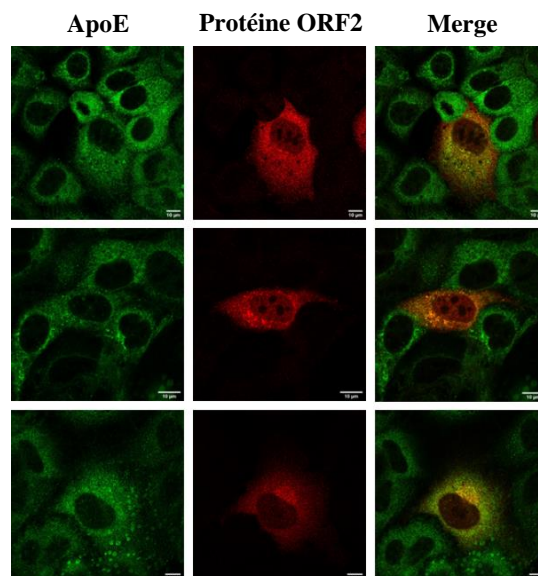


**B**

**Cellules PLC/PRF/5 transfectées par le plasmide pCI-ORF2**

Jour 1 post-transfection en JetPEI®

*Marquage avec anti-apoE monoclonal de lapin*



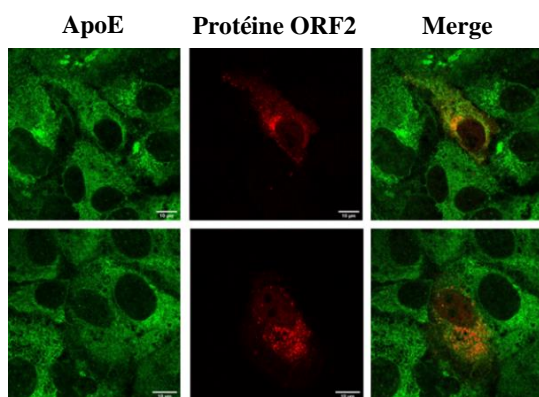


C

Cellules Huh7.5 transfectées par le  
plasmide pCI-ORF2

Jour 1 post-transfection en JetPEI®

Marquage avec anti-apoE polyclonal de  
chèvre purifié

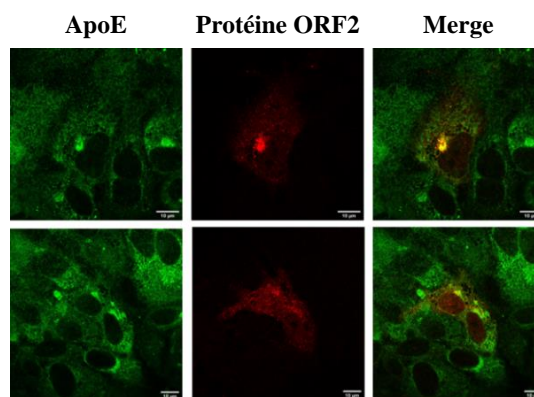


D

Cellules Huh7.5 transfectées par le  
plasmide pCI-ORF2

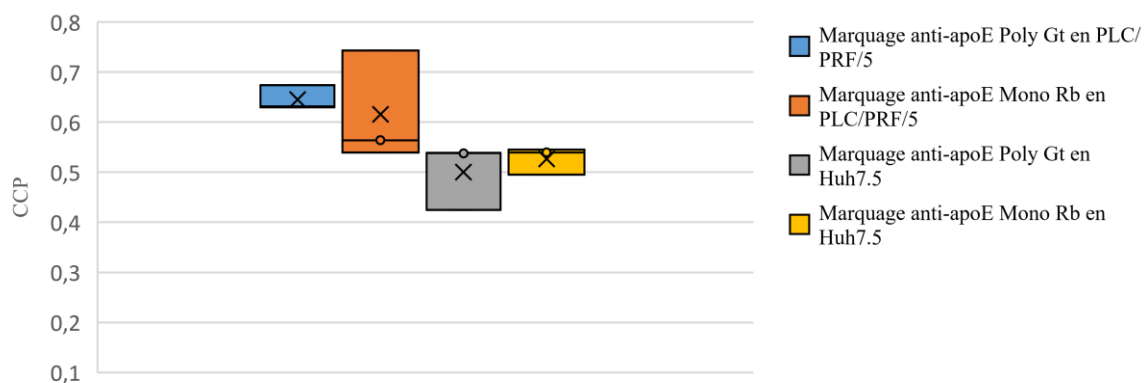
Jour 1 post-transfection en JetPEI®

Marquage avec anti-apoE monoclonal de  
lapin



E

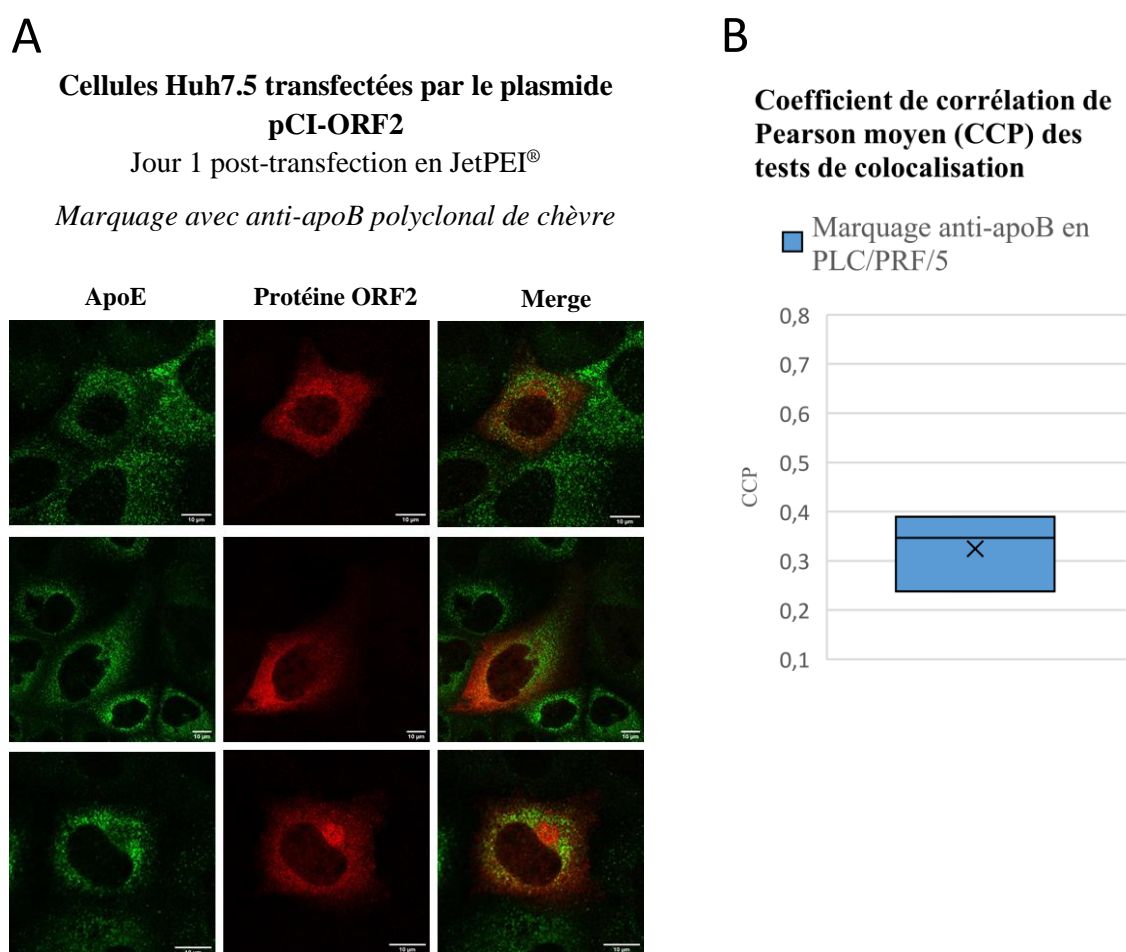
Coefficients de corrélation de Pearson moyens (CCP) des tests de colocalisation



**Figure 24 : Observation en microscopie confocale de la localisation de l'apoE et de la protéine ORF2 en système hétérologue.** Les cellules PLC/PRF/5 (A, B) et Huh7.5 (C, D) ont été transfectées en JetPEI® avec le plasmide pCI-ORF2 et utilisées pour le marquage par immunofluorescence à 24 h post-transfection. Un anti-ORF2 monoclonal de souris clone a permis le marquage de la protéine ORF2 (rouge). Un anti-apoE polyclonal de chèvre purifié (A, C) ou un anti-apoE monoclonal de lapin (B, D) ont été utilisés pour marquer l'apoE (vert). (barre d'échelle 10µm). (D) Le CCP moyen pour la colocalisation de la protéine ORF2 et l'anti-apoE Poly gt est de 0.64, N=3. Le CCP moyen pour la colocalisation de la protéine ORF2 et l'anti-apoE Mono Rb = 0.62, N=3. Le CCP pour la colocalisation de la protéine ORF2 et l'anti-apoE Poly gt en Huh7.5 est de 0.50, N=3. Le CCP moyen pour la colocalisation de la protéine ORF2 et l'anti-apoE Mono Rb en Huh7.5 est de 0.53, N=3. ApoE = apolipoprotéine E. Poly gt = Polyclonal de chèvre purifié. Mono Rb = Monoclonal de lapin.

#### 4.2.2.4. Étude de la colocalisation la protéine ORF2 et de l'apoB en système hétérologue

Des marquages par immunofluorescence de la protéine ORF2 et de l'apoB ont été effectués sur des PLC/PRF/5 transfectées en JetPEI® et fixées 24h post-transfection afin de savoir si la colocalisation avec l'apoE précédemment observée était spécifique de cette apolipoprotéine. La protéine ORF2 (en rouge) est marquée spécifiquement avec un anti-ORF2 monoclonal de souris et l'apoB (en vert) par un anti-apoB polyclonal de chèvre (**Fig. 25A**). Le marquage de l'apoB est ponctiforme au sein des cellules avec une localisation majoritairement périnucléaire pouvant s'étendre au reste de la cellule dans certains cas (**Fig 25A**). Tout comme observé avec les marquages de l'apoE, lorsqu'une cellule transfectée présente un marquage pour l'apoB, un marquage de la protéine ORF2 de faible intensité est observé et inversement. Lorsque les deux protéines sont exprimées de manière équivalente, une colocalisation de nos protéines d'intérêt est observée. La distribution des signaux fluorescents de la protéine ORF2 et l'apoB montre une faible colocalisation traduite par un CCP moyen de 0,32 (**Fig. 25B**).



**Figure 25 : Observation en microscopie confocale de la localisation de l'apoB et de la protéine ORF2 en système hétérologue.** (A) Les cellules PLC/PRF/5 ont été transfectées en JetPEI® avec le

plasmide pCI-ORF2 et utilisées pour le marquage par immunofluorescence 24 h post-transfection. Un anti-apoB polyclonal de chèvre purifié a été utilisé pour marquer l'apoB (vert). Un anti-ORF2 monoclonal de souris clone 1E6 et un anti-apoB polyclonal de chèvre ont été utilisés pour marquer respectivement l'apoB (vert) et la protéine ORF2 (rouge). (barre d'échelle 10  $\mu$ m). **(B)** Le CCP moyen pour la colocalisation de la protéine ORF2 et l'anti-apoB est de 0.32, N=3. ApoB = apolipoprotéine B

### 4.3. Discussion

L'objectif de ce projet était d'étudier l'interaction entre la protéine de capsid du VHE ORF2 et l'apolipoprotéine E en système de culture VHEcc et en système hétérologue exprimant la protéine ORF2 de manière isolée. Des résultats préalablement obtenus par l'équipe INSERM U1259 ont montré une colocalisation de la protéine ORF2 et de l'apoE en système VHEcc permettant d'émettre l'hypothèse que la protéine ORF2 et apoE interagiraient lors de la morphogénèse virale et que l'apoE serait conservée sur les virions sortant de la cellule. Afin de confirmer et de caractériser ces résultats, des tests de co-immunoprécipitation et de colocalisation de l'apoE et de la protéine ORF2 sur du lysat de système VHEcc et de cellules exprimant la protéine ORF2 en système hétérologue ont été réalisés.

Nous avons d'abord cherché à confirmer la co-immunoprécipitation de la protéine ORF2 avec l'apoE, en système hétérologue et en VHEcc, en utilisant différents anticorps capables de capturer l'apoE. En effet, deux anti-apoE polyclonaux ont été utilisés et leur capacité à co-immunoprécipiter la protéine ORF2 a été comparée à celle d'anticorps monoclonaux. L'apoE précipitait en plus grande quantité avec les anticorps polyclonaux anti-apoE. Ces derniers ciblant plusieurs épitopes de l'apoE à la fois, il n'est pas étonnant d'observer une précipitation de la quasi-totalité de l'apoE présente dans le système là où les monoclonaux ne ciblant qu'un seul épitope peuvent être limités par l'accès à cet épitope ou sa disponibilité. En effet, la zone spécifique ciblée par les anticorps monoclonaux peut déjà être engagée dans une interaction, être encombrée stériquement, ou simplement ne pas être accessible à cause du repliement de la protéine selon son association avec d'autres molécules, notamment des lipides. Il est important de noter que malgré la variabilité d'efficacité de précipitation de l'apoE par ces différents anticorps, une co-immunoprécipitation de la protéine ORF2 était observée dans chaque condition à partir du lysat de système VHEcc. Une légère co-immunoprécipitation a également pu être obtenue en système hétérologue, cette fois seulement avec les anti-apoE polyclonaux, mais sans pouvoir être systématiquement reproduite. La masse moléculaire de la

protéine ORF2 précipitée avec l'apoE était de 80 kDa, soit celle de l'isoforme ORF2i décrit dans la littérature (13). Les tests de co-immunoprécipitation indiquent donc que la forme de la protéine ORF2 interagissant avec l'apoE est la celle associée aux particules virales néoformées.

En système VHEcc, les tests de co-immunoprécipitations ont été réalisés 4 jours après électroporation et seulement un jour post-transfection en système hétérologue. Cette différence de temps d'étude pourrait expliquer les difficultés à observer une co-immunoprécipitation en système hétérologue. De plus, les autres protéines virales ne sont pas présentes dans ce système, ce qui pourrait ralentir la cinétique d'interaction des deux protéines. En effet, les protéines ORF1 et ORF3 peuvent jouer un rôle direct de co-facteur à cette interaction (46), ou indirect *via* leurs actions sur d'autres facteurs cellulaires qui pourraient faciliter l'interaction entre l'apoE et la protéine ORF2. Ainsi, il serait nécessaire de pouvoir étudier cette co-immunoprécipitation en ajoutant progressivement les protéines ORF3 et/ou ORF1 afin de voir si son efficacité est augmentée, mais aussi de l'étudier à 48 et 72 h post-transfection.

Nous avons par la suite analysé la colocalisation de nos protéines d'intérêt par des marquages par immunofluorescence suivis d'analyses en microscopie confocale. Dans un premier temps la comparaison de différents agents de transfection était primordiale afin de juger de la meilleure méthode de transfection à utiliser pour la suite du projet. En effet, une toxicité cellulaire importante ou un impact sur l'expression de nos protéines d'intérêt pourrait constituer un biais dans nos résultats. Il a été observé que l'agent de transfection exerçait une influence dans un premier temps sur l'efficacité de transfection. En effet, lorsque la lipofectamine a été utilisée, peu de cellules exprimaient la protéine ORF2 comparé aux deux autres agents de transfection. L'efficacité de transfection était relativement similaire entre le JetPEI® et le FuGENE®. Au-delà de l'efficacité de transfection, un impact a été observé sur le marquage de l'apoE. Suites aux transfections en JetPEI® ou FuGENE®, un marquage intranucléaire de l'apoE a pu être observé, dans les cellules exprimant la protéine ORF2 et même dans les cellules non transfectées. Cette translocation dans le noyau pourrait dans un premier temps être engendré par un stress cellulaire dû à l'emploi des agents de transfection. Il est aussi possible que cette formation de « granules de stress » engendre un marquage non spécifique dans le noyau.

Pour remédier à leur toxicité, les agents de transfections ont été dilués dans le milieu de culture avant d'être déposés sur les cellules, puis le milieu a été changé 6 h après. Finalement, le JetPEI® a été sélectionné en tant qu'agent de transfection pour réaliser nos analyses en raison d'un nombre plus important de cellules transfectées.

Nous avons ensuite étudié la localisation de la protéine ORF2 et de l'apoE au sein de différentes lignées cellulaires hépatiques transfectées en JetPEI® et fixée 24 h après. L'utilisation d'un anticorps polyclonal de chèvre et d'un anticorps monoclonal de lapin ont permis d'effectuer des analyses de colocalisation en marquant par immunofluorescence différents épitopes de l'apoE. L'ensemble de l'apoE marquée par l'anti-apoE polyclonal de chèvre donnait un marquage périnucléaire s'étendant dans la cellule de manière diffuse quelle que soit la lignée utilisée. Avec l'anti-apoE monoclonal de lapin, le signal était localisé majoritairement dans la zone périnucléaire. Comme énoncé précédemment, la différence d'épitopes ciblés par ces anticorps peut expliquer la différence de marquage. Il est aussi facile d'imaginer qu'un anticorps polyclonal puisse engendrer plus de bruit de fond.

Les différents phénotypes d'expression de la protéine ORF2 observés par immunofluorescence, après transfection de la lignée polyclonale PLC/PRF/5, attestent de la présence de différents clones dans cette lignée. En effet, l'observation de phénotypes hétérogènes selon les cellules exprimant la protéine ORF2 serait due au caractère polyclonal de cette lignée. Un marquage diffus était majoritairement observé probablement car le clone cellulaire donnant ce phénotype d'expression était mieux transfectable ou plus présent dans la population cellulaire. En lignée Huh7.5, on observe un marquage de la protéine ORF2 proche du noyau traduisant une expression périnucléaire de cette protéine. Un seul profil d'expression protéique est attendu en lignée ne comportant qu'un seul clone cellulaire, mais les observations ont montré une minorité de cellules Huh7.5 présentant une expression de la protéine ORF2 dans l'ensemble de la cellule. Ceci est probablement lié à une dérive de la lignée à travers le temps. L'expression de la protéine ORF2 semble différente en fonction de la lignée hépatique utilisée. On pourrait se questionner sur le phénotype d'expression en *in vivo* dans les hépatocytes lors d'une infection par le VHE.

En lignée PLC/PRF/5, la distribution des signaux fluorescents de la protéine ORF2 et de l'apoE montre une colocalisation de ces deux protéines dans certaines cellules mais pas toutes. Ceci s'explique entre autres par la diversité clonale de la lignée. Le CCP moyen est de 0,64 lorsque le marquage est effectué avec un anti-apoE polyclonal de chèvre et de 0,62 lorsqu'il est effectué avec un anti-apoE monoclonal de lapin. Ces valeurs situées entre 0,6 et 0,7 montrent une corrélation quel que soit l'épitope de l'apoE ciblé.

Le marquage de l'apoE avec un anti-apoE polyclonal de chèvre en Huh7.5 donne un CCP moyen de 0,50, proche de celui de 0,53 obtenu par un marquage de l'apoE avec un anti-apoE monoclonal de lapin. Les écarts types montrent que les valeurs sont très proches de la valeur

moyenne dû au caractère monoclonal de la lignée et à l'expression identique de la protéine ORF2 et de l'apoE dans toutes les cellules. La valeur du CCP moyen suggère une colocalisation partielle des protéines d'intérêt.

Les cellules ont été détournées afin que seuls les marquages dans la cellule positive à la transfection soient analysés. En effet, de cette manière les cellules voisines exprimant l'apoE constitutivement sont éliminées du calcul du CCP. Pour pallier le bruit de fond engendré par les anticorps utilisés, il serait intéressant d'effectuer une déconvolution sur les images acquises afin d'améliorer la résolution et obtenir un résultat plus fidèle. De même, il serait intéressant de vérifier que la colocalisation ait lieu entre l'apoE et la protéine ORF2i associée aux virions ou circulante dans le milieu intracellulaire, ou si elle comprend aussi les formes sécrétées de la protéine (ORF2s). En effet, dans nos conditions expérimentales il n'est pas possible de faire la différence entre les protéines ORF2s et ORF2i en immunofluorescence, et la protéine ORF2s ainsi que le virus complet utilisent les voies de sécrétions cellulaires. D'autres outils seraient nécessaires afin de pouvoir déterminer quelle forme colocalise avec l'apoE.

Ainsi, plusieurs constructions ont été débutées au cours de ce projet afin de réaliser une mutation du 1<sup>er</sup> codon *Start* sur la séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine ORF2 afin de n'exprimer que la forme ORF2i, mais aussi d'ajouter des étiquettes HA (*Human influenza hemagglutinin*) en N-terminal et C-terminal de la protéine ORF2. L'utilisation d'un anticorps anti-HA pourrait permettre de faciliter la détection de la protéine virale lors de nos tests de co-immunoprécipitation ou d'analyse de colocalisation. Cependant, l'introduction de cette étiquette sur la protéine pourrait agir sur son activité et sa distribution intracellulaire. Aussi, cette étiquette pourrait ne pas être détectable par les anticorps si les extrémités de la protéine sont repliées au sein de sa structure tridimensionnelle, ce qui ne permettrait pas d'effectuer de marquage par immunofluorescence. Ces constructions seront testées ultérieurement.

Environ 20 % des cellules PLC/PRF/5 été transfectées, cette proportion était encore plus faible en Huh7.5. Il est aussi possible qu'à 24 h post-transfection, les cellules transfectées n'aient pas produit assez de protéine ORF2 pour obtenir un signal fort en immunofluorescence, ne facilitant pas leur détection. Il serait intéressant de réaliser ces marquages à 48 ou 72 h post-transfection pour savoir si le temps post-transfection influence sur la quantité de cellules marquées. Aussi, d'autres agents de transfection autres que les trois ayant été testés dans ce projet pourraient être plus efficaces, mais leur coût est souvent limitant.

Les cellules exprimant la protéine ORF2 expriment très peu ou faiblement l'apoE. Il est possible que la forte expression de la protéine ORF2 dans les cellules encombre l'interaction entre l'anticorps et l'apoE, ou que la quantité d'apoE exprimée soit affectée par l'expression de

la protéine ORF2. Cependant, dans les Western-Blots réalisés, la quantité d'apoE semblait similaire entre les conditions infectées et non infectées. Il serait possible de réaliser une étude plus poussée de l'expression d'apoE dans ces conditions pour savoir si la protéine ORF2 aurait un impact sur cette expression.

Notre étude pose donc les premières bases d'une interaction entre le VHE et l'apoE. Dans le cas d'une confirmation de cette interaction, le VHE serait le troisième virus des hépatites à interagir avec l'apoE avec le VHB et le VHC (305,306). Nous avons aussi voulu vérifier si seulement l'apoE pouvait interagir avec ce virus ou si d'autres apolipoprotéines pourraient aussi être engagées dans le cycle cellulaire du VHE. Des marquages par immunofluorescence de la protéine ORF2 et de l'apoB ont donc été réalisés afin de vérifier si une colocalisation serait observable. En PLC/PRF/5 fixées 24 h post-transfection avec le pCI-ORF2, le marquage de l'apoB se présentait plus ponctiforme et localisé que celui de l'apoE. La valeur du CCP moyen était de 0,32, indiquant une faible corrélation des signaux. L'absence de colocalisation de la protéine ORF2 avec l'apoB concorde avec l'hypothèse que la protéine ORF2 interagit spécifiquement avec l'apoE.

## **Conclusion**

Le VHE peut être retrouvé sous forme nue dans la bile et les fèces, ou entourée d'une bicouche lipidique d'origine exosomale dans le sérum des patients infectés ou le surnageant de culture cellulaire (VHEcc). Son ARN génomique de polarité positive code pour 3 protéines différentes dont la protéine de capsid ORF2. Il est probable que le virus interagisse *in vivo* avec un ou plusieurs co-facteurs permettant entre autres sa liaison à son récepteur cellulaire.

Il existe 8 géotypes différents du virus de l'hépatite E dont 4 pouvant infecter l'humain par transmission oro-fécale ou zoonotique. L'infection est généralement asymptomatique et spontanément résolutive mais le taux de mortalité reste tout de même important chez les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés en raison notamment d'un affaiblissement de leur système immunitaire.

Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique contre l'infection par le VHE, d'où la nécessité d'affiner la compréhension de son cycle de multiplication. L'apolipoprotéine E, synthétisée par le foie, contribue au métabolisme lipidique et pourrait être impliquée dans la

morphogénèse du virus de l'hépatite E. En effet, des études préliminaires menées par les membres de l'équipe ont montré son interaction avec la protéine ORF2 du VHE. L'objectif de ce projet de thèse était de caractériser cette interaction au sein de différentes lignées cellulaires hépatiques.

Lors de cette étude, la colocalisation l'apoE et de la protéine ORF2 préalablement observée a été confirmée par une co-immunoprécipitation positive de nos protéines d'intérêt en système exprimant le génome complet du VHE et semble indiquer que ce résultat serait reproductible en système exprimant la protéine ORF2 isolée. Cette colocalisation a été démontrée avec différents anticorps ciblant l'apoE, appuyant sur le caractère spécifique de cette interaction. Une colocalisation de ces deux protéines dans la région périnucléaire a été observée dans deux lignées hépatocytaires différentes avec des anticorps monoclonaux et polyclonaux et n'a pas été observée avec l'apoB.

Pour poursuivre ce projet, différents temps post-transfection du plasmide pCI-ORF2 seront testés afin de vérifier si la co-IP peut être obtenue et confirmer dans ce système. De plus, l'utilisation d'une construction permettant l'expression isolée de la protéine ORF2i permettra de continuer la caractérisation de l'interaction entre VHE et apoE. Il sera aussi intéressant d'étudier la colocalisation et la co-IP de la protéine ORF3 avec l'apoE pour savoir si la deuxième protéine structurale du VHE pourrait être engagée dans cette interaction. Enfin, il serait intéressant de renouveler cette étude en exprimant les autres génotypes du VHE infectant l'Homme.

L'identification de l'interaction entre l'apoE et le VHE permet d'ajouter un co-facteur cellulaire participant au cycle cellulaire du virus, et pourrait potentiellement, par la suite, permettre d'identifier une cible thérapeutique spécifique pour combattre l'infection par le VHE.



## Références bibliographiques

1. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* oct 2011;161(1):3-14.
2. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med.* juin 1980;68(6):818-24.
3. Khuroo MS. Hepatitis E and Pregnancy: An Unholy Alliance Unmasked from Kashmir, India. *Viruses.* 9 juill 2021;13(7):1329.
4. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol.* 21 août 2016;22(31):7030-45.
5. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *INT.* 1983;20(1):23-31.
6. Hepatitis E Virus. *Transfus Med Hemother.* févr 2009;36(1):40-7.
7. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 sept 1992;89(17):8259-63.
8. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology.* 2003;13(3):145-54.
9. Reyes GR, Purdy MA, Kim J, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the Virus Responsible for Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. *Science.* 16 mars 1990;247(4948):1335-9.
10. Berke T, Matson DO. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol.* 2000;145(7):1421-36.
11. Fauquet CM, Mayo MA. The 7th ICTV Report. *Arch Virol.* 1 janv 2001;146(1):189-94.
12. Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *Journal of General Virology.* 98(11):2645-6.
13. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier JC, Saliou JM, Ankavay M, et al. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology.* janv 2018;154(1):211-223.e8.
14. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* [Internet]. 5 août 2016 [cité 19 mai 2021];8(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4997574/>
15. Himmelsbach K, Bender D, Hildt E. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. *Emerging Microbes & Infections.* 1 déc 2018;7.
16. Nan Y, Zhang YJ. Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cité 12 mai 2021];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01419/full>
17. LeDesma R, Nimgaonkar I, Ploss A. Hepatitis E Virus Replication. *Viruses.* 6 août 2019;11(8):719.
18. Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, et al. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol.* juill 2001;75(14):6249-55.
19. Shafat Z, Hamza A, Islam A, Al-Dosari MS, Parvez MK, Parveen S. Structural exploration of Y-domain reveals its essentiality in HEV pathogenesis. *Protein Expression and Purification.* 1 nov 2021;187:105947.
20. Saraswat S, Chaudhary M, Sehgal D. Hepatitis E Virus Cysteine Protease Has Papain Like Properties Validated by in silico Modeling and Cell-Free Inhibition Assays. *Front Cell Infect Microbiol.* 23 janv 2020;9:478.
21. Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE. The Hepatitis E Virus Polyproline Region Is Involved in Viral Adaptation. *PLoS One.* 24 avr 2012;7(4):e35974.
22. Muñoz-Chimeno M, Cenalmor A, Garcia-Lugo MA, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Avellon A. Proline-Rich Hypervariable Region of Hepatitis E Virus: Arranging the Disorder. *Microorganisms.* 15 sept 2020;8(9):E1417.
23. Pudupakam RS, Kenney SP, Córdoba L, Huang YW, Dryman BA, Leroith T, et al. Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol.* oct 2011;85(19):10031-40.
24. Karpe YA, Lole KS. NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol.* avr 2010;84(7):3595-602.
25. Mhaindarkar V, Sharma K, Lole KS. Mutagenesis of hepatitis E virus helicase motifs: effects on enzyme activity. *Virus Res.* 22 janv 2014;179:26-33.
26. Frick DN, Lam AMI. Understanding Helicases as a Means of Virus Control. *Curr Pharm Des.* 2006;12(11):1315-38.
27. Osterman A, Stellberger T, Gebhardt A, Kurz M, Friedel CC, Uetz P, et al. The Hepatitis E virus intraviral interactome. *Sci Rep.* 14 oct 2015;5:13872.
28. Pingale KD, Kanade GD, Karpe YAY 2019. Hepatitis E virus polymerase binds to IFIT1 to protect the viral RNA from IFIT1-mediated translation inhibition. *Journal of General Virology.* 100(3):471-83.

29. Kanade GD, Pingale KD, Karpe YA. Protein Interactions Network of Hepatitis E Virus RNA and Polymerase With Host Proteins. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2019 [cité 6 avr 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02501>
30. 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.* juin 2006;80(12):5919-26.
31. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 1 avr 2016;12(4):e1005521.
32. Li SW, Zhang J, He ZQ, Gu Y, Liu RS, Lin J, et al. Mutational Analysis of Essential Interactions Involved in the Assembly of Hepatitis E Virus Capsid \*. *Journal of Biological Chemistry.* 4 févr 2005;280(5):3400-6.
33. Xing L, Li TC, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, et al. Structure of Hepatitis E Virion-sized Particle Reveals an RNA-dependent Viral Assembly Pathway. *J Biol Chem.* 22 oct 2010;285(43):33175-83.
34. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *PNAS.* 4 août 2009;106(31):12986-91.
35. He S, Miao J, Zheng Z, Wu T, Xie M, Tang M, et al. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *Journal of General Virology.* 89(1):245-9.
36. Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol.* juin 2000;74(12):5548-55.
37. Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M, Bawohl M, Honcharova-Biletska H, Kreutzer S, et al. Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver. *Journal of Hepatology.* 1 sept 2017;67(3):471-9.
38. Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou JM, Wychowski C, Saas L, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep* [Internet]. 18 avr 2019 [cité 9 mai 2021];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6472401/>
39. Xu M, Behloul N, Wen J, Zhang J, Meng J. Role of asparagine at position 562 in dimerization and immunogenicity of the hepatitis E virus capsid protein. *Infection, Genetics and Evolution.* 1 janv 2016;37:99-107.
40. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutational Analysis of Glycosylation, Membrane Translocation, and Cell Surface Expression of the Hepatitis E Virus ORF2 Protein. *J Virol.* mai 1999;73(5):4074-82.
41. Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* avr 1990;3(5):433-42.
42. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 mai 2018;115(18):4773-8.
43. Tyagi S, Surjit M, Roy AK, Jameel S, Lal SK. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem.* 9 juill 2004;279(28):29308-19.
44. Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 janv 2017;114(5):1147-52.
45. Chandra V, Holla P, Ghosh D, Chakrabarti D, Padigaru M, Jameel S. The Hepatitis E Virus ORF3 Protein Regulates the Expression of Liver-Specific Genes by Modulating Localization of Hepatocyte Nuclear Factor 4. *PLoS One.* 20 juill 2011;6(7):e22412.
46. Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The Phosphorylated Form of the ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Interacts with Its Non-glycosylated Form of the Major Capsid Protein, ORF2\*. *Journal of Biological Chemistry.* 21 juin 2002;277(25):22759-67.
47. Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang YJ. The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 Product Interacts with Microtubules and Interferes with Their Dynamics. *J Virol.* juill 2009;83(13):6375-82.
48. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol.* déc 1997;71(12):9045-53.
49. Simpson C, Yamauchi Y. Microtubules in Influenza Virus Entry and Egress. *Viruses.* 17 janv 2020;12(1):117.
50. Miranda-Saksena M, Denes CE, Diefenbach RJ, Cunningham AL. Infection and Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Neurons: Role of the Cytoskeleton. *Viruses.* 23 févr 2018;10(2):92.
51. Dong C, Zafrullah M, Mixson-Hayden T, Dai X, Liang J, Meng J, et al. Suppression of interferon- $\alpha$  signaling by hepatitis E virus. *Hepatology.* 2012;55(5):1324-32.
52. Lei Q, Li L, Zhang S, Li T, Zhang X, Ding X, et al. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. *Sci Rep* [Internet]. 5 juin 2018 [cité 16 mai 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5988675/>
53. He M, Wang M, Huang Y, Peng W, Zheng Z, Xia N, et al. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF- $\kappa$ B Signaling via TRADD and RIP1. *Sci Rep.* 8 juin 2016;6:27597.

54. HEV ORF3 downregulates CD14 and CD64 to impair macrophages phagocytosis through inhibiting JAK/STAT pathway - Lei - 2019 - Journal of Medical Virology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 19 mai 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25400>
55. Xu K, Guo S, Zhao T, Zhu H, Jiao H, Shi Q, et al. Transcriptome Analysis of HepG2 Cells Expressing ORF3 from Swine Hepatitis E Virus to Determine the Effects of ORF3 on Host Cells. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1648030.
56. Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L, Oechslin N, Mauron J, Matter M, et al. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLoS Pathog* [Internet]. 10 déc 2018 [cité 17 mai 2021];14(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307819/>
57. Lambert C, Prange R. Dual Topology of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein: DETERMINANTS INFLUENCING POST-TRANSLATIONAL PRE-S TRANSLOCATION \*. *Journal of Biological Chemistry*. 22 juin 2001;276(25):22265-72.
58. Gouttenoire J, Montserret R, Paul D, Castillo R, Meister S, Bartenschlager R, et al. Aminoterminal Amphipathic  $\alpha$ -Helix AH1 of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Possesses a Dual Role in RNA Replication and Virus Production. *PLOS Pathogens*. 13 nov 2014;10(11):e1004501.
59. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *Journal of General Virology*. 92(2):269-78.
60. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol*. 21 févr 2012;22(4):R116-20.
61. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*. 18 avr 2013;496(7445):367-71.
62. Lambert C, Döring T, Prange R. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol*. sept 2007;81(17):9050-60.
63. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, et al. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One*. 11 janv 2011;6(1):e14517.
64. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med*. déc 2001;7(12):1313-9.
65. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 5 oct 2001;107(1):55-65.
66. Glitscher M, Hildt E. Hepatitis E virus egress and beyond – the manifold roles of the viral ORF3 protein. *Cellular Microbiology*. n/a(n/a):e13379.
67. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, et al. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol*. 5 août 2008;153(9):1703.
68. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol*. 15 nov 2017;91(22).
69. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, et al. Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J Clin Microbiol*. avr 2010;48(4):1112-25.
70. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, et al. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol*. 1 mai 2014;159(5):979-91.
71. Qi Y, Zhang F, Zhang L, Harrison TJ, Huang W, Zhao C, et al. Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLOS ONE*. 10 juill 2015;10(7):e0132503.
72. Okamoto H. [Cell culture system for hepatitis E virus]. *Uirusu*. juin 2010;60(1):93-104.
73. Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu Rev Virol*. nov 2014;1(1):539-60.
74. Walker CM. Adaptive Immune Responses in Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. sept 2019;9(9):a033472.
75. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol*. 28 mars 2016;90(8):4232-42.
76. Costafreda MI, Abbasi A, Lu H, Kaplan G. Exosome mimicry by an HAVCR1/NPC1 pathway of endosomal fusion mediates hepatitis A virus infection. *Nat Microbiol*. sept 2020;5(9):1096-106.
77. Bile salts: structure, function, synthesis from cholesterol [Internet]. Tuscany Diet. 2016 [cité 19 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.tuscany-diet.net/2016/08/14/bile-salts-definition-function-synthesis/>
78. Todt D, Friesland M, Moeller N, Praditya D, Kinast V, Brüggemann Y, et al. Robust hepatitis E virus infection and transcriptional response in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 janv 2020;117(3):1731-41.
79. Oechslin N, Moradpour D, Gouttenoire J. On the Host Side of the Hepatitis E Virus Life Cycle. *Cells*. mai 2020;9(5):1294.
80. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci*. 1 juin 2019;226:156-63.

81. Kohli E, Causse S, Baverel V, Dubrez L, Borges-Bonan N, Demidov O, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperones in Viral Infection: Therapeutic Perspectives. *Microbiol Mol Biol Rev.* 85(4):e00035-21.
82. Choukhi A, Ung S, Wychowski C, Dubuisson J. Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins. *Journal of Virology.* 1 mai 1998;72(5):3851-8.
83. Grp78/Bip facilitates the attachment/entry of the hepatitis E virus capsid protein to host cells--*Journal of Microbes and Infection* 2007年02期 [Internet]. [cité 9 nov 2021]. Disponible sur: [https://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-WSWG200702006.htm](https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-WSWG200702006.htm)
84. Screening of Protein Interacting with Hepatitis E Virus Nucleoprotein in HepG2 Cell--*Chinese Journal of Virology* 2006年05期 [Internet]. [cité 9 nov 2021]. Disponible sur: [https://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-BDXB200605000.htm](https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-BDXB200605000.htm)
85. D'Souza AA, Devarajan PV. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — Strategies and applications. *Journal of Controlled Release.* 10 avr 2015;203:126-39.
86. Becker S, Spiess M, Klenk HD 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *Journal of General Virology.* 76(2):393-9.
87. Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Göttke U, Kracke A, Mages J, et al. Hepatitis A Virus-Specific Immunoglobulin A Mediates Infection of Hepatocytes with Hepatitis A Virus via the Asialoglycoprotein Receptor. *J Virol.* déc 2000;74(23):10950-7.
88. Zhang X, Lin S mei, Chen T yan, Liu M, Ye F, Chen Y ru, et al. Asialoglycoprotein receptor interacts with the preS1 domain of hepatitis B virus in vivo and in vitro. *Arch Virol.* 1 avr 2011;156(4):637-45.
89. Yang J, Wang F, Tian L, Su J, Zhu X, Lin L, et al. Fibronectin and asialoglycoprotein receptor mediate hepatitis B surface antigen binding to the cell surface. *Arch Virol.* 1 juin 2010;155(6):881-8.
90. Yang J, Bo XC, Ding XR, Dai JM, Zhang ML, Wang XH, et al. Antisense oligonucleotides targeted against asialoglycoprotein receptor 1 block human hepatitis B virus replication. *Journal of Viral Hepatitis.* 2006;13(3):158-65.
91. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the Asialoglycoprotein Receptor in Binding and Entry of Hepatitis C Virus Structural Proteins in Cultured Human Hepatocytes. *Journal of Virology.* 1 janv 2003;77(1):546-59.
92. Zhang L, Tian Y, Wen Z, Zhang F, Qi Y, Huang W, et al. Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2. *Journal of Medical Virology.* 2016;88(12):2186-95.
93. Boyer PD. A Research Journey with ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry.* 18 oct 2002;277(42):39045-61.
94. Chi SL, Pizzo SV. Cell surface F1Fo ATP synthase: A new paradigm? *Annals of Medicine.* 1 janv 2006;38(6):429-38.
95. Yavlovich A, Viard M, Zhou M, Veenstra TD, Wang JM, Gong W, et al. Ectopic ATP synthase facilitates transfer of HIV-1 from antigen-presenting cells to CD4+ target cells. *Blood.* 9 août 2012;120(6):1246-53.
96. Gorai T, Goto H, Noda T, Watanabe T, Kozuka-Hata H, Oyama M, et al. F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *PNAS.* 20 mars 2012;109(12):4615-20.
97. Fongsaran C, Jirakanwisal K, Kuadkitkan A, Wikan N, Wintachai P, Thepparit C, et al. Involvement of ATP synthase  $\beta$  subunit in chikungunya virus entry into insect cells. *Arch Virol.* 1 déc 2014;159(12):3353-64.
98. Ren L, Ding S, Song Y, Li B, Ramanathan M, Co J, et al. Profiling of rotavirus 3'UTR-binding proteins reveals the ATP synthase subunit ATP5B as a host factor that supports late-stage virus replication. *J Biol Chem.* 12 avr 2019;294(15):5993-6006.
99. Liu WJ, Chang YS, Chen PY, Wu SP. F1 ATP synthase  $\beta$  subunit is a putative receptor involved in white spot syndrome virus infection in shrimp by binding with viral envelope proteins VP51B and VP150. *Developmental & Comparative Immunology.* 1 janv 2021;114:103810.
100. Ahmed Z, Holla P, Ahmad I, Jameel S. The ATP synthase subunit  $\beta$  (ATP5B) is an entry factor for the hepatitis E virus [Internet]. 2016 juin [cité 13 nov 2021] p. 060434. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/060434v1>
101. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biology.* 1 juin 2007;8(5):215.
102. Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, et al. Integrin  $\alpha 3$  is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology.* 1 oct 2019;536:119-24.
103. Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *Am J Pathol.* mai 1993;142(5):1483-92.
104. Volpes R, Van Den Oord JJ, Desmet VJ. Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. *Gastroenterology.* 1 juill 1991;101(1):200-6.
105. Beaulieu JF. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Journal of Cell Science.* 1 juill 1992;102(3):427-36.
106. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* juill 2011;3(7):a004952.

107. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell*. 1 oct 1999;99(1):13-22.
108. Artpradit C, Robinson LN, Gavrilov BK, Rurak TT, Ruchirawat M, Sasisekharan R. Recognition of heparan sulfate by clinical strains of dengue virus serotype 1 using recombinant subviral particles. *Virus Res*. sept 2013;176(0):69-77.
109. Barth H, Schäfer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate \*. *Journal of Biological Chemistry*. 17 oct 2003;278(42):41003-12.
110. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *J Virol*. déc 2009;83(24):12714-24.
111. Das A, Maury W, Lemon SM. TIM1 (HAVCR1): an Essential “Receptor” or an “Accessory Attachment Factor” for Hepatitis A Virus? *J Virol*. 15 mai 2019;93(11):e01793-18.
112. Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, Monahan S, et al. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog*. mars 2013;9(3):e1003232.
113. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S. Hepatitis E Virus Enters Liver Cells Through a Dynamin-2, Clathrin and Membrane Cholesterol-Dependent Pathway. *Traffic*. 2015;16(4):398-416.
114. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Viral Hepatitis*. 2012;19(6):436-48.
115. Full article: Viral entry, lipid rafts and caveosomes [Internet]. [cité 25 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890510011976>
116. Jin C, Che B, Guo Z, Li C, Liu Y, Wu W, et al. Single virus tracking of Ebola virus entry through lipid rafts in living host cells. *Biosaf Health*. mars 2020;2(1):25-31.
117. Lu Y, Liu DX, Tam JP. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2 mai 2008;369(2):344-9.
118. Ding Q, Nimgaonkar I, Archer NF, Bram Y, Heller B, Schwartz RE, et al. Identification of the Intragenomic Promoter Controlling Hepatitis E Virus Subgenomic RNA Transcription. *mBio*. 8 mai 2018;9(3):e00769-18.
119. Pingale KD, Kanade GD, Karpe YA. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins Participate in Hepatitis E Virus Replication. *Journal of Molecular Biology*. 27 mars 2020;432(7):2369-87.
120. Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*. août 2010;16(8):1449-62.
121. Surjit M, Jameel S, Lal SK. The ORF2 Protein of Hepatitis E Virus Binds the 5' Region of Viral RNA. *J Virol*. janv 2004;78(1):320-8.
122. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, et al. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *Journal of General Virology*. 92(12):2838-48.
123. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Journal of General Virology*. 95(10):2166-75.
124. Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 juin 2007;104(24):10205-10.
125. Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, et al. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*. 20 janv 2012;422(2):377-85.
126. Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, et al. Human Herpesvirus-6 Induces MVB Formation, and Virus Egress Occurs by an Exosomal Release Pathway. *Traffic*. oct 2008;9(10):1728-42.
127. Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Research*. 1 oct 2011;161(1):65-77.
128. Ju X, Ding Q. Hepatitis E Virus Assembly and Release. *Viruses*. 9 juin 2019;11(6).
129. Waqar S, Sharma B, Koirala J. Hepatitis E. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 19 avr 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532278/>
130. Hepatitis E [Internet]. [cité 15 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
131. Wu C, Wu X, Xia J. Hepatitis E virus infection during pregnancy. *Virology journal*. 10 juin 2020;17:73.
132. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterology*. 1 mai 2012;142(6):1388-1397.e1.
133. Hépatite E [Internet]. [cité 12 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/hepatites-virales/hepatite-e>
134. L'hépatite E - Ministère des Solidarités et de la Santé [Internet]. [cité 12 avr 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/article/l-hepatite-e>
135. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *Journal of Hepatology*. mars 2008;48(3):494-503.
136. Hughes JM, Wilson ME, Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The Two Faces of Hepatitis E Virus. *Clinical Infectious Diseases*. 1 août 2010;51(3):328-34.

137. Nicolini LAP, Stoney RJ, Della Vecchia A, Grobusch M, Gautret P, Angelo KM, et al. Travel-related hepatitis E: a two-decade GeoSentinel analysis. *Journal of Travel Medicine*. 9 nov 2020;27(7):taaa132.
138. Kamar N, Izopet J, Dalton HR. Chronic Hepatitis E Virus Infection and Treatment. *J Clin Exp Hepatol*. juin 2013;3(2):134-40.
139. Fousekis FS, Mitselos IV, Christodoulou DK. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus: An overview. *Clin Mol Hepatol*. janv 2020;26(1):16-23.
140. Mallet V, Sberro-Soussan R, Roque-Afonso AM, Vallet-Pichard A, Deau B, Portal A, et al. Transmission of Hepatitis E Virus With Plasma Exchange in Kidney Transplant Recipients: A Retrospective Cohort Study. *Transplantation*. août 2018;102(8):1351-7.
141. Riveiro-Barciela M, Sauleda S, Quer J, Salvador F, Gregori J, Pirón M, et al. Red blood cell transfusion-transmitted acute hepatitis E in an immunocompetent subject in Europe: a case report. *Transfusion*. 2017;57(2):244-7.
142. Meng XJ. Expanding Host Range and Cross-Species Infection of Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog*. 4 août 2016;12(8):e1005695.
143. Nguyen HT, Shukla P, Torian U, Faulk K, Emerson SU. Hepatitis E Virus Genotype 1 Infection of Swine Kidney Cells In Vitro Is Inhibited at Multiple Levels. *J Virol*. janv 2014;88(2):868-77.
144. Tian D, Yugo DM, Kenney SP, Lynn Heffron C, Opriessnig T, Karuppannan AK, et al. Dissecting the potential role of hepatitis E virus ORF1 nonstructural gene in cross-species infection by using intergenotypic chimeric viruses. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(12):3563-71.
145. Chatterjee SN, Devhare PB, Pingle SY, Paingankar MS, Arankalle VA, Lole KSY 2016. Hepatitis E virus (HEV)-1 harbouring HEV-4 non-structural protein (ORF1) replicates in transfected porcine kidney cells. *Journal of General Virology*. 97(8):1829-40.
146. Lin J, Norder H, Uhlhorn H, Belák S, Widén F. Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J Gen Virol*. mars 2014;95(Pt 3):557-70.
147. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Research*. 1 juin 2011;158(1):116-23.
148. Huang FF, Haqshenas G, Shivaprasad HL, Guenette DK, Woolcock PR, Larsen CT, et al. Heterogeneity and Seroprevalence of a Newly Identified Avian Hepatitis E Virus from Chickens in the United States. *J Clin Microbiol*. nov 2002;40(11):4197-202.
149. Zhang X, Bilic I, Troxler S, Hess M. Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds. *Virus Research*. 15 janv 2017;228:75-8.
150. Johne R, Dremsek P, Kindler E, Schielke A, Plenge-Bönig A, Gregersen H, et al. Rat hepatitis E virus: Geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infection, Genetics and Evolution*. 1 juill 2012;12(5):947-56.
151. Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S, et al. Hepatitis E Virus in Rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis*. déc 2011;17(12):2216-22.
152. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol*. sept 2012;86(17):9134-47.
153. Nelson KE, Labrique AB, Kmush BL. Epidemiology of Genotype 1 and 2 Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. juin 2019;9(6):a031732.
154. Protect yourself from monsoon prevalent Hepatitis E! [Internet]. *Express Healthcare*. 2019 [cité 15 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.expresshealthcare.in/blogs/guest-blogs-healthcare/protect-yourself-from-monsoon-prevalent-hepatitis-e/412901/>
155. Bagulo H, Majekodunmi AO, Welburn SC. Hepatitis E in Sub Saharan Africa – A significant emerging disease. *One Health*. 20 oct 2020;11:100186.
156. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *The Lancet*. 30 juin 2012;379(9835):2477-88.
157. Kumar Acharya S, Kumar Sharma P, Singh R, Kumar Mohanty S, Madan K, Kumar Jha J, et al. Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *Journal of Hepatology*. 1 mars 2007;46(3):387-94.
158. Kamar N, Pischke S. Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. juill 2019;9(7):a031872.
159. Chaussade H, Rigaud E, Allix A, Carpentier A, Touzé A, Delzescaux D, et al. Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *Journal of Clinical Virology*. 1 nov 2013;58(3):504-8.
160. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries. *J Clin Microbiol*. janv 2002;40(1):117-22.
161. Traoré KA, Ouoba JB, Huot N, Rogée S, Dumarest M, Traoré AS, et al. Hepatitis E Virus Exposure is Increased in Pork Butchers from Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 9 déc 2015;93(6):1356-9.
162. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 janv 2014;27(1):139-65.

163. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytily P, Gronert A, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012;55(3):695-708.
164. Abravanel F, Barragué H, Dörr G, Sauné K, Péron JM, Alric L, et al. Conventional and innate lymphocytes response at the acute phase of HEV infection in transplanted patients. *Journal of Infection*. 1 juin 2016;72(6):723-30.
165. Rapports d'activité « Centre National de Référence VHA VHE [Internet]. [cité 4 mai 2022]. Disponible sur: <http://www.cnrvha-vhe.org/?cat=10>
166. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. oct 2014;95(Pt 10):2223-32.
167. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, et al. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *Journal of General Virology*. 92(4):902-8.
168. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, et al. New Hepatitis E Virus Genotype in Camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*. juin 2014;20(6):1044-8.
169. Lee GH, Tan BH, Teo EY, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*. 1 févr 2016;150(2):355-357.e3.
170. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Cao KY, Wernery U, Schountz T, et al. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis*. déc 2016;22(12):2219-21.
171. Nishizawa T, Takahashi M, Tsatsalt-Od B, Nyamdavaa K, Dulmaa N, Osorjin B, et al. Identification and a full genome analysis of novel camel hepatitis E virus strains obtained from Bactrian camels in Mongolia. *Virus Research*. 2 juill 2021;299:198355.
172. Li T, Bai H, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, et al. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. *Hepatol Commun*. 30 nov 2018;3(1):160-72.
173. Williams TPE, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *J Clin Microbiol*. sept 2001;39(9):3040-6.
174. Marion O, Lhomme S, Nayrac M, Dubois M, Pucelle M, Requena M, et al. Hepatitis E virus replication in human intestinal cells. *Gut*. mai 2020;69(5):901-10.
175. Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, et al. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol* [Internet]. 5 févr 2019 [cité 6 janv 2021];93(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6364016/>
176. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. In: *Fields virology*. 6th éd. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 2248-58.
177. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *Journal of General Virology*. 88(3):903-11.
178. Prabhu SB, Gupta P, Durgapal H, Rath S, Gupta SD, Acharya SK, et al. Study of cellular immune response against Hepatitis E Virus (HEV). *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18(8):587-94.
179. Srivastava R, Aggarwal R, Bhagat MR, Chowdhury A, Naik S. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *Journal of Viral Hepatitis*. 2008;15(12):910-6.
180. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, Alling DW, Emerson SU, Banerjee K, et al. Age-Specific Prevalence of Antibodies to Hepatitis A and E Viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 févr 1995;171(2):447-50.
181. Buti M, Plans P, Domínguez A, Jardi R, Frias FR, Esteban R, et al. Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Children in the Northeast of Spain. *Clin Vaccine Immunol*. avr 2008;15(4):732-4.
182. Hartl J, Kreuels B, Polywka S, Addo M, Luethgehetmann M, Dandri M, et al. Comparison of autochthonous and imported cases of hepatitis A or hepatitis E. *Z Gastroenterol*. juill 2015;53(7):639-43.
183. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55(4):988-97.
184. Wedemeyer H, Pischke S. Hepatitis E vaccination—is HEV 239 the breakthrough? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. janv 2011;8(1):8-10.
185. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 11 sept 2010;376(9744):895-902.
186. Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *Journal of Medical Virology*. 2005;76(3):341-9.
187. Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, et al. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res*. déc 2006;36(4):301-7.

188. Jebblaoui A, Haim-Boukoba S, Marchadier E, Mokhtari C, Roque-Afonso AM. Genotype 4 Hepatitis E Virus in France: An Autochthonous Infection With a More Severe Presentation. *Clinical Infectious Diseases*. 15 août 2013;57(4):e122-6.
189. Murata K, Kang JH, Nagashima S, Matsui T, Karino Y, Yamamoto Y, et al. IFN- $\lambda$ 3 as a host immune response in acute hepatitis E virus infection. *Cytokine*. 1 janv 2020;125:154816.
190. Micas F, Suin V, Péron JM, Scholtes C, Tuaillon E, Vanwolleghem T, et al. Analyses of Clinical and Biological Data for French and Belgian Immunocompetent Patients Infected With Hepatitis E Virus Genotypes 4 and 3. *Front Microbiol*. 14 avr 2021;12:645020.
191. Fulminant Hepatitis - Hepatic and Biliary Disorders [Internet]. MSD Manual Professional Edition. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/professional/hepatic-and-biliary-disorders/hepatitis/fulminant-hepatitis>
192. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and Fetal Outcomes in Pregnant Women with Acute Hepatitis E Virus Infection. *Ann Intern Med*. 3 juill 2007;147(1):28-33.
193. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy\*. *Journal of Viral Hepatitis*. 2003;10(1):61-9.
194. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, Sofi MA, Khuroo MI. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *The American Journal of Medicine*. 1 févr 1981;70(2):252-5.
195. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. févr 2018;15(2):96-110.
196. Chagede P, Chavan N, Raj N, Gupta P. An Observational Study to Evaluate the Maternal and Foetal Outcomes in Pregnancies Complicated with Jaundice. *J Obstet Gynaecol India*. févr 2019;69(1):31-6.
197. Bigna JJ, Modiyinji AF, Nansseu JR, Amougou MA, Nola M, Kenmoe S, et al. Burden of hepatitis E virus infection in pregnancy and maternofetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 28 juill 2020;20(1):426.
198. Pérez-Gracia MT, Suay-García B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Reviews in Medical Virology*. 2017;27(3):e1929.
199. Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *Journal of Viral Hepatitis*. 2009;16(7):519-23.
200. Kraus TA, Engel SM, Sperling RS, Kellerman L, Lo Y, Wallenstein S, et al. Characterizing the Pregnancy Immune Phenotype: Results of the Viral Immunity and Pregnancy (VIP) Study. *J Clin Immunol*. 2012;32(2):300-11.
201. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, Gupta RK, et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(5):676-82.
202. Yang C, Yu W, Bi Y, Long F, Li Y, Wei D, et al. Increased oestradiol in hepatitis E virus-infected pregnant women promotes viral replication. *Journal of Viral Hepatitis*. 2018;25(6):742-51.
203. Singh S, Daga MK, Kumar A, Husain SA, Kar P. Role of oestrogen and its receptors in HEV-associated fetomaternal outcomes. *Liver International*. 2019;39(4):633-9.
204. Bose PD, Das BC, Hazam RK, Kumar A, Medhi S, Kar P 2014. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *Journal of General Virology*. 95(6):1266-71.
205. Gouilly J, Chen Q, Siewiera J, Cartron G, Levy C, Dubois M, et al. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat Commun*. 12 nov 2018;9:4748.
206. Bernal W, Jalan R, Quaglia A, Simpson K, Wendon J, Burroughs A. Acute-on-chronic liver failure. *The Lancet*. 17 oct 2015;386(10003):1576-87.
207. Thakur V, Ratho RK, Kumar S, Saxena SK, Bora I, Thakur P. Viral Hepatitis E and Chronicity: A Growing Public Health Concern. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cité 23 oct 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.577339>
208. Olson JC, Kamath PS. Acute-on-chronic liver failure: concept, natural history, and prognosis. *Current Opinion in Critical Care*. avr 2011;17(2):165-9.
209. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al. Factors Associated With Chronic Hepatitis in Patients With Hepatitis E Virus Infection Who Have Received Solid Organ Transplants. *Gastroenterology*. 1 mai 2011;140(5):1481-9.
210. Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, et al. Hepatitis E Virus-Related Cirrhosis in Kidney-and Kidney-Pancreas-Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2008;8(8):1744-8.
211. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 21 févr 2008;358(8):811-7.
212. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent Carriage of Hepatitis E Virus in Patients with HIV Infection. *N Engl J Med*. 3 sept 2009;361(10):1025-7.
213. Felden J von, Alric L, Pischke S, Aitken C, Schlabe S, Spengler U, et al. The burden of hepatitis E among patients with haematological malignancies: A retrospective European cohort study. *Journal of Hepatology*. 1 sept 2019;71(3):465-72.



214. Di Bartolomeo S, Carubbi F, Cipriani P. Hepatitis E Virus and rheumatic diseases: what do rheumatologists need to know? *BMC Rheumatology*. 21 sept 2020;4(1):51.
215. Luring AS, Andino R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathog*. 22 juill 2010;6(7):e1001005.
216. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, Kamar N, et al. Hepatitis E Virus Quasispecies and the Outcome of Acute Hepatitis E in Solid-Organ Transplant Patients. *J Virol*. sept 2012;86(18):10006-14.
217. Robins AEM, Bowden DJ, Gelson WTH. Chronic genotype 1 hepatitis E infection from immunosuppression for ileo-colonic Crohn's disease. *Oxf Med Case Reports*. 25 août 2018;2018(9):omy059.
218. Rath S, Duseja A, Thakur V, Ratho RK, Singh MP, Taneja S, et al. Chronic Hepatitis E With Genotype 1—Masquerading as Allograft Rejection After Liver Transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2021;11(3):400-3.
219. Sridhar S, Chan JFW, Yap DYH, Teng JLL, Huang C, Yip CCY, et al. Genotype 4 hepatitis E virus is a cause of chronic hepatitis in renal transplant recipients in Hong Kong. *Journal of Viral Hepatitis*. 2018;25(2):209-13.
220. Geng Y, Zhang H, Huang W, J Harrison T, Geng K, Li Z, et al. Persistent Hepatitis E Virus Genotype 4 Infection in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hepat Mon*. 23 janv 2014;14(1):e15618.
221. Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver International*. 2016;36(4):467-72.
222. Carpentier VT, Le Guennec L, Fall SAA, Viala K, Demeret S, Weiss N. Syndrome de Guillain-Barré : physiopathologie et aspects diagnostiques. *La Revue de Médecine Interne*. 1 juill 2022;43(7):419-28.
223. Liu H, Ma Y. Hepatitis E virus-associated Guillain-Barre syndrome: Revision of the literature. *Brain Behav*. 11 déc 2019;10(1):e01496.
224. Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *J Hepatol*. mai 2017;66(5):1082-95.
225. Rivero-Juarez A, Frias M, Rodriguez-Cano D, Cuenca-López F, Rivero A. Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. *Clin Infect Dis*. 1 juin 2016;62(11):1464.
226. Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, Geng K, et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol*. janv 2016;64(1):37-43.
227. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, et al. Profile of Acute Infectious Markers in Sporadic Hepatitis E. *PLoS One*. 21 oct 2010;5(10):e13560.
228. Norder H, Karlsson M, Mellgren Å, Konar J, Sandberg E, Lason A, et al. Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis E Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. *J Clin Microbiol*. mars 2016;54(3):549-55.
229. Lytton SD, Bulbul MdrH, Barua K, Begum MC, Chowdhury B, Islam Z, et al. Hepatitis E Virus Capsid Antigen (HEV-Ag) – A practical diagnostic biomarker in the HEV outbreak scenario. *Journal of Clinical Virology*. 1 janv 2021;134:104692.
230. Lenggenhager D, Weber A. Clinicopathologic features and pathologic diagnosis of hepatitis E. *Human Pathology*. 1 févr 2020;96:34-8.
231. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods*. 1 janv 2006;131(1):65-71.
232. Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, Kusano E, Aikawa T, Shibayama T, et al. Prolonged Fecal Shedding of Hepatitis E Virus (HEV) during Sporadic Acute Hepatitis E: Evaluation of Infectivity of HEV in Fecal Specimens in a Cell Culture System. *J Clin Microbiol*. nov 2007;45(11):3671-9.
233. Aggarwal R, Goel A. Advances in hepatitis E – I: virology, pathogenesis and diagnosis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 1 sept 2016;10(9):1053-63.
234. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 1 mars 2010;50(5):e30-33.
235. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L, et al. Ribavirin Therapy Inhibits Viral Replication on Patients With Chronic Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterology*. 1 nov 2010;139(5):1612-8.
236. Dalton HR, Keane FE, Bendall R, Mathew J, Ijaz S. Treatment of Chronic Hepatitis E in a Patient With HIV Infection. *Ann Intern Med*. 4 oct 2011;155(7):479-80.
237. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, et al. Ribavirin for Chronic Hepatitis E Virus Infection in Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 20 mars 2014;370(12):1111-20.
238. Kamar N, Abravanel F, Behrendt P, Hofmann J, Pageaux GP, Barbet C, et al. Ribavirin for Hepatitis E Virus Infection After Organ Transplantation: A Large European Retrospective Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases*. 22 août 2020;71(5):1204-11.
239. Sinclair SM, Jones JK, Miller RK, Greene MF, Kwo PY, Maddrey WC. The Ribavirin Pregnancy Registry: An Interim Analysis of Potential Teratogenicity at the Mid-Point of Enrollment. *Drug Saf*. 2017;40(12):1205-18.

240. Contreras AM, Hiasa Y, He W, Terella A, Schmidt EV, Chung RT. Viral RNA Mutations Are Region Specific and Increased by Ribavirin in a Full-Length Hepatitis C Virus Replication System. *Journal of Virology*. sept 2002;76(17):8505-17.
241. Vignuzzi M, Stone JK, Andino R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Research*. 1 févr 2005;107(2):173-81.
242. Sierra M, Airaksinen A, González-López C, Agudo R, Arias A, Domingo E. Foot-and-Mouth Disease Virus Mutant with Decreased Sensitivity to Ribavirin: Implications for Error Catastrophe. *Journal of Virology*. 15 févr 2007;81(4):2012-24.
243. Todt D, Gisa A, Radonic A, Nitsche A, Behrendt P, Suneetha PV, et al. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut*. oct 2016;65(10):1733-43.
244. M van der V, Hl Z, Ap K, J S. Sofosbuvir shows antiviral activity in a patient with chronic hepatitis E virus infection. *Journal of hepatology* [Internet]. janv 2017 [cité 16 sept 2022];66(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27702641/>
245. VI DT, Y D, X W, Cm R, J N, D M, et al. Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology* [Internet]. janv 2016 [cité 16 sept 2022];150(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26408347/>
246. Wu X, Chen P, Lin H, Hao X, Liang Z. Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 16 mai 2016;12(10):2603-10.
247. Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*. 22 avr 2005;23(22):2893-901.
248. hepeq-a.pdf [Internet]. [cité 20 sept 2022]. Disponible sur: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/hepatitis/hepeq-a.pdf?sfvrsn=13fe3ad\\_8](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/hepatitis/hepeq-a.pdf?sfvrsn=13fe3ad_8)
249. OMS | Profil d'innocuité d'un vaccin recombinant contre l'hépatite E [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 15 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.who.int/vaccine\\_safety/committee/topics/hepatitise/Jun\\_2014/fr/](https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/hepatitise/Jun_2014/fr/)
250. Wen GP, He L, Tang ZM, Wang SL, Zhang X, Chen YZ, et al. Quantitative evaluation of protective antibody response induced by hepatitis E vaccine in humans. *Nat Commun*. 7 août 2020;11:3971.
251. hepeq-a.pdf [Internet]. [cité 20 sept 2022]. Disponible sur: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/hepatitis/hepeq-a.pdf?sfvrsn=13fe3ad\\_8](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/hepatitis/hepeq-a.pdf?sfvrsn=13fe3ad_8)
252. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*. 29 avr 1988;240(4852):622-30.
253. Mahley RW, Rall SC. Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism. In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL, Mitchell GA, éditeurs. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019 [cité 27 sept 2022]. Disponible sur: [ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1181449868](http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1181449868)
254. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*. 1 août 2006;31(8):445-54.
255. Havel RJ. Lipoproteins and lipid transport. *Adv Exp Med Biol*. 1975;63:37-59.
256. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1 déc 1984;25(12):1277-94.
257. Mahley RW. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr J Med Sci*. juin 1996;32(6):414-29.
258. Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2000;1(1):507-37.
259. Mahley RW, Nathan BP, Bellosta S, Pitas RE. Apolipoprotein E: impact of cytoskeletal stability in neurons and the relationship to Alzheimer's disease. *Curr Opin Lipidol*. avr 1995;6(2):86-91.
260. Yin J, Nielsen M, Carcione T, Li S, Shi J. Apolipoprotein E regulates mitochondrial function through the PGC-1 $\alpha$ -sirtuin 3 pathway. *Aging (Albany NY)*. 6 déc 2019;11(23):11148-56.
261. Ji Y, Gong Y, Gan W, Beach T, Holtzman DM, Wisniewski T. Apolipoprotein E isoform-specific regulation of dendritic spine morphology in apolipoprotein E transgenic mice and Alzheimer's disease patients. *Neuroscience*. 2003;122(2):305-15.
262. Bonacina F, Coe D, Wang G, Longhi MP, Baragetti A, Moregola A, et al. Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nat Commun*. 6 août 2018;9(1):3083.
263. Wu AL, Windmueller HG. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J Biol Chem*. 10 août 1979;254(15):7316-22.
264. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*. oct 1985;76(4):1501-13.
265. Achariyar TM, Li B, Peng W, Verghese PB, Shi Y, McConnell E, et al. Glymphatic distribution of CSF-derived apoE into brain is isoform specific and suppressed during sleep deprivation. *Molecular Neurodegeneration*. 8 déc 2016;11(1):74.

266. Li Y hong, Liu L. Apolipoprotein E synthesized by adipocyte and apolipoprotein E carried on lipoproteins modulate adipocyte triglyceride content. *Lipids in Health and Disease*. 23 août 2014;13(1):136.
267. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. janv 1983;80(1):283-7.
268. Kockx M, Jessup W, Kritharides L. Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2008;28(6):1060-7.
269. Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res*. 1 déc 1984;25(12):1368-79.
270. Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker D, Taylor JM, Rall SC. Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J Biol Chem*. 25 mai 1989;264(15):9094-101.
271. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem*. 1994;45:249-302.
272. Wilson C, Mau T, Weisgraber KH, Wardell MR, Mahley RW, Agard DA. Salt bridge relay triggers defective LDL receptor binding by a mutant apolipoprotein. *Structure*. 1 août 1994;2(8):713-8.
273. Futamura M, Dhanasekaran P, Handa T, Phillips MC, Lund-Katz S, Saito H. Two-step Mechanism of Binding of Apolipoprotein E to Heparin: IMPLICATIONS FOR THE KINETICS OF APOLIPOPROTEIN E-HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN COMPLEX FORMATION ON CELL SURFACES \*. *Journal of Biological Chemistry*. 18 févr 2005;280(7):5414-22.
274. Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, Sparrow JT. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*. 15 févr 1986;261(5):2068-76.
275. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res*. août 1982;23(6):911-4.
276. Huebbe P, Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Research Reviews*. 1 août 2017;37:146-61.
277. Singh PP, Singh M, Mastana SS. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Annals of Human Biology*. 1 janv 2006;33(3):279-308.
278. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*. 10 mars 1982;257(5):2518-21.
279. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 13 août 2009;63(3):287-303.
280. Dong LM, Weisgraber KH. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 9 août 1996;271(32):19053-7.
281. Zhou M, Huang T, Collins N, Zhang J, Shen H, Dai X, et al. APOE4 Induces Site-Specific Tau Phosphorylation Through Calpain-CDK5 Signaling Pathway in EFAD-Tg Mice. *Current Alzheimer Research*. 13(9):1048-55.
282. Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid  $\beta$  peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 déc 2005;102(51):18700-5.
283. Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Bullido MJ, Valdivieso F. Involvement of Apolipoprotein E in the Hematogenous Route of Herpes Simplex Virus Type 1 to the Central Nervous System. *J Virol*. déc 2002;76(23):12394-8.
284. Lin W, Graham J, MacGowan S, Wilcock G, Itzhaki R. Alzheimer's disease, herpes virus in brain, apolipoprotein E4 and herpes labialis. *ALZHEIMERS REPORTS* [Internet]. 1998 [cité 3 oct 2022];1(3). Disponible sur: <https://ora.ox.ac.uk/objects/uuid:4ffca54d-09ac-4b28-8314-405c653bcc3b>
285. Wozniak MA, Shipley SJ, Dobson CB, Parker SP, Scott FT, Leedham-Green M, et al. Does apolipoprotein E determine outcome of infection by varicella zoster virus and by Epstein Barr virus? *Eur J Hum Genet*. juin 2007;15(6):672-8.
286. Tréguier Y, Cochard J, Burlaud-Gaillard J, Lemoine R, Chouteau P, Roingeard P, et al. The envelope protein of Zika virus interacts with apolipoprotein E early in the infectious cycle and this interaction is conserved on the secreted viral particles. *Virology Journal* [Internet]. 2022 [cité 5 oct 2022];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9331583/>
287. Siddiqui R, Suzu S, Ueno M, Nasser H, Koba R, Bhuyan F, et al. Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages. *PLoS Pathog*. 29 nov 2018;14(11):e1007372.
288. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE, et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 juin 2008;105(25):8718-23.
289. Corder EH, Robertson K, Lannfelt L, Bogdanovic N, Eggertsen G, Wilkins J, et al. HIV-infected subjects with the E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy. *Nat Med*. oct 1998;4(10):1182-4.
290. Valcour V, Shikuma C, Shiramizu B, Watters M, Poff P, Selnes OA, et al. Age, apolipoprotein E4, and the risk of HIV dementia: the Hawaii Aging with HIV Cohort. *J Neuroimmunol*. déc 2004;157(1-2):197-202.
291. Qiao L, Luo GG. Human apolipoprotein E promotes hepatitis B virus infection and production. *PLOS Pathogens*. 8 août 2019;15(8):e1007874.

292. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* déc 2007;81(24):13783-93.
293. Benga WJA, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology.* janv 2010;51(1):43-53.
294. Piver E, Boyer A, Gaillard J, Bull A, Beaumont E, Roingeard P, et al. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut.* août 2017;66(8):1487-95.
295. Boyer A, Dumans A, Beaumont E, Etienne L, Roingeard P, Meunier JC. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem.* 4 juill 2014;289(27):18904-13.
296. Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol.* juill 2012;86(13):7256-67.
297. Zhao Y, Ren Y, Zhang X, Zhao P, Tao W, Zhong J, et al. Ficolin-2 Inhibits Hepatitis C Virus Infection, whereas Apolipoprotein E3 Mediates Viral Immune Escape. *The Journal of Immunology.* 15 juill 2014;193(2):783-96.
298. Gomaa HE, Mahmoud M, Saad NE, Saad-Hussein A, Ismail S, Thabet EH, et al. Impact of Apo E gene polymorphism on HCV therapy related outcome in a cohort of HCV Egyptian patients. *J Genet Eng Biotechnol.* juin 2018;16(1):47-51.
299. Mueller T, Fischer J, Gessner R, Rosendahl J, Böhm S, van Bömmel F, et al. Apolipoprotein E allele frequencies in chronic and self-limited hepatitis C suggest a protective effect of APOE4 in the course of hepatitis C virus infection. *Liver Int.* sept 2016;36(9):1267-74.
300. Lee G, Han D, Song JY, Kim JH, Yoon S. Proteomic analysis of swine hepatitis E virus (sHEV)-infected livers reveals upregulation of apolipoprotein and downregulation of ferritin heavy chain. *FEMS Immunol Med Microbiol.* avr 2011;61(3):359-63.
301. Rogée S, Le Gall M, Chafey P, Bouquet J, Cordonnier N, Frederici C, et al. Quantitative proteomics identifies host factors modulated during acute hepatitis E virus infection in the swine model. *J Virol.* janv 2015;89(1):129-43.
302. Zhang L, Yesupriya A, Chang MH, Teshale E, Teo CG. Apolipoprotein E and protection against hepatitis E viral infection in American non-Hispanic blacks. *Hepatology.* nov 2015;62(5):1346-52.
303. Gu M, Qiu J, Guo D, Xu Y, Liu X, Shen C, et al. Evaluation of candidate genes associated with hepatitis A and E virus infection in Chinese Han population. *Viol J.* 20 mars 2018;15(1):47.
304. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res.* 1 sept 1982;42(9):3858-63.
305. Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, Long G, Hiet MS, Mueller B, et al. Apolipoprotein E Likely Contributes to a Maturation Step of Infectious Hepatitis C Virus Particles and Interacts with Viral Envelope Glycoproteins. *J Virol.* nov 2014;88(21):12422-37.
306. Cun W, Jiang J, Luo G. The C-Terminal  $\alpha$ -Helix Domain of Apolipoprotein E Is Required for Interaction with Nonstructural Protein 5A and Assembly of Hepatitis C Virus. *JVI.* 1 nov 2010;84(21):11532-41.


**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) MOUSALLI Maryam.....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21400212.....

N° Thèse : 10.....

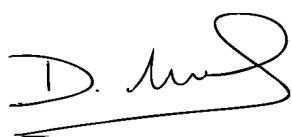
Nom et Prénom : MOUSALLI Maryam.....

Sujet : Caractérisation de l'interaction de la protéine ORF2 du  
virus de l'hépatite E et de l'apolipoprotéine E en lignées hépatiques.....

Tours, le : .....

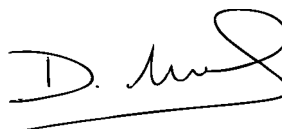
Le(s) Directeur(s) de Thèse :

**DENYS BRAND**



**Vu et Transmis :  
Le Doyen**

**DENYS BRAND**



<b>NOM, PRENOM de l'étudiant :</b> MOUSALLI Maryam	<b>N° :</b> 10
<b>TITRE DE LA THESE</b>	
Caractérisation de l'interaction de la protéine ORF2 du virus de l'hépatite E et de l'apolipoprotéine E en lignées hépatiques	
<b>RESUME DE LA THESE</b>	
<p>Le virus de l'hépatite E (VHE) appartient à la famille des <i>Hepeviridae</i> et comporte un génome à ARN monocaténaire de polarité positive. Il est enveloppé d'une bicouche lipidique d'origine exosomale lorsqu'il est observé à partir de sérum de patients infectés ou de surnageant de culture cellulaire (VHEcc). Responsable de la majorité des hépatites aiguës dans le monde, le VHE constitue un problème de santé publique majeur. Il peut provoquer des infections pouvant entraîner le décès chez les personnes les plus vulnérables notamment les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés. Environ 2 milliards de personnes vivent dans des zones endémiques où circulent activement le virus et sont à risque de contracter une infection pour laquelle il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique. A l'instar des virus de l'hépatite B ou C, le VHE pourrait interagir avec des apolipoprotéines, notamment l'apolipoprotéine E, lors de son cycle de multiplication. Des données préalablement acquises par l'unité INSERM U1259 ont suggéré l'existence d'une colocalisation de l'apolipoprotéine E et de la protéine ORF2 du VHE. L'objectif de cette thèse était de caractériser cette interaction au sein de différentes lignées cellulaires hépatiques. Lors de notre étude, des marquages par immunofluorescence de la protéine ORF2 et de l'apoE ont montré une colocalisation de ces 2 protéines. Des tests de co-immunoprécipitation après expression du génome viral complet ou de la protéine ORF2 seule en système hétérologue, ont permis de confirmer une interaction entre cette protéine virale et l'apoE. Ces données permettent d'améliorer les connaissances sur le cycle de multiplication du virus et pourraient, par la suite, aider au développement de traitements spécifiques contre l'infection par le VHE.</p>	
<b>MOTS CLES SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUES PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY</b>	
Virus de l'hépatite E – Infection Zoonotique – Transmission oro-fécale – Hépatite aiguë – Hépatite Chronique – ORF2 – Apolipoprotéine E – Apolipoprotéine B	
<b>JURY :</b>	
<p><b>PRESIDENT :</b> Mme Martine BRAIBANT, Enseignant-Chercheur, Maître de conférences, Faculté de pharmacie – Tours</p> <p><b>MEMBRES :</b></p> <p>Mr Denys BRAND, Enseignant-Chercheur, Professeur des Universités, Faculté de pharmacie – Tours</p> <p>Mr Julien MARLET, Enseignant-Chercheur, Maître de conférences et Praticien hospitalier, Faculté de pharmacien – Tours</p> <p>Mme MARICHATOU Maryam, Pharmacienne d'officine – Orléans</p>	
<b>DATE ET LIEU DE SOUTENANCE :</b> 10/03/2023 à la Faculté de pharmacie de Tours	