

## **INTERACTION VIRUS-SYSTEME INTERFERON**

Au vu du rôle crucial du système IFN-I dans la réponse antivirale précoce de l'hôte, l'activité des protéines constituant ces voies de signalisation est très souvent bloquée par les virus. Le blocage peut être fait à tous les niveaux, que ce soit dans la voie d'induction de l'IFN-I, la voie de réponse à l'IFN mais également au niveau des ISGs induits. Nous parlerons dans un premier temps des différents mécanismes conduisant au blocage des voies d'induction et de réponse à l'IFN-I par les protéines virales. Certaines protéines virales sont également capables de cibler l'activité de certaines protéines codées par les ISGs mais nous n'aborderons pas ce sujet ici. Dans un second temps, nous exposerons ce qui est connu dans le cas du HEV, au niveau de l'interaction entre le virus et le système IFN-I de l'hôte.

### **A- Modulation des voies de signalisation de l'IFN-I par les virus**

#### **1- Contrôle de l'induction de l'IFN-I par les virus**

L'IFN-I jouant un rôle crucial dans la lutte antivirale, les voies de signalisation conduisant à sa synthèse sont particulièrement inhibées par les virus. Les voies de signalisation TLR et RLR

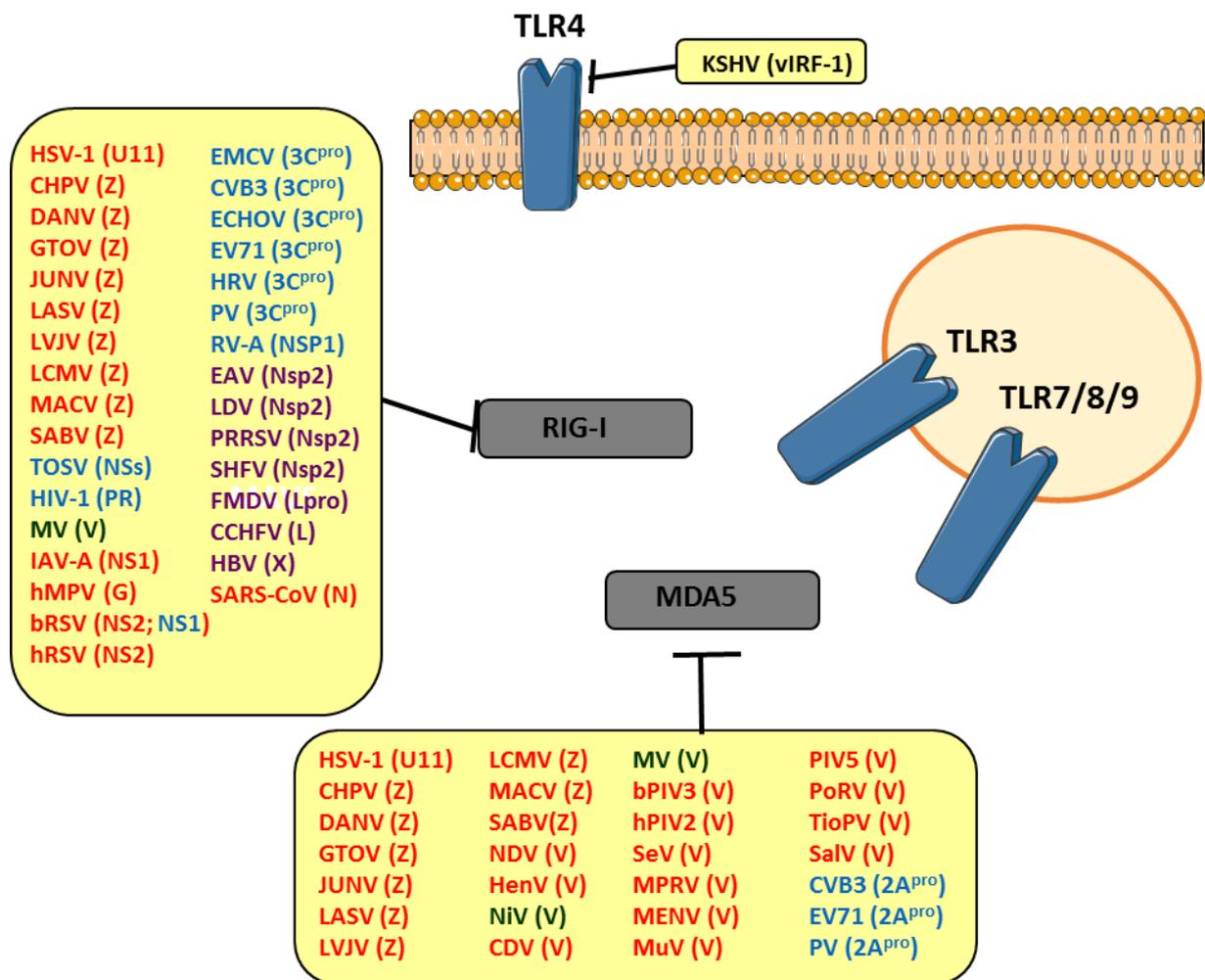
peuvent être bloquées à différents niveaux, que ce soit au niveau de l'induction de la synthèse d'IFN-I via les voies de signalisation dépendantes d'IRF3/IRF7 ou au niveau de l'induction des cytokines pro-inflammatoires via les voies de signalisation dépendantes de NF-κB. Les protéines de ces voies de signalisation peuvent être séquestrées par une ou plusieurs protéines virales pour inhiber leur activité, dégradées ou subir des modifications post-traductionnelles qui vont impacter les processus d'ubiquitinylation/déubiquitinylation ou de phosphorylation/déphosphorylation. Les protéines virales peuvent se lier directement à la protéine cellulaire ou induire ou inhiber une autre protéine impliquée dans l'activité de la protéine cellulaire jouant un rôle dans la voie de signalisation IFN-I. Les différentes protéines virales qui interagissent avec les protéines des voies de signalisation TLR et RLR impliqués dans la production d'IFN-I sont représentées dans les figures 17-18-19 <sup>425</sup>.

Les cibles des protéines virales les plus étudiées sont les récepteurs cytoplasmiques RIG-I et MDA5. L'adaptateur MAVS est également une protéine dont l'inhibition a souvent été rapportée, ainsi que les protéines kinases TBK1 et IKKα et les facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Au contraire, l'inhibition d'autres protéines adaptatrices comme SINTBAD, NAP-1, TANK et MyD88 par les virus a été peu étudiée.

#### *α- Inhibition des PRRs par les virus*

Les PRRs cytoplasmiques RIG-I et MDA5 sont la cible de nombreuses protéines virales (Figure 17). Au contraire les TLRs semblent peu ciblés. RIG-I et MDA5 peuvent être séquestrés, la liaison à des protéines virales bloquant leur activité. Par exemple, la protéine Z de nombreux virus de la famille des *Arenaviridae* (virus Chapare (CHPV), dandenong (DANV), Guanarito (GTOV), JUNV, LASV, Lujo (LVJV), LCMV, Machupo (MACV) et Sabia (SABV)) se lie aux domaines CARDs de RIG-I et MDA5, bloquant ainsi leur interaction avec MAVS <sup>426,427</sup>. RIG-I et MDA5 peuvent également être clivés par respectivement les protéines 3C<sup>pro</sup> et 2A<sup>pro</sup> du Coxsackievirus B3 (CVB3), de l'Entérovirus 71 (EV71) et du PV <sup>428-432</sup>. Certaines protéines virales peuvent également interagir avec RIG-I et entraîner sa dégradation par le protéasome. Ce mécanisme est utilisé par la protéine NSs du virus Toscana. D'autres mécanismes impliquant des modifications post-traductionnelles des protéines sont également utilisés. Par exemple, la protéine V du MV inhibe la dé-phosphorylation de RIG-I et MDA5 en bloquant les phosphatases PPα/γ, inhibant ainsi son activation <sup>433,434</sup>. De plus,

l'ubiquitinylation de RIG-I étant nécessaire à son activité, RIG-I peut également être déubiquitinylé par des DUBs virales. Ce mécanisme de déubiquitinylation de RIG-I est utilisé par de nombreuses protéines virales comme la polymérase L du Nairovirus CCHFV (pour *crimean-congo hemorrhagic fever virus*)<sup>435</sup>, la protéine X du HBV<sup>436</sup>, et le domaine PLP2 de la protéine Nsp2 de différents virus de la famille des *arteriviridae* (EAV (pour *equine arteritis virus*), LDV (pour *lactate dehydrogenase-elevating virus*), PRRSV, SHFV (pour *simian hemorrhagic fever virus*))<sup>435,437-441</sup>.



**Figure 17. Stratégies de blocage des PRRs par les protéines virales.**

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge; en bleu les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible ; en violet les protéines virales qui déubiquitinylent leur cible ; en vert les protéines virales qui hyperphosphorylent leur cible ; et en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET<sup>425</sup> et dans différentes revues<sup>442,443</sup>.

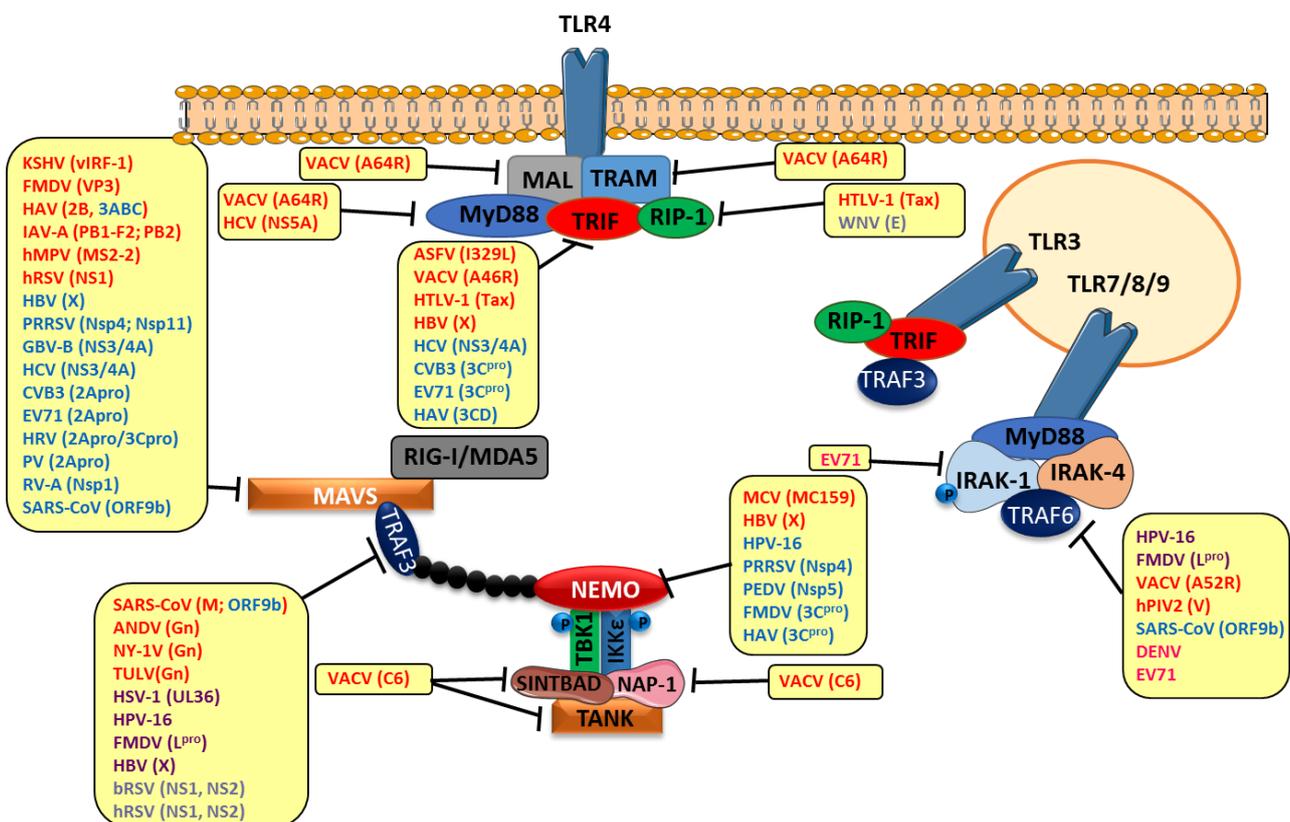
## *b- Inhibition des adaptateurs des voies de signalisation TLR et RLR par les virus*

Les adaptateurs sont la cible de nombreuses protéines virales qui vont principalement les dégrader ou les séquestrer pour inhiber leur interaction avec d'autres partenaires cellulaires (Figure 18). MAVS est un adaptateur souvent ciblé par les protéines virales. Les protéines Nsp4 et Nsp11 du PRRSV vont respectivement cliver MAVS et dégrader l'ARNm codant pour MAVS<sup>444,445</sup>. La protéine X du HBV interagit avec MAVS, entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation protéosomale<sup>446</sup>. Au contraire, certains virus interagissent avec MAVS sans la dégrader, empêchant alors MAVS de recruter ces partenaires cellulaires comme c'est le cas de la protéine M2-2 du métapneumovirus humain (hMPV)<sup>447</sup>. Les protéines TRAFs peuvent être également la cible de protéines virales. TRAF3 et TRAF6 peuvent être séquestrées, dégradées ou déubiquitylées. L'ubiquitinylation des protéines TRAFs étant une étape nécessaire au recrutement de protéines de la voie de signalisation IFN-I, leur déubiquitinylation permet donc l'inhibition de la synthèse d'IFN-I. Par exemple, HPV-16 régule positivement la DUB cellulaire UCHL1 (pour *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*) qui va inhiber l'ubiquitinylation de TRAF3 et TRAF6<sup>448</sup>. Certaines protéines virales possèdent une activité de déubiquitinylation intrinsèque et n'ont donc pas besoin de recruter de DUB cellulaires. C'est notamment le cas de la protéine UL36 du HSV-1 qui est capable de déubiquityler TRAF3 et empêcher le recrutement de TBK1 et IKKε<sup>449</sup>. D'autres protéines virales vont dégrader les TRAFs comme la protéine ORF9b du SARS-CoV qui induit une régulation positive des protéines PCBP2 (pour *poly(rc) binding protein 2*) et Itch (E3 ubiquitine ligase), induisant ainsi la polyubiquitinylation en K48 et ainsi la dégradation de MAVS, TRAF3 et TRAF6<sup>450</sup>.

L'adaptateur TRIF est également la cible des protéines virales. Via une liaison directe avec TRIF, la protéine virale peut soit dégrader, cliver ou séquestrer TRIF afin d'inhiber sa fonction. La protéine A64R du VACV contient un domaine TIR, lui permettant d'interagir avec de nombreux adaptateurs des TLRs : TRIF mais aussi MyD88, MAL et TRAM qui contiennent également un domaine TIR, ce qui bloque leur activité. Une des stratégies est le clivage de TRIF, mécanisme utilisé par exemple par les protéines NS3/4A du HCV et 3C<sup>pro</sup> du CVB3 et EV71<sup>451-454</sup>.

Enfin, la protéine NEMO est également ciblée. Le mode d'action le plus souvent décrit est le clivage de NEMO, qui conduit à l'inhibition de la synthèse d'IFN-I, comme c'est le cas des protéines C3<sup>pro</sup> du virus de la fièvre aphteuse (FMDV pour *foot-and-mouth disease virus*) et du HAV<sup>455,456</sup>.

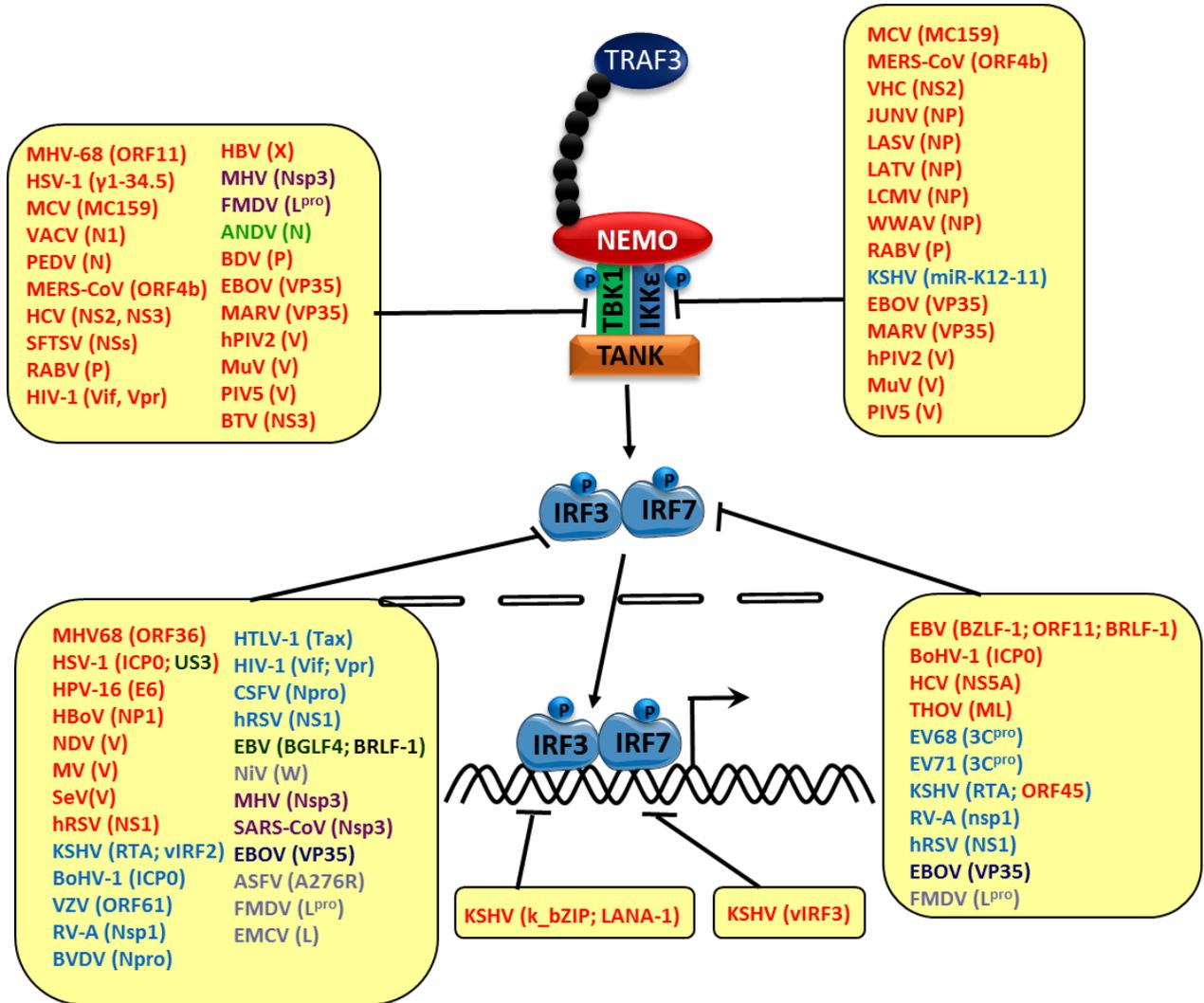
Au contraire de MAVS, des protéines TRAFs et des adaptateurs TRIF et NEMO, les adaptateurs MyD88, MAL, TRAM, IRAK1, IRAK4, SINTBAD, NAP-1 et TANK semblent peu ciblés par les protéines virales. Cependant, le peu d'études disponibles ne signifie pas qu'ils ne sont pas affectés lors d'une infection virale.



**Figure 18. Stratégies de blocage des adaptateurs des voies RLRs par les protéines virales.**

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge ; en bleu les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible ; en violet les protéines virales qui déubiquitinylent leur cible ; en rose les protéines virales qui inhibent la traduction de leur cible et en gris les protéines virales dont le mécanisme d'inhibition est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET<sup>425</sup> et dans différentes revues<sup>442,443</sup>.

c- Inhibition du complexe IKKε-TBK1 par les virus



**Figure 19. Stratégies de blocage des voies de synthèse de l'IFN-I en aval des adaptateurs par les protéines virales.**

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge; en bleu foncé les protéines virales qui entraînent la SUMOylation de leur cible ; en bleu clair les protéines virales qui dégradent/clivent leur cible ; en violet les protéines virales qui déubiquitinylent leur cible ; en vert foncé les protéines virales qui hyperphosphorylent leur cible ; en vert clair les protéines virales qui déphosphorylent leur cible ; en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible ; et en gris les protéines dont le mécanisme d'inhibition est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET <sup>425</sup> et dans différentes revues <sup>442,443</sup>.

La formation du complexe IKK $\epsilon$ -TBK1 étant une étape importante de la voie de signalisation, son inhibition par des protéines virales a très souvent été décrite (Figure 19). La séquestration des protéines IKK $\epsilon$  et TBK1 est le mécanisme le plus utilisé par les protéines virales <sup>425</sup>. Cette séquestration entraîne le blocage de l'activité catalytique du complexe IKK $\epsilon$ -TBK1 et donc l'inhibition de la phosphorylation des IRFs. C'est par exemple le cas pour les protéines virales de nombreux arénavirus (virus JUNV, LASV, Latino (LATV), LCMV, WWAV (pour *Whitewater Arroyo virus*)) qui interagissent avec IKK $\epsilon$  <sup>457</sup>. Certaines protéines virales interagissent avec IKK $\epsilon$  et TBK1 et agissent comme un substrat leurre qui sera phosphorylé par IKK $\epsilon$  et TBK1 au lieu des protéines IRFs, qui ne seront alors pas activées. C'est le cas de la protéine VP35 des virus EBOV et de Marburg (MARV) ainsi que de la protéine V des virus parainfluenza virus humain-2 (hPIV2), oreillons (MuV) et PIV5 <sup>458-460</sup>. Un autre mécanisme est l'inhibition de l'autophosphorylation de TBK1, comme c'est le cas pour la protéine N du virus Andes (ANDV) <sup>461</sup>. Enfin TBK1 peut également être déubiquitinylé. Certaines protéines virales possèdent une activité DUB permettant la déubiquitinylation de TBK1 et donc l'inhibition de son activité protéine kinase. Ce mécanisme est notamment utilisé par le domaine PLP2 de la protéine non-structurale nsp3 du MHV <sup>462</sup>. D'autres mécanismes peuvent être utilisés. Par exemple, la protéine NS3 du virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV) s'associe à l'optineurine, une protéine qui recrute TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi. En recrutant l'optineurine, NS3 empêche TBK1 d'être recrutée et donc activée <sup>463</sup>.

#### *d- Inhibition des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 par les virus*

Les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 peuvent également être ciblés via des mécanismes empêchant leur phosphorylation ou bloquant leur transport dans le noyau ou leur liaison avec le promoteur IFN- $\beta$  (Figure 19). Un autre mécanisme consiste en la dégradation des protéines IRF, comme le fait la protéine Nsp1 du Rotavirus-A (RV-A), une E3-ubiquitine ligase qui va induire la dégradation protéosomale d'IRF3 et IRF7 <sup>464-472</sup>. IRF3 peut être déubiquitinylé ou hyperphosphorylé ce qui inhibe son activité. Par exemple, les protéines BGLF4 d'EBV et US3 de HSV-1 se lient directement à IRF3 et entraînent son hyperphosphorylation, ce qui induit une inhibition de son activité <sup>473,474</sup>. Le domaine PLpro (pour *papain like protease*) de la protéine Nsp3 du SARS-CoV permet une inhibition de la voie de synthèse de l'IFN- $\beta$  en interagissant avec et en déubiquitinylant IRF3, suggérant que

l'ubiquitylation de IRF3 serait importante pour son activité <sup>475</sup>. D'autres mécanismes sont également utilisés. Par exemple, l'ORF45 du KSHV (pour *Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*) interagit avec IRF7 et agit comme substrat alternatif, ou leurre, inhibant son interaction avec IKKε et TBK1 <sup>476-478</sup>. La protéine VP35 du EBOV, en interagissant avec IRF7, Ubc9 (une enzyme E2 SUMO) et PIAS1 (SUMO E3 ligase) accroît la sumoylation d'IRF3 et IRF7, contribuant ainsi à la suppression de la transcription de l'IFN-I <sup>479</sup>.

Certaines protéines virales vont empêcher la liaison des IRFs avec le promoteur IFN-I. C'est le cas des protéines k\_bZIP et LANA-1 du KSHV qui entrent en compétition avec IRF3 pour la liaison au promoteur IFN-β <sup>480,481</sup> et de la protéine vIRF3 qui entre en compétition avec IRF7 pour la liaison au promoteur IFN-α <sup>482</sup>.

## 2- Contrôle de la réponse à l'IFN-I par les virus

La voie de signalisation JAK-STAT peut être bloquée à tous les niveaux par différents virus. De plus, d'autres protéines impliquées dans la régulation de cette voie de signalisation, telles que les protéines SOCS sont également ciblées par les virus. Les différents mécanismes de blocages utilisés par différents virus sont résumés dans la figure 20.

Il peut y avoir un blocage au niveau de la liaison entre l'IFN-I et le récepteur IFNAR. Certaines protéines virales vont se lier à l'IFN-α/β et bloquer sa liaison avec le récepteur IFNAR, comme par exemple le virus de la variole (VARV) ou le virus Monkeypox (MYXV) <sup>483,484</sup>.

Le récepteur IFNAR peut être directement ciblé, et la séquestration ou la dégradation du récepteur IFNAR1 sont les mécanismes les plus souvent décrits. Par exemple la protéine RIF du KSHV forme un complexe comprenant IFNAR1/2, JAK1, TYK2 et STAT2, inhibant ainsi l'activité des protéines séquestrées <sup>485</sup>. L'expression du récepteur IFNAR peut également être réduite. Ce mécanisme est utilisé par la protéine NS4B du HCV <sup>486</sup>. IFNAR peut également être dégradé. Par exemple, l'activité protéase de la protéine 2A de l'EV71 dégrade l'IFNAR1 <sup>487</sup>.

Une autre cible importante des virus est JAK1 et TYK2. Les virus peuvent séquestrer JAK1 et/ou TYK2, inhiber leur expression, les dégrader ou inhiber leur phosphorylation.

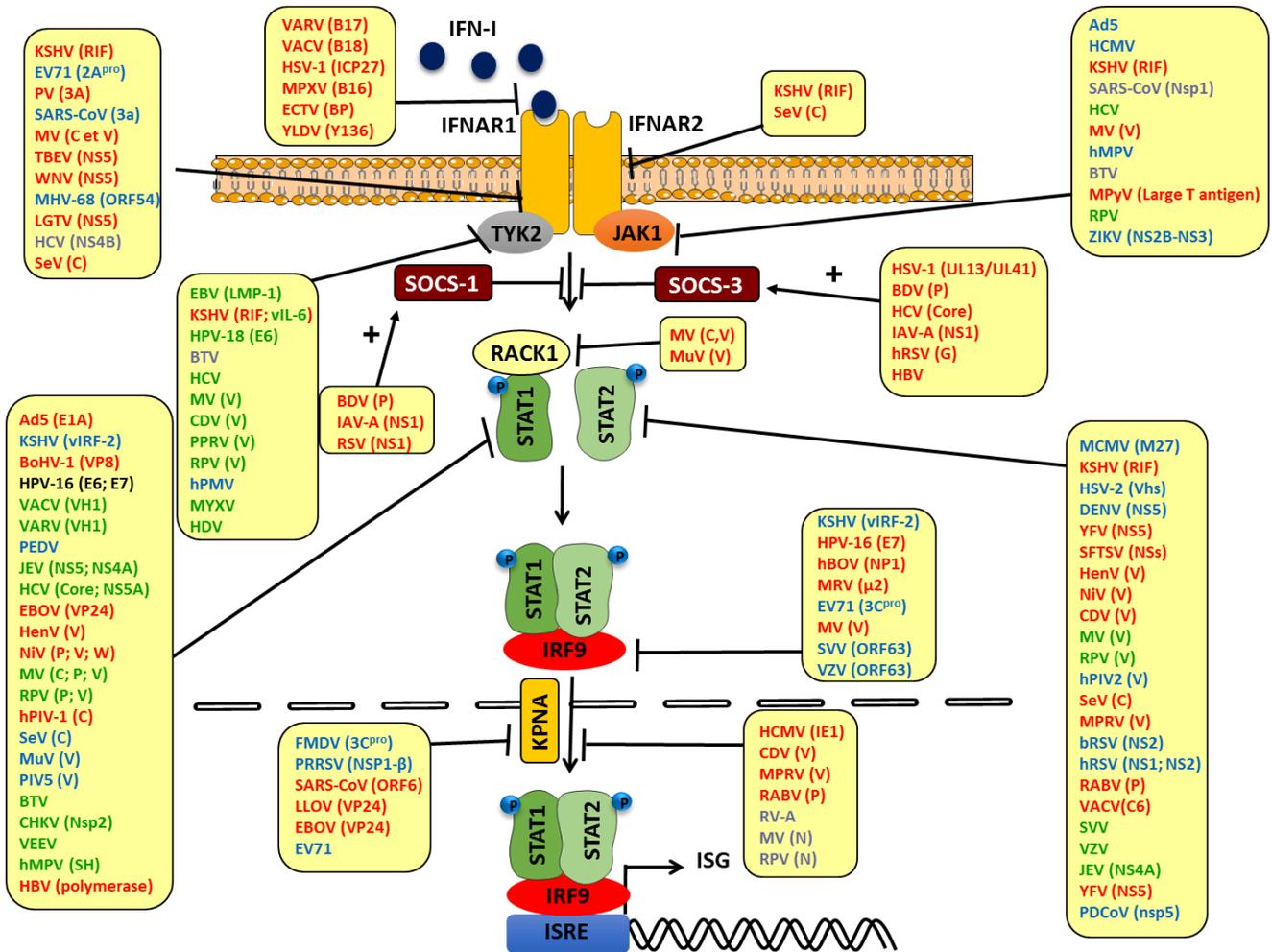
Certains virus inhibent l'expression de JAK1 et/ou TYK2 au niveau transcriptionnel, comme l'Adénovirus 5 (Ad5) <sup>488</sup>, et le hMPV <sup>489</sup> qui dégradent l'ARNm codant pour JAK1. D'autres induisent leur dégradation via le système ubiquitine-protéasome, comme par exemple le

virus hCMV <sup>489-491</sup>. Un mécanisme souvent rapporté est la déphosphorylation de la protéine TYK2 par les protéines virales qui se fait soit directement via une interaction entre la protéine virale et TYK2, soit indirectement via la modulation d'une autre protéine impliquée dans la phosphorylation de TYK2. Par exemple, la protéine LMP-1 de EBV et la protéine E6 du HPV-18 se lient directement à TYK2 pour inhiber sa phosphorylation <sup>492,493</sup>. Au contraire, le HCV induit l'expression de la phosphatase 2A (PP2A) qui s'associe avec JAK1/TYK2/STAT1 pour bloquer leur phosphorylation <sup>494</sup>. De même, les protéines UL13 et UL41 du HSV-1, la protéine Core du HCV et la protéine G du RSV induisent l'expression de SOCS3, qui va dégrader JAK1 et TYK2 <sup>495-500</sup>.

Les virus vont également cibler la formation, la stabilité et l'activation du complexe ISGF3 de manière directe ou indirecte. De nombreuses protéines virales vont inhiber la phosphorylation de STAT1, notamment les protéines VH-1 des VARV et VACV qui possèdent une activité phosphatase pour déphosphoryler STAT1 et la protéine NS5A du HCV qui va se lier à STAT1 et empêcher sa phosphorylation <sup>501-505</sup>. L'inhibition de la phosphorylation de STAT2 est également un mécanisme répandu. Des protéines virales vont aussi induire la dégradation protéolytique de STAT1 et/ou STAT2 ou bien cibler leur expression au niveau transcriptionnel. Par exemple, la protéine Vhs du HSV-2 est capable de dégrader STAT2 à la fois au niveau de l'ARNm de part son activité RNase mais également au niveau protéique en entraînant sa dégradation par le protéasome <sup>506-509</sup>. Les protéines du complexe ISGF3 peuvent aussi être séquestrées. Par exemple, la protéine C de hPIV-1 interagit avec STAT1 et la bloque dans des agrégats périnucléaires <sup>510</sup>. IRF9 est également une cible, elle peut être séquestré ou dégradé par des protéines virales telles que la protéine 3C<sup>pro</sup> de l'EV71 qui clive IRF9 <sup>511</sup>.

Certaines protéines virales vont inhiber l'entrée du complexe ISGF3 dans le noyau, soit en interagissant directement avec lui, le séquestrant ainsi dans le cytoplasme soit indirectement en interagissant avec une protéine cellulaire impliquée dans le transport des protéines à travers les pores nucléaires. La Karyophérine- $\alpha$  (KPNA) est une protéine cellulaire impliquée dans le transport du complexe ISGF3 dans le noyau qui a été rapportée comme étant la cible par de nombreuses protéines virales afin d'inhiber l'entrée du complexe dans le noyau. EV71, la protéine Nsp1 $\beta$  du PRRSV et la protéine 3C<sup>pro</sup> du FMDV induisent la dégradation de KPNA1, empêchant ainsi la translocation du complexe ISGF3 <sup>512-515</sup>. Au

contraire, l'ORF6 du SARS-CoV, et les protéines VP24 des virus LLOV (Lloviu cuevavirus) et EBOV interagissent avec KPNA pour la retenir dans le cytoplasme<sup>516-521</sup>.



**Figure 20. Stratégies de blocage de la voie JAK-STAT par les protéines virales.**

Les protéines virales inhibant des protéines cellulaires via un mécanisme de séquestration sont représentées en rouge ; en bleu les protéines virales qui dégradent leur cible ; en vert les protéines virales qui induisent une déphosphorylation de la protéine cellulaire ciblée ; en noir les protéines virales qui inhibent la transcription de leur cible et en gris les protéines virales dont le mécanisme d'inhibition utilisé est inconnu. Schéma réalisé à partir des informations recueillies dans la thèse de Emilie POIRET<sup>425</sup> et dans différentes revues<sup>442,443</sup>.

Un autre mécanisme consiste en l'inhibition de l'activation du promoteur ISRE. La protéine C6 du VACV inhibe STAT2 en se liant à son domaine transactivateur, l'empêchant ainsi d'activer le promoteur ISRE<sup>522</sup>. De façon similaire, la protéine NP1 du Bocavirus humain

(hBOV) se lie au domaine de liaison à l'ADN de IRF9, l'empêchant ainsi de se lier au promoteur ISRE.

Certains virus ont développé différentes stratégies pour bloquer la voie JAK-STAT à plusieurs niveaux : c'est le cas du MV qui code pour les protéines V, P, C et N qui inhibent la voie JAK-STAT par différents mécanismes : la protéine V se lie à JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1<sup>523,524</sup>. De plus, elle interagit également directement avec STAT1, STAT2, IRF9<sup>523,525-528</sup> et TYK2 pour bloquer la phosphorylation de ce dernier<sup>529</sup>. La protéine P interagit également avec STAT1 et bloque sa phosphorylation<sup>530-532</sup>. La protéine N bloque la translocation nucléaire du complexe STAT1-STAT2 activé<sup>533</sup>. Enfin, la protéine C forme un complexe avec V, RACK1 (pour *receptor of activated protein kinase C*), IFNAR1 et STAT1 pour bloquer la voie de signalisation<sup>534,535</sup>. RACK1 est une protéine permettant la liaison entre IFNAR2 et STAT1. En formant un complexe avec ces différentes protéines, les protéines V et C inhibent leur activité, STAT1 n'est plus recruté au niveau de l'IFNAR et ne peut donc plus être phosphorylé. De plus, la protéine C est également capable, via sa liaison à l'IFNAR1, d'inhiber la phosphorylation de JAK1.

## B- Interaction entre système IFN-I et HEV

### 1- Activation de la réponse immunitaire en réponse au HEV

#### *α- Activation de la synthèse d'IFN-I en réponse au HEV ?*

Plusieurs études ont montré que l'infection par le HEV est capable d'activer la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi ces études, certaines ont rapporté une augmentation de la production d'IFN-I après infection par le HEV. Il a notamment été décrit une augmentation de la production d'IFN-I *in vivo* chez le porc suite à l'infection par une souche de HEV porcine<sup>536</sup>. De plus, il a été montré une induction de l'expression de l'IFN-I dans des cellules humaines A549 en réponse à une infection par une souche de HEV-1, provenant de fèces prélevées chez un patient atteint d'une hépatite E<sup>537</sup>. Cependant, cette expression est faible et corrèle avec une faible induction d'ISGs. De plus, la mesure de la sécrétion d'IFN-I par ELISA n'a pas permis de détecter la présence d'IFN-I dans le surnageant de culture. Récemment, une autre étude a montré que, dans des cellules HepG2 et des hépatocytes

primaires humains, la transfection d'un clone infectieux de longueur génomique du HEV-3 (souche Kernow-C1) ne conduisait pas à la détection de la production d'IFN- $\alpha$ / $\beta$  dans le surnageant de culture mais uniquement de l'IFN-III<sup>538</sup>. L'analyse des cellules par RT-PCRq a montré une très faible augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\beta$ . Au contraire, une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\lambda$  et de certains ISGs a pu être observée.

#### *b- Activation de la synthèse des ISGs en réponse au HEV*

Plusieurs études ont montré l'induction d'ISGs après infection par le HEV. Une étude sur des patients présentant une hépatite chronique a montré une augmentation de l'expression de 25 ISGs, dont l'ISG15, Mx1 et IFIT1<sup>539</sup>. Une étude comparative dans des cellules Huh7 transfectées avec un clone infectieux codant pour une souche de HEV-1 ou pour une souche de HBV a permis de mettre en évidence des gènes dont l'expression était augmentée après infection avec le HEV et des gènes dont l'expression était diminuée<sup>540</sup>. Notamment, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire, était augmentée dans les cellules infectées par le HEV en comparaison aux cellules infectées par le HBV. De plus, une autre étude a montré une augmentation de l'expression de certains ISGs tel que Mx1 dans des cellules PLC/PRF/5 infectées avec une souche de HEV-4 provenant de fèces de singes infectés expérimentalement<sup>541</sup>. Chez le chimpanzé, il a été observé une augmentation de l'expression d'ISG15, OAS1, Mx1, STAT1 et IRF7 après infection avec le HEV-1 (souche SAR55)<sup>542</sup>. Cependant, cette induction est faible en comparaison de l'induction des ISGs après infection par le HCV. De plus, cette étude a montré que de nombreux ISGs induits par l'infection par le HCV ne sont pas induits après infection avec le HEV. La réponse IFN-I est également plus courte dans le temps après infection par le HEV et conduit à une élimination du virus, suggérant que le HEV est plus sensible aux effets des ISGs que le HCV. Très récemment, une autre étude a montré dans des cellules Huh7-S10-3 transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (Kernow-C1) et dans des foies de porcs infectés expérimentalement avec le HEV, que l'infection par le HEV induisait une production importante d'ISG15<sup>543</sup>. De plus, cette étude a suggéré que l'ISG15 jouerait un rôle immunomodulateur sur la réponse du HEV à l'IFN-I.

### c- Protéines impliquées dans la reconnaissance et la réponse au HEV

Récemment, plusieurs études ont permis de mettre en évidence des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réponse immunitaire à l'infection par le HEV. Il a été montré une activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 dans des cellules humaines A549 en réponse à une infection par une souche de HEV-1, provenant de fèces prélevées chez un patient atteint d'hépatite E <sup>537</sup>. Dans la même étude, il a été rapporté que les adaptateurs TRIF et MyD88 seraient impliqués dans la réponse antivirale, suggérant une implication des TLR 2,3 et 4 dans la reconnaissance du HEV <sup>537</sup>. Une étude dans des lignées hépatocytaires Huh7.5 et Huh7.S-10 et HepG2/C3A transfectées avec un clone infectieux codant pour une souche de HEV-1 (souche pSKHEV-2) a montré une induction des IFN-I ainsi que de différentes ISGs dont ISG15, IFIT1, Mx1, OAS1 <sup>544</sup>. De plus, il semblerait que les voies de signalisation RIG-I et TLR3 soient impliquées dans la reconnaissance du HEV. En effet, il a été montré dans la même étude qu'après transfection d'un plasmide exprimant une forme fonctionnelle de RIG-I ou TLR3 dans des cellules Huh7.5, présentant un déficit au niveau de RIG-I et TLR3, que la réplication du HEV était affectée et l'expression des ISGs était augmentée, suggérant une reconnaissance du HEV par RIG-I et TLR3. La localisation de RIG-I au niveau du cytoplasme, permettrait la reconnaissance de l'ARN génomique du HEV alors que TLR3, localisé au niveau des endosomes, reconnaîtrait des intermédiaires réplicatifs.

D'autres études récentes ont permis de mettre en évidence un rôle important de certaines protéines codées par les ISGs dans l'élimination du HEV. C'est le cas d'IRF1, qui permet l'activation de la transcription de STAT1 <sup>545,546</sup>, mais aussi de RIG-I et MDA5 <sup>546</sup>. En effet, il a été montré dans des cellules Huh7 et HepaRG transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) ou le génome du HEV-1 (souche Sar55), qu'IRF1 inhibait la réplication du virus. En effet, IRF1 induit la transcription de *STAT1*, ce qui conduit à une augmentation de son expression et de sa phosphorylation et à la formation du complexe ISGF3 et donc à l'expression des ISGs, indépendamment de l'IFN- $\alpha$  <sup>545</sup>. En utilisant un plasmide codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) transfecté dans des cellules Huh7.5, A549 ou HepaRG, il a été montré que la surexpression de RIG-I inhibe la réplication du HEV via l'induction de la transcription de nombreuses ISGs <sup>546</sup>. Il a également été montré que cette induction d'ISGs est indépendante d'une production d'IFN-I. En effet, la surexpression de RIG-I n'induisait aucune synthèse des ARNm codant pour les IFN- $\alpha$ /- $\beta$ /- $\lambda$ ,

malgré une activation de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules huh7.5. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de JAK a montré que l'activité anti-HEV de RIG-I n'était que partiellement inhibée, suggérant que RIG-I active la transcription d'ISGs et exerce son activité antivirale partiellement via l'activation de la voie JAK-STAT.

## 2- Contrôle de la réponse IFN-I par le HEV

En plus d'activer la réponse IFN-I, quelques études ont mis en évidence une modulation du système IFN-I par le HEV (Figure 21). Dans des cellules A549 infectées avec du virus provenant de fèces d'un patient atteint d'une hépatite chronique, il a été montré que le HEV-3 inhibe la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- $\alpha$  et atténue l'expression de certains ISGs<sup>547</sup>. En utilisant un clone infectieux codant pour le génome du HEV-3 (souche Kernow-C1) transfecté dans des cellules Huh7, il a été montré une inhibition de la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- $\alpha$  et une atténuation de l'expression de certains ISGs<sup>548</sup>. En utilisant le même clone infectieux, il a été rapporté une inhibition de l'expression de certains ISGs (Mx1, IFIT1, IFIT3 et CXCL10) induites par les IFN- $\alpha$ / $\gamma$ / $\lambda$  dans des cellules HepG2<sup>549</sup>.

En contexte de surexpression dans les cellules A549, une étude a montré que l'ORF3 du HEV-3 est capable de s'associer à STAT1 et d'inhiber sa phosphorylation<sup>547</sup>. L'ORF3 est également capable de se lier à et d'activer SIRP $\alpha$ . En activant SIRP $\alpha$ , l'ORF3 du HEV est capable d'inhiber l'activation d'IRF3<sup>550</sup>. Au contraire, l'ORF3 du HEV-1 interagirait avec le domaine N-terminal de RIG-I, induirait son ubiquitinylation en K63, conduisant ainsi à son activation<sup>551</sup>. De plus, l'ORF3 du HEV-1 est également capable d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B induite par TLR3 en diminuant l'ubiquitinylation en K63 de RIP-1 dans des cellules A549<sup>552</sup>. Une autre étude a montré que l'ORF3 du HEV-1 inhibe la voie NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  en augmentant l'expression de la DUB A20 dans des cellules A549<sup>553</sup>. A20 enlève les chaînes de polyubiquitine en K63 de RIP-1 et est également capable de polyubiquitinyler RIP-1 en K48 résultant respectivement en une inactivation de RIP-1 et sa dégradation par le protéasome (Figure 14B). Enfin, une troisième étude a montré que l'ORF3 inhibe la voie NF- $\kappa$ B induite par le LPS dans des cellules humaines PMA-THP1, induisant ainsi une inhibition de cytokines pro-inflammatoires<sup>554</sup>.

Des études ont mis en évidence un rôle de l'ORF2 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, l'ORF2 est capable d'inhiber la voie de signalisation NF- $\kappa$ B en empêchant l'ubiquitinylation et donc la dégradation de I $\kappa$ B<sup>555</sup>. Il a également été montré que la protéine TMEM134 (pour *transmembrane protein 134*) interagit avec l'ORF2 et régule négativement l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par l'ORF2<sup>556</sup>.

Peu d'études ont été encore réalisées sur l'effet de l'ORF1 du HEV sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Seule une étude a été publiée sur le HEV-1. Il a été montré que les domaines X et PCP de l'ORF1 sont capables d'inhiber la synthèse des ARNm codant pour l'IFN- $\beta$  induite par la stimulation au poly(I:C) mais également d'inhiber l'activation du promoteur IFN- $\beta$  induite par le SeV dans un test rapporteur luciférase. De plus, le domaine X est également capable d'inhiber l'activation du promoteur IFN- $\beta$  induite par RIG-I, MDA5, TBK1 et IKK $\epsilon$ . En étudiant le mécanisme responsable de l'inhibition, il a été montré que le domaine X de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de l'IRF3 induite par une stimulation au poly(I:C) et que le domaine PCP possède une activité DUB et déubiquitinye RIG-I et TBK1 dans des cellules HEK293T<sup>557</sup>. Ces résultats ont ensuite été confirmés après transfection de cellules Huh7-S10-3 avec un clone infectieux codant pour le génome du HEV-1 (souche pSK-E2). Une étude en double hybride en levure, visant à rechercher des interacteurs cellulaires des différents domaines du HEV, a mis en évidence des potentielles interactions entre les différents domaines de l'ORF1 et des protéines impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte comme le domaine X et la protéine JAK2, le domaine hélicase et la protéine TAB1, le domaine RdRp et l'ISG56<sup>558</sup>. Cependant, ces interactions restent encore à confirmer.

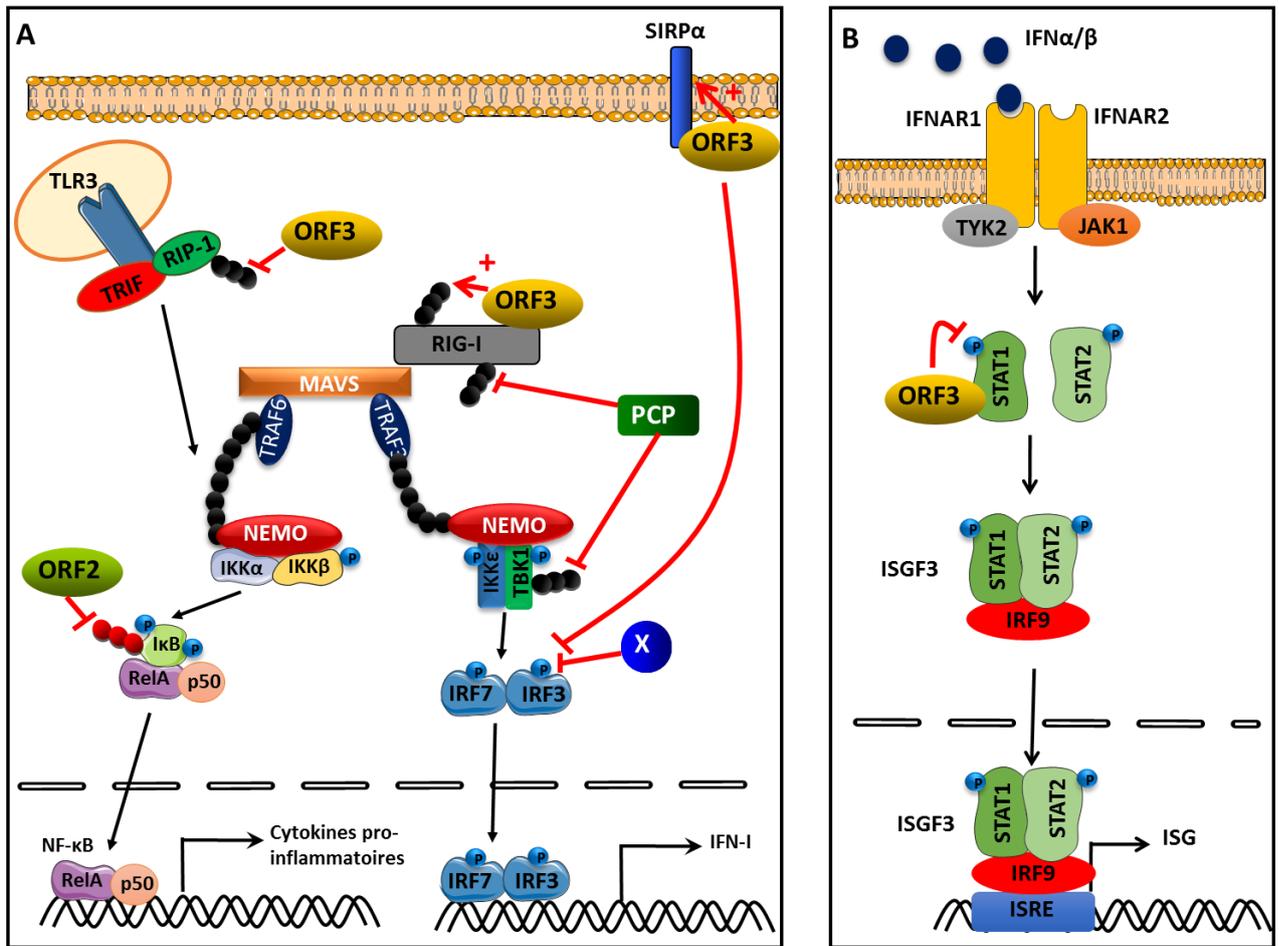


Figure 21. Inhibition des voies de synthèse de l'IFN-I (A) et de réponse à l'IFN-I (B) par les différents domaines de l'ORF1, l'ORF2 et l'ORF3 du HEV.



## **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

---

Le HEV est l'agent responsable d'une hépatite aiguë chez l'homme qui peut évoluer en hépatite fulminante, notamment chez la femme enceinte. Le HEV est endémique dans les pays en développement mais de nombreux cas ont également été recensés dans les pays industrialisés dont la France. De plus, le HEV est endémique dans les élevages porcins, et la transmission zoonotique par la consommation de produits à base de porcs infectés en fait un véritable problème de santé publique en Europe. Par ailleurs, la description récente de cas chroniques d'hépatite E, évoluant vers des atteintes sévères du foie, renforce le besoin de mieux caractériser les interactions étroites du HEV avec son hôte. Cependant, du fait de l'absence de système de culture efficace du HEV, peu d'études ont pu être réalisées. En outre, il y a peu de données sur les interactions du HEV avec le système immunitaire de l'hôte. L'IFN-I jouant un rôle crucial dans la réponse antivirale de l'hôte, nous avons souhaité étudier l'interaction du HEV avec ces voies de signalisation. L'objectif de cette thèse était donc d'étudier la capacité du HEV à activer et moduler la réponse IFN-I.

Le premier objectif de mon projet de thèse était de déterminer si l'ORF1 ou les différents domaines qui la composent ont un effet sur l'activation des voies de signalisation de l'IFN-I. En effet, un grand nombre de virus ont mis en place des stratégies pour inhiber les voies de synthèse de l'IFN-I et de réponse à l'IFN-I. Cette capacité d'inhibition est le plus souvent portée par les protéines non-structurales. L'ORF1 code pour une polyprotéine possédant plusieurs fonctions non-structurales dont les rôles ne sont pas encore bien établis. Au début de mes travaux de thèse en 2014, aucune étude n'avait été publiée sur l'effet de l'ORF1 sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Les domaines PCP et X du HEV sont homologues à des domaines retrouvés chez d'autres virus à ARN positif et pour lesquels un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire innée, et notamment celle du système IFN-I, a été démontré. Nous avons donc émis l'hypothèse que les domaines PCP et X du HEV pourraient également jouer un rôle dans la modulation de ces voies de signalisation. De plus, nous avons également souhaité étudier l'effet du domaine Y sur les voies de signalisation de l'IFN-I car sa fonction n'était pas connue.

Le deuxième objectif de mon projet de thèse a consisté en l'étude de la capacité du HEV à induire la production d'IFN-I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Ces cellules font partie de la première ligne de défense de l'organisme lors d'une infection par un agent pathogène. Les pDCs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative en produisant de grandes quantités d'IFN-I, permettant ainsi le contrôle des infections. Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'activation des pDCs par le HEV. L'étude des interactions entre ces cellules et le HEV permettra de mieux comprendre le rôle de ce type cellulaire dans le contrôle de l'infection virale.

Les deux parties de mon projet de thèse avaient donc pour objectif d'acquérir de nouvelles connaissances sur les fonctions des différents domaines non structuraux de l'ORF1, en particulier vis à vis de la réponse IFN-I, et sur l'interaction du HEV avec les acteurs précoces de la réponse immunitaire comme les pDCs. Ces connaissances pourront permettre de mieux lutter contre l'infection par le HEV.