

---

## LE VIRUS DE L'HÉPATITE E

Le virus de l'hépatite E (HEV) est responsable d'une hépatite aiguë à transmission entérique chez l'homme qui peut évoluer en hépatite fulminante dans 1-4% des cas et chez 20% des femmes enceintes.

L'existence du HEV a été mise en évidence pour la première fois en 1978 pendant une épidémie d'hépatite dans le Cachemire en Inde n'étant causée ni par le virus de l'hépatite A (HAV) ni par le virus de l'hépatite B (HBV) <sup>1</sup>. Par la suite, l'infection expérimentale par voie orale d'un volontaire avec des extraits de fèces provenant d'un patient infecté <sup>2</sup> permit la mise en évidence de l'excrétion de VLP (pour *virus-like particles*) de 27 à 30nm de diamètre dans les fèces associée au développement d'une hépatite. Le génome de ces particules de HEV fût cloné et séquencé au début des années 90 en utilisant des échantillons provenant de macaques infectés <sup>3,4</sup>.

Depuis sa découverte, de nombreuses souches de HEV ont été identifiées : ces souches ont pu être classées chez l'homme en quatre géotypes mais de nombreuses autres souches ont également été retrouvées dans différentes espèces animales comme les porcs domestiques, les sangliers, les cerfs, les lapins, les mangoustes, les furets, les rats, les poulets, les chauves-souris ou la truite fardée. De plus, le HEV est capable de se transmettre de l'animal vers l'homme, ce qui en fait un agent zoonotique. Le HEV a principalement été retrouvé dans les pays en voie de développement, où il infecte la population de manière endémique mais de nombreux cas ont également été recensés dans les pays industrialisés comme la France.

### A- Classification du HEV

Le HEV appartient à la famille des *Hepeviridae*. Les différentes souches de HEV se divisent en deux genres : les *Orthohepevirus*, contenant toutes les souches de HEV de mammifères et d'oiseaux, et les *Piscihepevirus* comprenant uniquement la souche retrouvée chez la truite fardée (Figure 1) <sup>5</sup>. Au sein du genre *Orthohepevirus*, quatre espèces peuvent être distinguées : les *Orthohepevirus A* comprenant les souches présentes chez l'homme, le porc,



## B- Situation épidémiologique du HEV

### 1- Distribution du HEV chez l'homme

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le HEV est responsable de 20 millions d'infections par an chez l'homme. Cependant, tous les pays ne sont pas touchés de la même manière. On peut distinguer deux principales zones (Figure 2) :

- les pays en voie de développement dans lesquels les virus HEV-1 et HEV-2 infectent la population de manière endémique. Le HEV-1 est retrouvé dans de nombreux pays d'Asie ainsi que d'Afrique du nord et d'Afrique du sud. On le retrouve également dans certains pays d'Amérique latine. Le HEV-2 est retrouvé essentiellement dans certains pays d'Afrique centrale et au Mexique <sup>7</sup>.

- les pays développés dans lesquels les virus HEV-3 et HEV-4 sont présents uniquement sous forme de cas sporadiques au sein de la population. Le HEV-3 est retrouvé en Amérique du nord, Europe, Australie, Japon et dans certains pays d'Amérique du sud (Chili, Argentine, Pérou). Le HEV-4 est quant à lui retrouvé dans certains pays de l'Est de l'Asie <sup>7</sup> et plus occasionnellement en Europe (Italie, France) <sup>8</sup>.

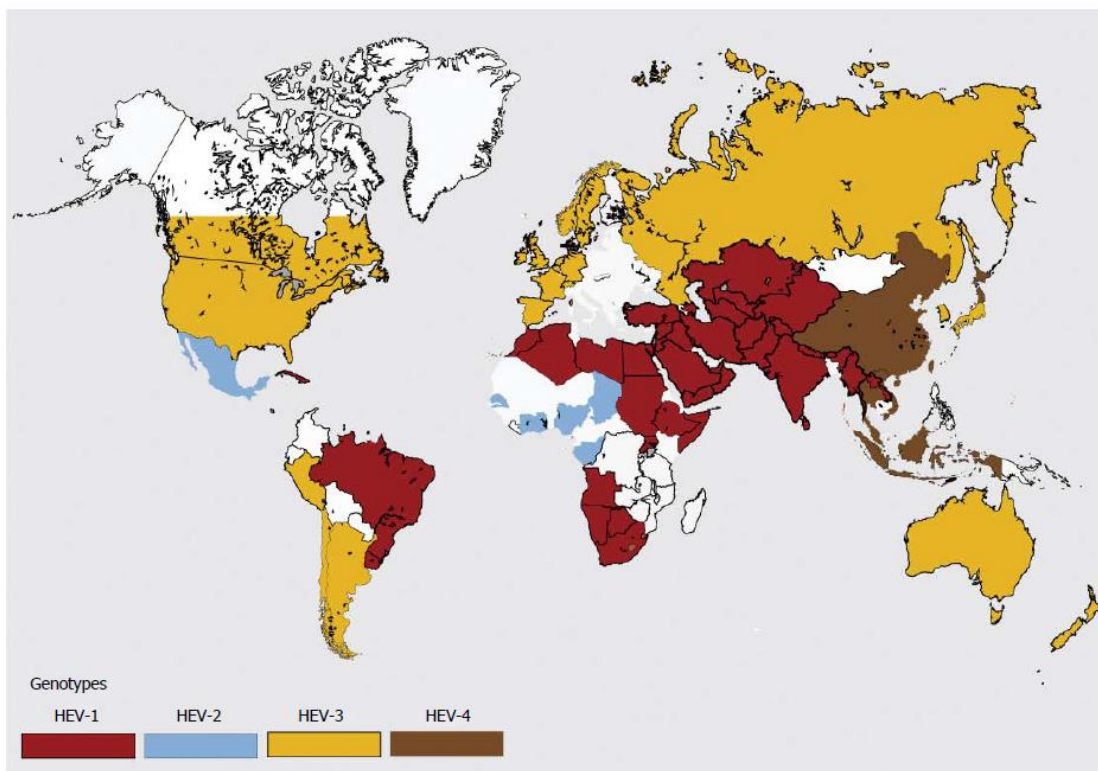


Figure 2. Distribution du HEV chez l'homme <sup>7</sup>.

## 2- Distribution du HEV chez l'animal

Le génome du HEV a été détecté à la fois chez des animaux domestiques mais également chez des animaux sauvages (Figure 3). En 1995, des anticorps anti-HEV et de l'ARN viral ont été détectés pour la première fois chez des porcs domestiques au Népal <sup>9</sup>. Deux ans plus tard, le HEV fût détecté dans des élevages de porcs aux Etats-Unis et caractérisé génétiquement <sup>10</sup>. Depuis, des anticorps anti-HEV ont été détectés dans 46-100% des élevages porcins à travers le monde, ce qui fait du porc domestique le principal réservoir animal du HEV <sup>6</sup> (Figure 3). Les souches responsables de l'infection chez le porc sont les HEV-3 et HEV-4 <sup>6</sup>. Les HEV-3 et HEV-4 ont également été retrouvés chez le sanglier, qui représente, avec le porc domestique, l'un des principaux réservoirs du HEV <sup>6</sup>. Des virus de génotypes différents, HEV-5 et HEV-6 ont également été retrouvés chez le sanglier au Japon <sup>11,12</sup>. Le HEV-3 a également été retrouvé dans différentes espèces de cerfs à travers le monde (Figure 3) ainsi que chez la mangouste japonaise <sup>13,14</sup>. De plus, une souche de HEV-3 de lapin (HEV-3ra) a été identifiée dans des lapins d'élevage en Chine <sup>15</sup>, en Mongolie <sup>16</sup>, aux Etats-Unis <sup>17</sup>, dans des lapins d'élevage et des lièvres en France <sup>18</sup>, chez des lapins et des lièvres en Allemagne <sup>19</sup> mais également chez un lapin de compagnie en Italie <sup>20</sup>. Le HEV-4 a été retrouvé chez des Yaks en chine <sup>21</sup>. Du HEV de génotype 7 (HEV-7) a été retrouvé dans des échantillons fécaux de chameaux au Moyen-Orient <sup>22</sup>. Une souche de HEV a également été retrouvée dans des élans en Suède mais cette souche n'a pas encore été attribuée à un génotype particulier <sup>23</sup>. Récemment une souche de HEV de génotype 8 (HEV-8) a été identifiée dans un chameau de Bactriane <sup>24</sup>.

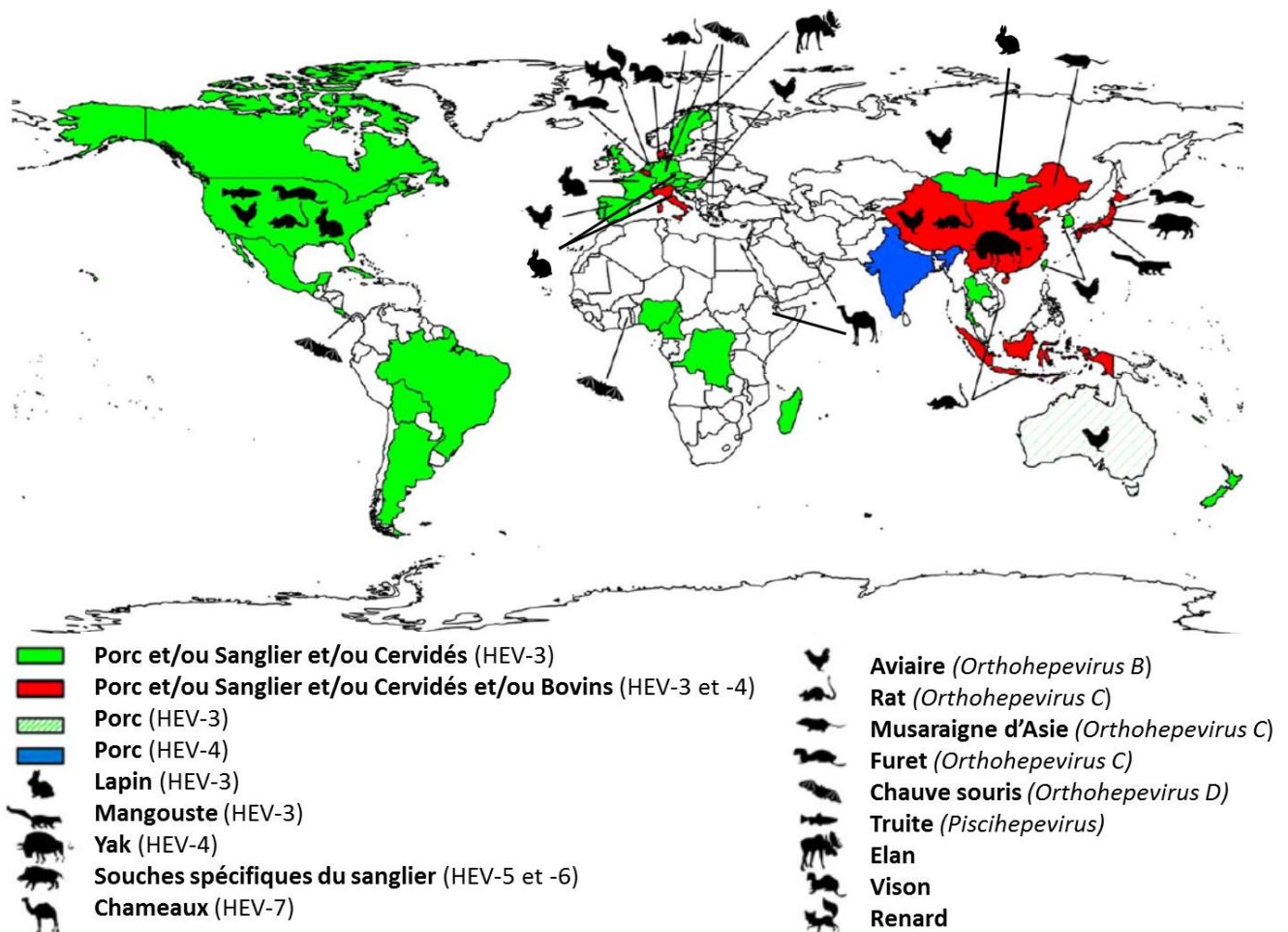
D'autres espèces animales infectées par d'autres souches de HEV ont été décrites. Des souches de HEV ont été retrouvées chez les oiseaux (*Orthohepevirus B* ; Figure 1). Le HEV aviaire a été décrit pour la première fois en Australie en 1999 <sup>25</sup> puis aux Etats-Unis, et est associé à une maladie : la splénomégalie hépatique <sup>26</sup>. Le HEV aviaire est enzootique dans les élevages de poulets aux Etats-Unis avec une séroprévalence de 71% <sup>27</sup> et il a également été retrouvé dans des élevages en Espagne, Russie, Corée, Taiwan et en Chine <sup>28</sup>. Le HEV aviaire a récemment été retrouvé dans des oiseaux sauvages en Hongrie <sup>29</sup>.

Parmi les *Orthohepevirus C* (Figures 1 et 3), une souche de HEV a été retrouvée chez le rat, avec une séroprévalence variant de 13 à 90% dans de nombreux pays <sup>30</sup>. D'autres souches de

HEV ont été retrouvées chez les furets aux Pays-Bas et au Japon, chez les visons au Danemark, chez la musaraigne en Chine et chez le renard au Pays-Bas <sup>28</sup>.

D'autres souches ont été identifiées dans différentes espèces de chauves-souris en Amérique centrale, Afrique et Europe et ont été classées dans l'espèce des *Orthohepevirus D* (Figure 1) <sup>31</sup>. Très récemment, une souche a été retrouvée chez le faucon crécerelle et le faucon kobez en Hongrie mais n'a pas encore été attribuée à un génotype particulier <sup>32</sup>. Enfin, une souche de HEV a été retrouvée dans la truite fardée aux Etats-Unis (*Piscihepevirus* ; Figure 1) <sup>33</sup>.

De plus, des anticorps anti-HEV ont également été détectés dans de nombreuses autres espèces comme les chiens, chats, moutons, chèvres, chevaux, rongeurs, bovins, canards, pigeons, et chez des primates non-humains. La présence de ces anticorps suggère que ces espèces ont été exposées au HEV ou à un agent similaire <sup>28</sup>.



**Figure 3. Distribution géographique du HEV chez les animaux.**

(Adapté de « hepatitis E virus and related viruses in animals » Thiry, 2017 <sup>28</sup>)

## C- Signes cliniques de l'hépatite E

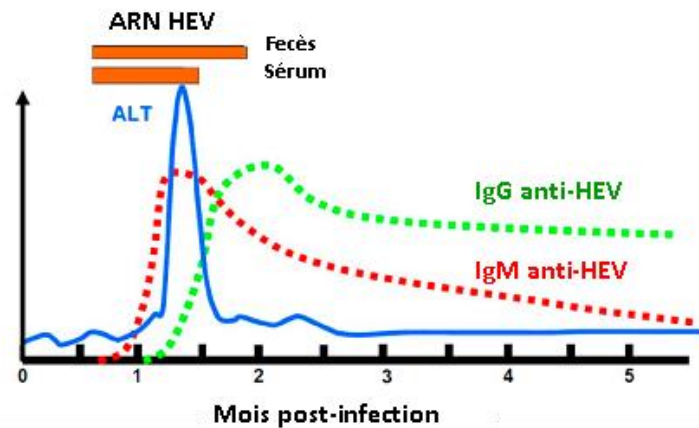
Aucune pathologie due à HEV n'a encore été détecté chez la plupart des animaux infectés. La seule souche de HEV pour laquelle une pathologie chez l'animal a été décrite est le HEV aviaire qui est responsable d'un syndrome de splénomégalie hépatique chez le poulet <sup>26</sup>.

Chez l'homme, le HEV est le plus souvent asymptomatique (70% des cas) <sup>34</sup> mais peut également présenter différentes formes cliniques d'hépatites : des formes aiguës, fulminantes ou chroniques. De plus, des manifestations extra-hépatiques comme des atteintes neurologiques liées au HEV ont été mises en évidence.

### 1- Hépatite aiguë/fulminante

La maladie commence après une période d'incubation de 2 à 6 semaines <sup>35</sup>. Le pic de virémie a lieu au moment de l'apparition des premiers symptômes et est concomitant avec un pic de transaminases et la mise en place d'une réponse anticorps anti-HEV (Figure 4). Les immunoglobulines M (IgMs) anti-HEV sont détectées dans la phase précoce de la maladie et peuvent persister pendant plusieurs mois. Les immunoglobulines G (IgGs) anti-HEV apparaissent après la réponse IgM et peuvent persister pendant plusieurs années. Vers 6 semaines post-infection, le virus n'est plus détecté dans le sérum alors qu'il ne l'est plus à partir de 8 semaines post-infection dans les fèces (Figure 4).

Les symptômes cliniques durent 1-2 semaines et sont classiquement de la fièvre, de la fatigue, des douleurs musculaires et abdominales, des maux de tête, des nausées, une anorexie, une perte de poids, des diarrhées, une jaunisse (dans 60% des cas), du prurit et des urines noires <sup>36</sup>. Le taux de mortalité varie de 0.5 à 4% des cas d'infections symptomatiques <sup>1,37</sup>. Cependant, ce taux peut atteindre 30% chez la femme enceinte pendant le troisième trimestre de la grossesse <sup>38</sup>. La cause de la mort peut soit venir de complications pendant la grossesse soit d'une insuffisance hépatique aiguë. Ces complications ont été observées uniquement pour le HEV-1. Dans les pays développés, les femmes enceintes ne semblent pas particulièrement touchées lors d'infections par le HEV-3 <sup>35</sup>.



**Figure 4. Evolution d'une infection aiguë par le HEV <sup>35</sup>.**

ALT : Alanine aminotransférase. L'ALT est une enzyme du foie dont l'augmentation dans le sang est le signe d'une cytolysé hépatique.

## 2- Hépatite chronique

La forme chronique du HEV ne s'observe que chez les populations immunodéprimées telles que chez les receveurs d'organes sous traitement immunosuppresseur, les personnes qui présentent des maladies hématologiques ou les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) <sup>7</sup>. Des cas de formes chroniques ont été rapportés que pour les HEV-3 et HEV-4. Une hépatite devient chronique quand le HEV persiste dans le sang pendant 6 mois après l'infection. L'hépatite chronique peut conduire vers une cirrhose, qui peut entraîner une insuffisance hépatique majeure et le décès du patient.

## 3- Manifestations extra-hépatiques

Des manifestations extra-hépatiques peuvent survenir chez les patients présentant une hépatite aiguë ou chronique. Des problèmes neurologiques comme des syndromes de Guillain-Barré, de Parsonnage-Turner, une amyotrophie névralgique, une encéphalite, une myosite et une méningo-encéphalite <sup>39</sup> ont été décrits chez des patients infectés. La cause de ces atteintes neurologiques n'est pas encore très claire mais des études récentes semblent indiquer que le HEV pourrait être un virus neurotrope <sup>40-43</sup>. Des atteintes rénales ont également été rapportées. Cependant, la cause de ces atteintes n'est pas encore connue et il n'y a aucune preuve montrant que le HEV pourrait se répliquer dans des cellules rénales

<sup>35</sup>.



## D- Transmissions du HEV

### 1- Transmissions interhumaines du HEV

#### a- Transmission via des eaux contaminées



**Figure 5. Région épidémique (Cachemire, 1978) <sup>44</sup>.**

L'eau potable est collectée dans un canal dans lequel se déversent les latrines publiques et les déchets. De plus, les ustensiles et le linge sont lavés dans cette eau et le poisson y est pêché.

Le HEV se transmet principalement par voie féco-orale. Dans les pays en développement, la contamination fécale des réserves d'eau a été associée à de nombreuses épidémies de HEV, comme par exemple celle au Cachemire en Inde en 1978 qui toucha 20 083 personnes (Figure 5) <sup>1,45-47</sup>. Il a été montré que les sources d'eau de consommation contiennent de nombreuses colonies d'*Escherichia coli* (*E. coli*), suggérant une contamination fécale, et que les communautés qui utilisent d'autres sources d'eau de boisson (comme par exemple de l'eau provenant de puits protégés), avant ou pendant les épidémies, ne développent pas la maladie <sup>1</sup>. De plus, différentes études ont montré que les eaux usées contiennent des souches de HEV similaires à celles responsables des infections animales et humaines <sup>48-50</sup>. Par exemple, l'analyse d'échantillons d'eaux usées dans le nord de l'Inde a montré que 41% étaient contaminées par de l'ARN du HEV-1 <sup>48</sup>.



Différents paramètres vont contribuer à la contamination des eaux : une mousson abondante, des inondations entraînant la stagnation des eaux et la pollution des sources d'eau potable, les eaux usées déversées dans les sources d'eau potable comme les rivières, les fleuves, les puits non protégés mais également via les canalisations d'eau potable fendues passant à travers les égouts <sup>7</sup>. Ces sources d'eau contaminées vont ensuite être utilisées pour la consommation, se laver, laver le linge et les ustensiles de cuisine (Figure 5), entraînant des épidémies.

#### *b- Transmission directe du HEV*

Il n'est pas encore clairement établi si le HEV peut se transmettre directement entre personnes. En général, les épidémies ne sont pas suivies par une deuxième vague de cas d'hépatites secondaires et il y a peu de transmission au sein d'une famille. Cependant, une épidémie de HEV causant 10 196 cas dont 160 morts dans le nord de l'Ouganda en 2007-2008 a été causée par des transmissions directes entre personnes <sup>51</sup>. En effet, pendant cette épidémie, le HEV ne fut pas retrouvé dans les eaux et aucun lien avec une potentielle origine zoonotique ne fut établi. Les personnes infectées avaient été en contact avec des personnes atteintes de jaunisse, avaient assisté à un enterrement d'une personne décédée du HEV ou se lavaient les mains dans une unique bassine familiale avant le repas.

#### *c- Transmission par transfusion sanguine*

Les premiers cas de transmission du HEV par transfusion sanguine furent décrits au Cachemire en Inde en 2004. Dans cette étude, 13 infections par le HEV-1 sur 145 sujets transfusés furent détectées <sup>52</sup>. A la suite de cette étude, de nombreux autres cas de transmission du HEV par transfusion sanguine furent décrits dans différents pays. Parmi eux, des cas de transmission du HEV-3 ont été décrits, notamment en Angleterre où 18 patients sur 42, transfusés avec du sang contaminé, avaient contracté une infection par le HEV-3 <sup>53</sup>. L'étude de la virémie chez les donneurs de sang a été réalisée dans différents pays et un don sur 672 en Allemagne et un sur 8416 en Autriche sont positifs pour le HEV. De même, il a été estimé qu'il y a eu entre 80 000 et 100 000 infections par le HEV associées à une transfusion

sanguine en Angleterre en 2013, et que sur les 7.4 millions de dons annuels en Allemagne, entre 1600 et 5900 sont associés à une infection par le HEV <sup>7</sup>. Récemment, une étude a montré que sur 10 569 donateurs de sang en France, 22.4% présentaient des Immunoglobulines G (IgG) anti-HEV et 1% présentait des IgM anti-HEV <sup>54</sup>. Toujours en France, la présence d'ARN viral a été détectée dans un don sur 2218 dans une étude réalisée en 2014 <sup>55</sup> et un don sur 744 en 2017 <sup>56</sup>. Au vu de ces données, un dépistage systématique des dons de sang devrait être réalisé dans les pays à forte prévalence pour le HEV.

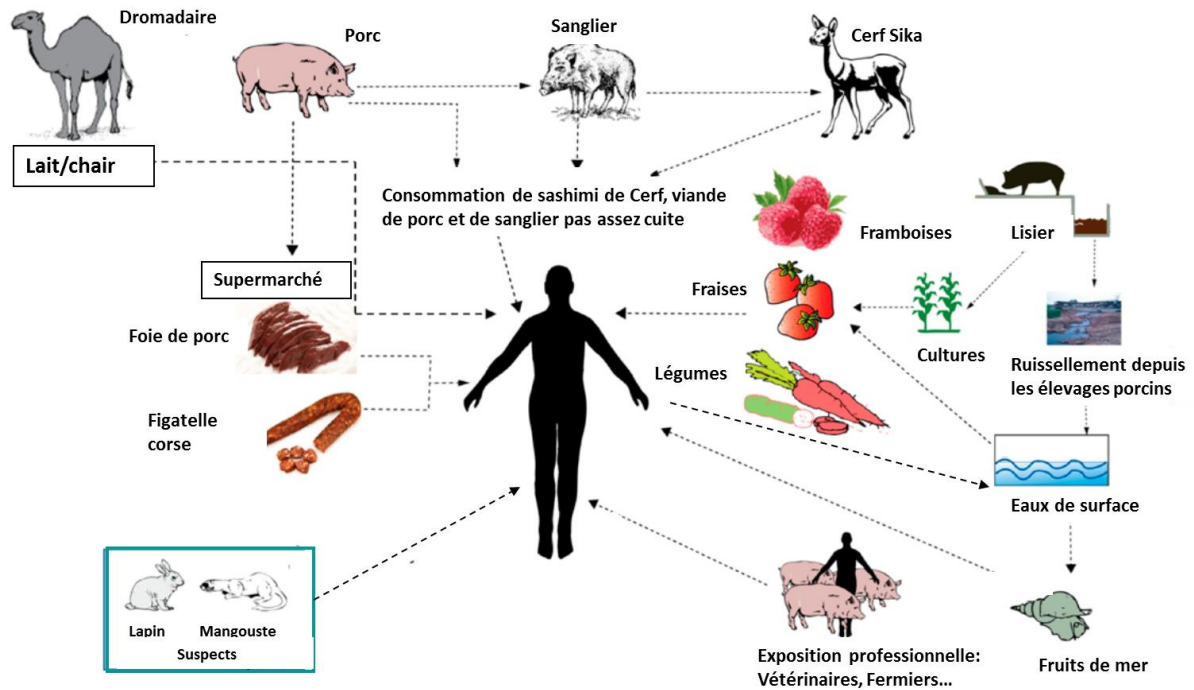
#### *d- Transmission verticale de la mère à l'enfant*

Le HEV peut être transmis de manière verticale de la mère infectée au fœtus. Dans une étude au Cachemire en Inde, 6 mères infectées sur 8 ont transmis le virus à leur enfant <sup>57</sup>. Dans une autre étude sur 26 femmes enceintes infectées par le HEV-1, 5 d'entre elles sont mortes avant l'accouchement et 4 ont eu un enfant prématuré. Parmi les 19 nouveau-nés suivis, 15 ont été infectés par le HEV pendant la grossesse et ont développé des symptômes de la maladie, conduisant à une mort prématurée pour 7 d'entre eux <sup>58</sup>. Par la suite, de nombreux autres rapports ont montré une transmission intra-utérine du HEV-1 associée à un fort taux de mortalité pour la mère et le fœtus <sup>44</sup>. Récemment, il a été montré que le HEV est capable de se répliquer dans le placenta de mères infectées <sup>59</sup>. En ce qui concerne le HEV-3, un cas de femme infectée pendant la grossesse et présentant une hépatite aiguë a été observé en France, mais l'infection n'a pas eu de conséquence sur la mère ni sur le fœtus <sup>60</sup>. Le cas d'une femme infectée par le HEV-3c et présentant des symptômes d'hépatite aiguë a été décrit en Allemagne et là aussi, l'infection n'a eu aucune conséquence sur la grossesse ou la santé du nouveau-né <sup>61</sup>.

## **2- Transmission zoonotique du HEV : HEV-3 et -4**

Le HEV est un virus zoonotique ayant pour principaux réservoirs les porcs domestiques et les sangliers. La comparaison entre des séquences de virus d'origine humaine ou porcine ont montré plus de 99% d'identité, suggérant que le virus n'a pas besoin d'adaptation pour passer la barrière d'espèce <sup>62</sup>. Il existe trois principaux modes de transmission de l'animal vers l'homme : la consommation de viande infectée, un contact direct avec les animaux infectés et

indirectement via la consommation de fruits ou légumes cultivés ou fruits de mer produits dans des eaux contaminées par les selles d'hommes ou d'animaux infectés (Figure 6).



**Figure 6. Modes de transmission zoonotique des HEV-3 et HEV-4.** <sup>44</sup>  
(Voir texte pour explications détaillées).

Des cas de contamination de l'homme via la consommation de viande de porc, de sanglier ou de cerf ont été rapportés dans plusieurs publications. La transmission zoonotique du HEV à l'homme a été décrite pour la première fois en 2003 après la découverte de cas d'infection par le HEV chez des patients ayant consommés des sashimis de cerf Sika (tranches de viande crue) <sup>63</sup>. La séquence du HEV était identique entre la viande de cerf et celle retrouvée chez les patients. Par la suite, d'autres publications ont mis en évidence la transmission du HEV via la consommation de viande infectée: de la viande de sanglier grillée au Japon, de la viande de porc en Espagne ainsi que de la figatelle en Corse <sup>6</sup>. De nombreux autres rapports ont montré un lien entre des cas de HEV et la consommation de produits alimentaires à base de porc ou de sanglier crus ou pas assez cuits (viande, foie, pâté de foie, figatelle ou tout autre produit à base de foie) <sup>6</sup>. Une étude récente a également montré un lien entre la consommation de viande de porc ou de sanglier et de produits à base de foie de porc et la présence d'anticorps anti-HEV dans le sang des donneurs en France <sup>54</sup>. De plus, l'ARN des

HEV-3 et -4 est présent dans la chaîne alimentaire à travers le monde : 3-11% des foies de porcs sont positifs pour le HEV à l'abattoir <sup>6</sup>. L'ARN du HEV a également été détecté dans différents aliments à base de foie de porc dans de nombreux pays <sup>6</sup>. Par exemple, en France, une étude a montré que 30% des figatelles, 25% des pâtes à quenelles, et 29% des saucisses de foie disponibles dans le commerce étaient positives pour l'ARN du HEV <sup>64</sup>. De nombreuses études ont montré que l'ARN viral retrouvé dans la chaîne alimentaire pouvait être infectieux. Notamment, aux Etats-Unis, l'inoculation de porcs par voie intraveineuse, d'une préparation contenant des foies de porcs contaminés a entraîné une infection <sup>65</sup>. De plus, le HEV a été cultivé avec succès dans des cellules humaines en utilisant des extraits de figatelles produites en France <sup>66</sup> ou du foie de porc cru vendu au Japon <sup>67</sup>.

D'autres aliments peuvent être contaminés par le HEV et être responsables de transmissions zoonotiques. Le HEV a notamment été retrouvé dans différents fruits de mer tels que des mollusques bivalves et des moules <sup>6</sup>. La transmission zoonotique via la consommation de fruits de mer n'a pas encore été clairement démontrée mais un lien a été établi entre la consommation d'huîtres et une épidémie de HEV lors d'une croisière <sup>68</sup> et un cas d'hépatite E chez un patient qui avait voyagé au Vietnam <sup>69</sup>.

Par ailleurs, l'ARN du HEV a été retrouvé dans des fraises au Canada, dans des framboises surgelées ou des légumes vendus en Europe, suggérant que les fruits et légumes peuvent aussi être contaminés par le HEV <sup>6</sup>. La présence du HEV dans les fruits de mer, les fruits et légumes serait due à la contamination, par les eaux usées, de l'eau utilisée pour leur culture (Figure 6).

Enfin, des études de séroprévalence ont suggéré que le contact direct avec les animaux infectés était un facteur de risque d'infection par le HEV. En effet, une séroprévalence plus élevée a été retrouvée chez les vétérinaires et personnes travaillant dans les élevages porcins dans de nombreux pays, chez des bouchers au Burkina faso et aussi chez des personnes travaillant dans les forêts en France et en Allemagne, que dans les populations témoins respectives <sup>6</sup>.

Cependant, pour d'autres animaux comme le lapin ou la mangouste, il n'est pas encore très clair si le virus peut, ou non, passer la barrière d'espèce et infecter l'homme. L'infection de singes cynomolgus avec une souche de HEV de lapin <sup>70</sup> ainsi que l'identification d'une souche humaine présentant 80.3%-85% d'identité nucléotidique avec différentes souches de lapin <sup>71</sup>

suggèrent que la transmission du HEV-3 du lapin vers l'homme est possible. Dans une étude récente, 5 patients sur 919 infectés par le HEV en France avaient été infectés par une souche de HEV de lapin <sup>72</sup>. Cependant, aucun des patients n'avait été en contact avec un lapin, suggérant une transmission via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Récemment, la découverte d'un cas humain qui consommait régulièrement de la viande et du lait de chameau suggère fortement que le HEV-7 serait transmissible du chameau à l'homme <sup>73</sup>. Une autre étude a récemment montré la présence de HEV-4 dans du lait de vaches infectées <sup>74</sup> et que l'ingestion du lait contaminé entraînait l'infection de macaques rhésus. Cette étude suggère que le lait pourrait aussi être responsable d'une transmission zoonotique du HEV, cependant cette étude reste unique et ces résultats restent à confirmer.

#### **E- Prévention et traitements**

La présence de HEV dans la chaîne alimentaire et l'augmentation du nombre de cas d'hépatite E détectés en France ces dernières années fait du HEV un véritable problème de santé publique. Un vaccin, basé sur l'expression de la protéine de capsid tronquée du HEV (Heoclin®), confère une protection complète chez l'homme contre le virus après trois injections et est commercialisé en Chine depuis 2012 <sup>75</sup>. Cependant, l'utilisation de ce vaccin n'a pas encore été approuvée dans les autres pays.

Chez les personnes immunocompétentes, seul le traitement des symptômes est prescrit. Lorsque la maladie devient plus sévère, des thérapies appropriées peuvent être proposées comme un traitement de 3 semaines avec de la Ribavirine qui permet une amélioration rapide des fonctions hépatiques <sup>76</sup>. Chez les patients transplantés, l'hépatite chronique peut être traitée en diminuant l'immunosuppression, permettant ainsi une guérison chez 30% des patients <sup>77</sup>. Chez les patients atteints d'une hépatite chronique, il existe généralement deux autres traitements : l'interféron pégylé <sup>78</sup> et la ribavirine, qui est le traitement le plus administré <sup>79</sup>. Cependant, ces deux thérapies ont de nombreux effets secondaires et sont contre-indiquées chez la femme enceinte. D'autres traitements sont donc nécessaires pour le HEV. Le sofosbuvir, un analogue nucléotidique développé dans le traitement contre le HCV, entrave la réplication du HEV *in vitro* <sup>80</sup>. Récemment, l'efficacité du sofosbuvir a été montrée

chez un patient atteint d'une hépatite chronique <sup>81</sup>. Cependant, une autre étude récente a montré l'absence d'effet du sofosbuvir chez un autre patient atteint d'une hépatite chronique <sup>82</sup>. Il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique du HEV disponible.

La prévention de la transmission du HEV dans les pays en développement consiste en l'approvisionnement en eau potable propre, des sanitaires adéquats et l'amélioration de l'hygiène.

La prévention de la transmission zoonotique repose principalement sur la recommandation de cuire à cœur les produits à base de foie de porc et d'éviter de les consommer crus ou peu cuits. Une étude a montré qu'une inactivation thermique du HEV est efficace dans les produits contenant du foie de porcs infectés avec une cuisson à 71°C pendant 20 minutes <sup>83</sup>. Une autre étude a montré que le HEV était inactivé après 1 min à 80°C <sup>84</sup>. Cependant, l'inactivation a été réalisée ici sur du surnageant de culture alors que, dans la première étude, l'inactivation avait été réalisée directement sur un produit alimentaire.

Par ailleurs, des mesures d'hygiène appropriées, comme le lavage des mains et nettoyage des surfaces et ustensiles doivent être respectées après manipulation de la viande crue. De plus, les effluents provenant des élevages de porcs doivent être éliminés de manière appropriée. L'utilisation de lisier de porc comme engrais pour les cultures doit être contrôlée afin d'éviter tout risque de contamination des sols ou de l'eau.

## **F- Le virus de l'hépatite E**

### **1- Organisation de la particule virale**

Le HEV est un petit virus quasi-enveloppé, possédant une capsidie icosaédrique et dont la taille fait 27 à 34nm de diamètre. La capsidie virale est composée d'une seule protéine, la protéine ORF2, et chaque capsidie est constituée de 180 copies de l'ORF2 arrangées en icosaèdre avec une symétrie T=3 <sup>85</sup>. La capsidie virale contient le génome du HEV, un ARN simple brin de polarité positive. Il fait partie de la superfamille de virus « alpha-like » qui comporte de nombreux virus à ARN positif de plantes et d'animaux tels que le virus de la forêt de Semliki (SFV) et le virus Sindbis (SNV).

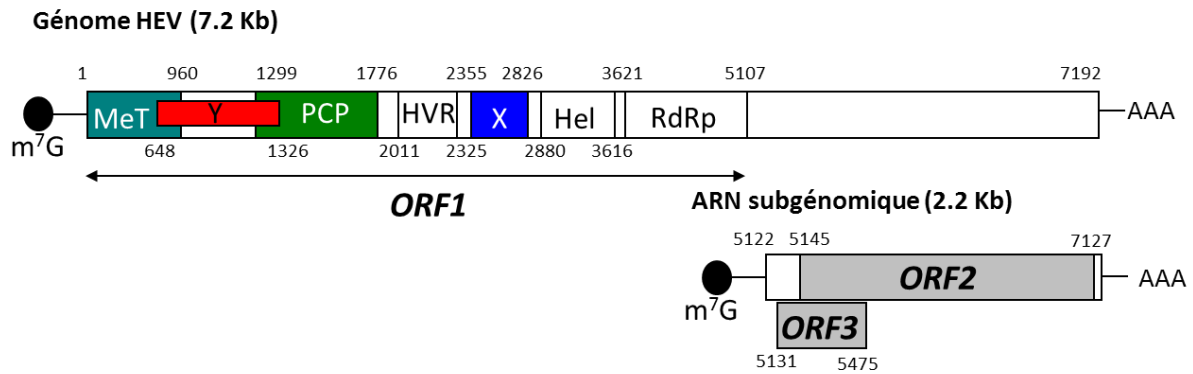


Le HEV a longtemps été considéré comme un virus non enveloppé, car les particules retrouvées dans les fèces sont nues. Cependant, il a été récemment montré que les particules circulantes dans le sang ou présentes dans les surnageants de culture possèdent une membrane lipidique dérivée de la cellule hôte <sup>86</sup>. Le HEV est depuis qualifié de virus « quasi-enveloppé ». La composition de l'enveloppe du HEV a été caractérisée très récemment dans des cellules HepG2/C3A <sup>87</sup>. Elle contiendrait plus de cholestérol, de phosphatidylsérine (PS), de sphingomyéline et de céramides que la membrane des cellules HepG2/C3A mais moins de phosphoinositides et d'acides gras polyinsaturés. Il a été suggéré que la membrane protégerait les particules de la réponse immunitaire de l'hôte.

## 2- Le génome du HEV

Le génome du HEV est composé d'un ARN simple brin de polarité positive de 7.2kb comprenant une coiffe methylguanine à son extrémité 5' et une queue polyA à son extrémité 3' <sup>88</sup> (Figure 7). Le génome possède 3 cadres ouverts de lecture (ORFs) : L'ORF1, codée par l'ARN génomique, correspond à une protéine possédant des motifs de fonctions non structurales ; L'ORF2 et l'ORF3, codés à partir d'un ARN subgénomique, vont respectivement coder pour la protéine de capsid et une phosphoprotéine ayant à la fois des fonctions structurales et non structurales. L'ARN subgénomique présente une taille de 2.2kb, une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. C'est un ARN bicistronique, c'est-à-dire qu'il va permettre la traduction de l'ORF2 et l'ORF3 à partir de deux cadres de lectures différents <sup>89</sup>. Récemment, une protéine supplémentaire, ORF4, a été décrite mais uniquement au sein du génotype 1 du HEV. L'expression de l'ORF4 n'est pas dépendante de la coiffe mais d'un promoteur interne similaire à un IRES (pour *internal ribosome entry site*) situé entre les nucléotides 2701 et 2787 du génome du HEV-1 <sup>90</sup>.

Récemment, un crible double hybride a été réalisée sur l'interactome intravirale du HEV <sup>91</sup>. Ce crible a montré que les différents domaines de l'ORF1, ainsi que l'ORF3, sont capables d'interagir entre eux, suggérant que les différents domaines et protéines composant le génome du HEV coopéreraient pour leurs activités.



**Figure 7. Organisation du génome du HEV, de l'ARN subgénomique et des ORFs.**

Met : domaine méthyltransférase ; PCP : Protéase à cystéine similaire à la papaïne ; HVR : domaine hypervariable ; Hel : hélicase ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante. Les nombres indiquent les positions nucléotidiques des ORFs ou domaines d'ORFs sur le génome.

#### *α- L'ORF1 du HEV*

L'ORF1 code pour une polyprotéine de 1693 acides aminés possédant les fonctions non structurales. Des domaines fonctionnels ont été identifiés (Figure 7): un domaine méthyltransférase (Met), un domaine protéase similaire à la papaïne (PCP), un domaine X ou macrodomaine, une hélicase (Hel) et une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). D'autres domaines n'ont pas encore une fonction connue : c'est le cas du domaine Y et de la région hypervariable (HVR).

Cependant, il n'est pas encore très clair si l'ORF1 est présent au sein des cellules infectées comme une polyprotéine entière ou si elle est clivée en différentes sous unités fonctionnelles, comme c'est le cas pour les autres virus à ARN positif. Certaines études ont montré que la polyprotéine n'était pas clivée. Il a été montré, dans des cellules 293T exprimant l'ORF1, d'une souche de HEV-3 de porc fusionnée avec des étiquettes FLAG et HA aux extrémités amino- (N-) et carboxy- (C-) terminales, que seul un produit de 185kDa était détecté <sup>92</sup>. De même, en infectant des cellules HeLa ou Huh7 avec un virus de la vaccine (VACV) exprimant la polymérase T7, suivi d'une transfection avec un plasmide codant pour l'ORF1 complète, il n'a été rapporté aucun clivage significatif <sup>93</sup>.

Au contraire, d'autres études ont rapporté un clivage en plusieurs fragments de tailles différentes dans d'autres systèmes d'expression. Dans des cellules HepG2 transfectées avec un clone infectieux codant pour le génome complet du HEV, des bandes correspondant aux domaines Met (~35kDa), Hel (~38kDa) et RdRp (~36kDa) furent détectées après

immunoprécipitation <sup>94</sup>. Dans une étude utilisant un système d'expression en baculovirus, la protéine ORF1 était clivée en différents peptides correspondant aux différents domaines fonctionnels décrits <sup>95,96</sup>. Parmi eux, un fragment de 35KDa a été caractérisé comme étant la protéine Met par spectrométrie de masse. Plus récemment, l'expression du domaine protéase en système *E. coli* était capable d'induire le clivage de l'ORF1 en un domaine Met de ~35KDa et un domaine réplicase de ~35KDa <sup>97</sup>. Dans des cellules Huh7-S10, l'expression de l'ORF1 a conduit à la détection de produits clivés de ~35 KDa du côté N-terminal et ~78KDa du côté C-terminal <sup>98</sup>. D'autres études doivent encore être menées pour confirmer ou non le clivage de l'ORF1.

### **Le domaine méthyltransférase (Met)**

Le domaine le plus N-terminal de l'ORF1, situé entre les résidus 60 à 240, est la méthyltransférase virale <sup>99</sup>. La méthyltransférase catalyse le coiffage de l'ARN viral à son extrémité 5'. L'activité méthyltransférase a été mise en évidence dans une étude portant sur l'enzyme de coiffage du HEV. En effet, il a été montré grâce à un système d'expression en baculovirus, qu'une protéine de 110KDa, exprimée à partir des 979 premiers acides aminés de l'ORF1, possédait une activité guanine-7-methyltransferase et guanyltransferase <sup>95</sup>.

### **Le domaine Y**

La fonction du domaine Y est encore peu caractérisée. Très récemment, il a été montré que des mutations de sites nucléotidiques très conservés dans le domaine Y des 4 génotypes humains du HEV, mais également chez d'autres virus « alpha-like », réduisait drastiquement la réplication de l'ARN viral et l'infectivité, suggérant que le domaine Y jouerait un rôle critique dans la réplication du HEV <sup>100</sup>.

### **Le domaine protéase (PCP)**

Le domaine PCP du HEV est situé en aval du domaine Y entre les acides aminés 433 à 592. Ce domaine présente des similarités avec le domaine PCP du virus de la rubéole (RubV) <sup>99</sup> mais également avec d'autres virus de la superfamille « alpha-like », ainsi que de la famille des coronavirus et les artérovirus. La protéine codée par le domaine PCP du RubV est capable de cliver en aval du domaine PCP, au niveau d'une séquence de 3 glycines <sup>101</sup>. Cependant, l'activité protéase du domaine PCP du HEV a d'abord été mise en doute. En effet, dans un

système d'expression utilisant le VACV, une mutation au sein du domaine catalytique potentiel du PCP (Cys483) n'a induit aucun effet sur le clivage de l'ORF1<sup>102</sup>. Plus récemment, des études ont montré que le domaine PCP de l'ORF1 possédait bien une activité cystéine-protéase. En exprimant différents mutants de l'ORF1 dans des cellules Huh7-S10-3<sup>98</sup>, 6 mutants Cys→Ala (C457A, C459A, C471A, C481A, C483A) et 3 mutants His→Leu (H443L, H497L, H590L) étaient capables de bloquer la réplication de l'ARN viral. Parmi eux, les résidus C483 et H590 ont été prédits comme étant les résidus catalytiques potentiels<sup>99</sup>. Dans la même étude, une séquence, similaire à celle du site de clivage présente dans le génome du RubV, a été identifiée comme site de clivage potentiel du domaine PCP du HEV (G815-G816-G817). De plus, des mutations au niveau des résidus G816 et G817 inhibent complètement la réplication virale, suggérant que le clivage jouerait un rôle important pour l'activité des différents domaines. Dans une autre étude, un modèle 3D du domaine PCP a été proposé, suggérant la présence d'un site catalytique C434-H443, d'un domaine de liaison au zinc et d'un domaine de liaison à la calmoduline dépendant du Ca<sup>2+</sup>, similaires aux domaines retrouvés dans le domaine PCP du RubV<sup>103</sup>. L'activité enzymatique du domaine PCP du HEV a été démontrée directement en exprimant et purifiant le domaine PCP en système *E. coli*<sup>97</sup>. Le clivage de l'ORF1 et de l'ORF2 par la PCP a été montré par un test de digestion enzymatique. En utilisant différents inhibiteurs, le domaine PCP a été caractérisé comme étant une protéase similaire à la chymotrypsine. Enfin, une analyse par mutagenèse dirigée a permis d'identifier les sites actifs de la PCP au niveau des acides aminés H443, C472, C481 et C483, confirmant ainsi les études précédentes. Ces différentes études suggèrent donc que le domaine PCP du HEV est bien une protéase fonctionnelle permettant le clivage de l'ORF1.

D'autres activités ont été attribuées au domaine PCP du HEV. Notamment, le domaine PCP, en association avec les domaines Met et Y (domaine « MetPCP ») possède une activité de déubiquitinylation et de déISGylation des protéines<sup>104</sup>. L'ISG15 est une molécule similaire à l'ubiquitine qui va modifier la fonction d'une protéine cible via un mécanisme d'ISGylation (voir paragraphe II-C-1-b-).

### **Le domaine hypervariable (HVR)**

La fonction de la région HVR n'est pas encore clairement établie. Cependant, différentes études semblent indiquer que cette région aurait un rôle dans la réplication et l'infectivité

du génome viral. Une atténuation de l'infectivité du HEV chez le poulet a été observée après inoculation intrahépatique d'un ARN infectieux dans lequel une délétion de la région HVR avait été introduite <sup>105</sup>. Le même phénomène a été observé chez le porc après inoculation intrahépatique d'un ARN infectieux dans lequel la majorité de la région HVR avait été délétée <sup>105</sup>. De plus, des délétions au sein de la région HVR réduisaient la répllication du virus dans des cellules Huh7 <sup>106</sup>.

Il a été suggéré que l'insertion de séquences dans la région HVR pourrait jouer un rôle dans l'adaptation du virus. En effet, des insertions de séquences dans la région HVR ont été retrouvées chez des patients infectés, et ces insertions ont permis l'adaptation du virus à la culture cellulaire. Notamment, l'insertion d'un fragment de 174 nucléotides codant pour une partie de la sous-unité S17 du ribosome dans une souche de HEV-3 (Kernow-C1), isolée d'un patient présentant une hépatite chronique, a permis l'adaptation du virus à la culture dans des cellules HepG2/C3A <sup>107</sup>. De plus, l'insertion expérimentale de cette séquence dans la région HVR d'une souche de HEV-1 a permis l'infection de différentes lignées cellulaires animales, suggérant un rôle dans le passage de la barrière d'espèce <sup>108</sup>. De la même façon, l'insertion d'un fragment de l'ORF1 a été retrouvée dans la région HVR du génome d'un virus provenant d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3c), et cette insertion a permis l'adaptation du HEV à la lignée A549 <sup>109</sup>.

### **Le domaine X ou Macrodomaine**

Le domaine X, ou macrodomaine, est localisé entre les acides aminés 785 à 942 de l'ORF1. Sa fonction reste cependant méconnue. Le macrodomaine est conservé dans de nombreux organismes : il est retrouvé chez les archaées, les bactéries, les invertébrés (*Drosophila melanogaster*), les amphibiens, les mammifères (homme, souris) et les plantes <sup>110</sup>. On l'appelle « macrodomaine » du fait de sa similarité avec le domaine non-histone de l'histone macroH2A chez l'homme. Le macrodomaine est également retrouvé chez d'autres virus à ARN positif tels que les coronavirus et les alphavirus.

Chez les organismes eucaryotes, les macrodomaines joueraient un rôle dans les mécanismes d'ADP-ribosylation des protéines. En effet, le macrodomaine est un module d'une sous-classe de poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs), appelée macroPARPs. Ce module permettrait de lier les molécules d'ADP-ribose et de les transférer à leurs protéines cibles. Ce mécanisme de poly(ADP) ribosylation ou PARylation est une modification post-

traductionnelle impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, l'interférence ARN, l'inactivation du chromosome X, le remodelage de la chromatine et la division cellulaire <sup>111</sup>. Il a également été montré que les macrodomaines chez l'homme avaient un rôle important dans le développement et présentaient un rôle anti-apoptotique <sup>110</sup>.

Au contraire, le rôle des macrodomaines viraux reste encore peu compris. En dehors de la famille des coronavirus, seuls le RubV, les alphavirus et le HEV possèdent un macrodomaine. Certains macrodomaines viraux lient efficacement le poly(ADP)-ribose et sont capable d'hydrolyser l'ADP-ribose-1-phosphate (ADPR-1-P), suggérant une implication potentielle dans les voies de signalisation dépendantes du poly(ADP)-ribose <sup>112,113</sup>. Cependant, les macrodomaines viraux présentent une forte affinité pour le poly(A) et une faible affinité pour l'ADP-ribose monomérique, au contraire des macrodomaines présents chez l'homme <sup>113</sup>, suggérant qu'ils seraient plus impliqués dans des voies de signalisation impliquant l'ARN plutôt que des dérivés d'ADP-ribose.

Des liens entre macrodomaine et immunité innée ont été décrits ces dernières années. Dans le cas du virus MHV (pour *mouse hepatitis virus*/ virus de l'hépatite murine), le macrodomaine est responsable d'une induction excessive de cytokines pro-inflammatoires, ce qui augmenterait la virulence du virus dans le foie <sup>114</sup>. Il a également été rapporté que le macrodomaine de la protéine nsP3 du virus Sindbis (SNV) était important pour la réplication virale dans les neurones et pour la neurovirulence chez la souris <sup>115</sup>. Une autre étude a mis en évidence que des mutations au niveau du macrodomaine du coronavirus humain 229E et du SARS-CoV (syndrome respiratoire aigu sévère lié au coronavirus) induisent une augmentation de la sensibilité aux effets antiviraux de l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) <sup>116</sup>, suggérant que l'activité ADPR associée au macrodomaine aurait un rôle dans l'échappement viral à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le macrodomaine du HEV posséderait un site catalytique ADP-ribose-1-monophosphatase, essentiel à la réplication virale <sup>117</sup>. Il serait également capable d'hydrolyser les protéines ADP-ribose afin de supprimer les mono(ADP-ribose) et les chaînes de poly(ADP-ribose) des protéines mono- ou poly(ADP)-ribosylées, respectivement <sup>118</sup>. De plus, la présence de l'hélicase en *cis* augmente de façon importante l'attachement du macrodomaine aux poly(ADP-ribose) et stimule l'activité de dé-PARylation <sup>118</sup>. Enfin, en introduisant des mutations au niveau des acides aminés impliqués dans les mécanismes de dé-MARylation



(mono(ADP) ribosylation) et dé-PARylation, il a été observé une diminution de la réplication virale, suggérant que ces activités sont essentielles à la réplication du HEV <sup>118</sup>. Des expériences de double-hybride ont montré que le macrodomaine X interagissait directement avec le domaine Met et la protéine ORF3, suggérant un rôle important du domaine X dans le cycle cellulaire du HEV <sup>119</sup>. Dans une autre étude, il a été montré que le macrodomaine interagissait directement avec la chaîne légère de la ferritine humaine. Ces résultats suggèrent qu'en se liant à la ferritine, le macrodomaine l'empêcherait d'entrer dans la circulation sanguine, permettant ainsi une atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte <sup>120</sup>. En effet, chez les personnes infectées, l'augmentation du taux de ferritine dans le sang, due à la cytolysse hépatique, induirait une augmentation de la réponse inflammatoire, qui serait alors diminuée par le macrodomaine.

### **Le domaine hélicase (Hel)**

Le génome du HEV possède un domaine hélicase, qui est essentiel pour la réplication virale. Les hélicases sont des protéines capables de dérouler les brins d'acides nucléiques en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (activité ATPase). Il a été proposé après analyse de la séquence que l'hélicase du HEV aurait un domaine NTPase, permettant l'hydrolyse des nucléotides triphosphate, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN <sup>99</sup>. Ces activités NTPase et de déroulement de l'ARN ont été confirmées par la suite en système *E. coli* <sup>121</sup>. De plus, après introduction de mutations dans les motifs Ia et III, caractéristiques des hélicases, il a été montré une diminution majeure des activités ATPase et de déroulement de l'ARN, suggérant que ces motifs joueraient un rôle crucial dans les fonctions enzymatiques de la protéine <sup>122</sup>. L'hélicase possède également une activité 5'-triphosphatase, c'est-à-dire qu'elle permet le clivage des  $\gamma$ -phosphates de l'extrémité 5' des transcrits d'ARN, étape essentielle au coiffage des ARN <sup>123</sup>.

### **Le domaine de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp)**

Le domaine à l'extrémité C-terminale de l'ORF1 est le domaine codant pour la polymérase virale. Tous les virus à ARN positif codent pour une ARN polymérase ARN dépendante, enzyme nécessaire à leur réplication. Elle permet la réplication de l'ARN génomique en un ARN anti-génomique intermédiaire. La comparaison de la séquence du RdRp du HEV avec celle d'autres virus a montré une homologie avec les polymérase du RubV et BNYVV (pour

*Beet necrotic yellow vein virus*)<sup>99</sup>. On retrouve bien dans l'enzyme codée par le HEV les 8 domaines conservés (I-VIII) décrits chez les autres virus à ARN positif, notamment la séquence GDD permettant la liaison avec le Mg<sup>2+</sup> qui est nécessaire à l'activité de la polymérase.

Une étude en système d'expression *E. coli* a montré que le domaine RdRp est capable de se lier à l'extrémité 3' du génome du HEV<sup>124</sup> et que deux structures tiges-boucles ainsi que la queue poly(A) seraient requises pour cette liaison. La polymérase serait aussi capable de s'associer au promoteur subgénomique putatif et à la région 5' non codante, mais l'affinité à la région 3' serait meilleure<sup>125</sup>. De plus, la protéine RdRp serait capable d'utiliser l'extrémité 3' du HEV comme matrice pour synthétiser l'ARN complémentaire *in vitro*<sup>124</sup> et *in vivo*<sup>126</sup>. En utilisant une protéine RdRp fusionnée à la GFP (pour *green fluorescent protein*), il a été montré que la RdRp était localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (RE), suggérant que, comme pour d'autres virus à ARN, le RE pourrait être le site de réplication du HEV<sup>126</sup>.

Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence l'apparition d'une mutation G1634R dans la RdRp, chez des patients atteints d'une hépatite chronique et sous traitement par la ribavirine. Cette mutation, sélectionnée par la pression de sélection exercée par la ribavirine, entraîne une augmentation de la capacité répliquative du HEV et serait responsable de l'échec du traitement chez les patients transplantés<sup>127-129</sup>.

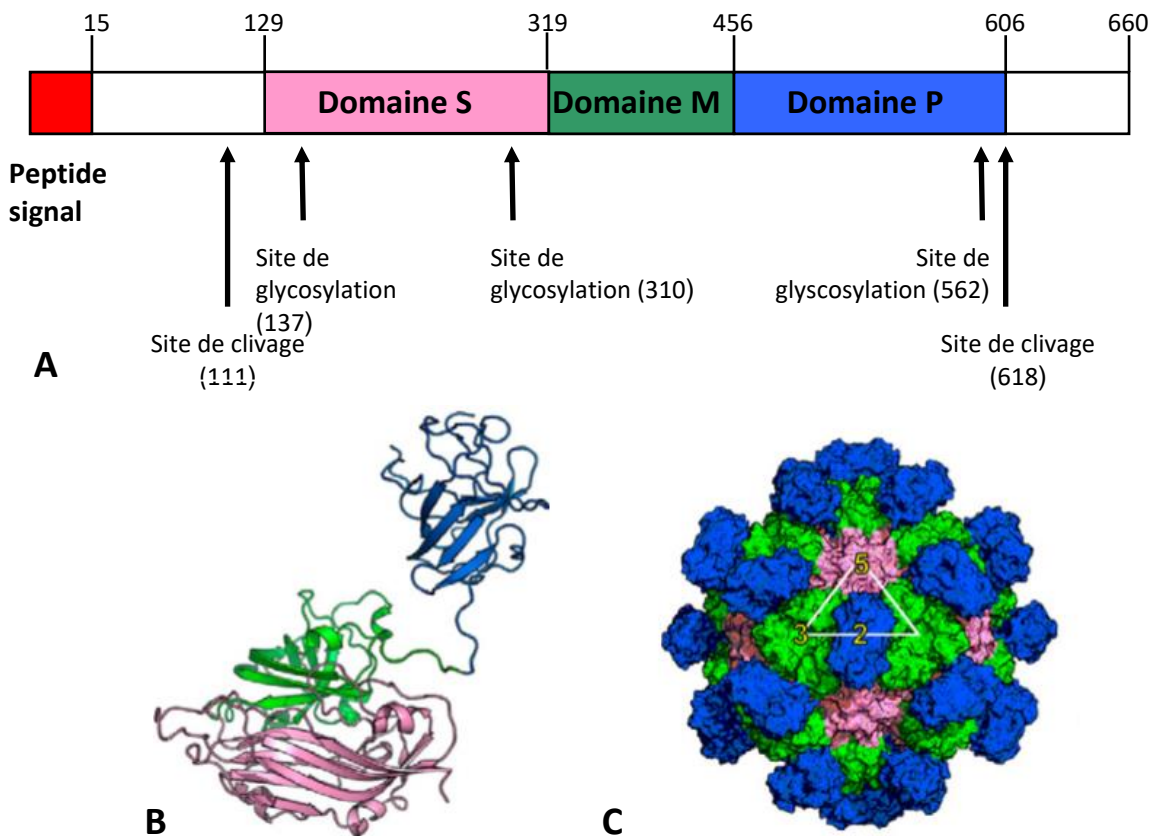
### *b- L'ORF2 du HEV*

#### **Expression et glycosylation**

L'ORF2 du HEV code pour la protéine de capsid, de 660 acides aminés (Figure 8) : elle va permettre l'encapsulation de l'ARN génomique. L'ORF2 existe à la fois sous forme de glycoprotéine de 88 kDa et sous une forme non-glycosylée de 72 kDa. Elle est exprimée dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique<sup>130</sup> et peut former des homodimères<sup>131</sup>. Une étude récente a également montré une localisation nucléaire de l'ORF2 dans des biopsies de foie provenant de patients infectés<sup>132</sup>.

La protéine contient une séquence hydrophobe en N-terminale (appelé peptide signal) qui va permettre sa translocation dans le RE<sup>133</sup>. Le clivage du peptide signal va conduire à la formation d'une protéine mature qui serait ensuite glycosylée au niveau de 3 sites de

glycosylation Asn-X-Thr/Ser<sup>130</sup> (Figure 8A). La translocation dans le RE entrainerait un stress au niveau du RE, ce qui induirait la retranslocation de la protéine dans le cytoplasme en passant par la voie de dégradation des protéines associée au RE (ERAD pour *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*). Cependant, contrairement à la plupart des protéines qui suivent cette voie de dégradation, la protéine ORF2 n'est pas dégradée par le protéasome mais reste stable dans le cytoplasme<sup>134</sup>.



**Figure 8. Structure de la protéine ORF2 (A et B) et de la capsid virale (C)<sup>135</sup>. Les domaines S, M et P sont respectivement représentés en rose, vert et bleu.**

La glycosylation de la capsid n'étant pas quelque chose de commun chez les virus non enveloppés, la pertinence biologique de cette modification pour l'infection par le HEV n'est pas encore clairement établie. Il semblerait que la glycosylation ne soit pas requise pour son expression à la membrane plasmique<sup>133</sup>, ni pour son expression au niveau du cytoplasme<sup>136</sup>. De plus, en utilisant des mutants au niveau des trois sites de glycosylation, il a été montré que ces mutations n'affectaient ni la réplication virale ni la synthèse de la protéine de capsid<sup>137</sup>. Cependant, les mutations au niveau des deux premiers sites ont empêché la formation des virions et la mutation du troisième site a induit la formation de particules non

infectieuses. De plus, aucun des mutants générés n'a pu infecter des macaques rhésus <sup>137</sup>, suggérant que la glycosylation est tout de même une étape importante pour la formation et l'infectiosité des virions.

Des études en cellules d'insectes ont mises en évidence des sites de clivages, au niveau des acides aminés 111 et 618 (Figure 8A), permettant la génération d'une forme complète insoluble de 72 kDa et d'une forme soluble de 50 kDa, gardant sa capacité à former des VLPs <sup>138,139</sup>. De plus, les 111 premiers acides aminés ne sont pas retrouvés dans les virions <sup>135</sup>.

### **Auto-assemblage de la capsid virale**

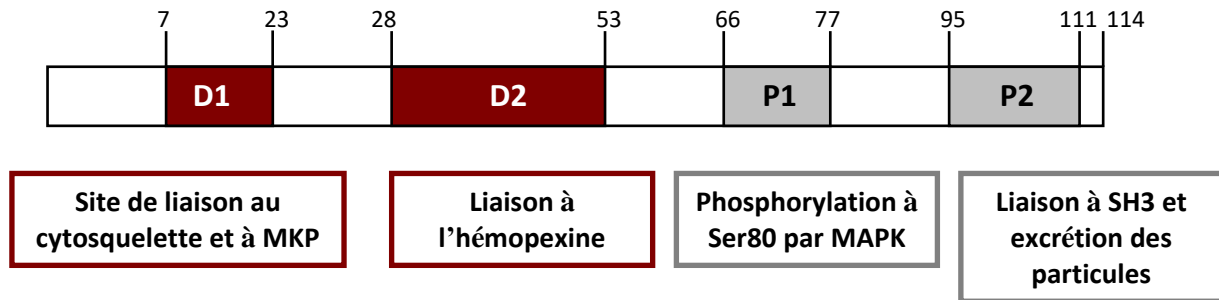
L'ORF2 a trois domaines distincts : le domaine S (« shell » ou coquille), le domaine M (« middle » ou milieu), et le domaine P (« protruding » ou saillant) (Figure 8). Le domaine S est formé de 8 feuilletts  $\beta$  antiparallèles engagés de manière icosaédrique pour former la couche basale de la capsid virale. Le domaine P permet la formation d'homodimères qui vont former des protubérances à la surface de la particule virale <sup>140,141</sup>. L'ORF2 interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN viral <sup>142</sup>. Cette interaction pourrait jouer un rôle dans l'encapsidation de l'ARN viral.

La forme non-glycosylée de la protéine ORF2 interagirait avec la forme phosphorylée de la protéine ORF3 <sup>143</sup>, suggérant que l'ORF3 pourrait être impliquée dans l'assemblage de la capsid virale.

### **Interaction de l'ORF2 avec des protéines cellulaires**

L'ORF2 est capable d'interagir avec différentes protéines cellulaires, notamment avec des protéines de surface impliquées dans l'attachement de la capsid virale (voir le paragraphe II-F-3-). D'autres études ont montré que l'ORF2 est capable d'interagir avec des voies de signalisation cellulaire mais également d'activer l'expression du gène pro-apoptotique C/EBP homologous protein (CHOP) et des protéines chaperon et donc anti-apoptotiques Hsp72, Hsp70B' et Hsp40 <sup>144</sup>, suggérant que le HEV aurait un rôle modulateur sur l'apoptose de son hôte avant d'avoir complété son cycle de réplication.

### c- L'ORF3 du HEV



**Figure 9. Structure de la protéine ORF3 et domaines d'interactions.**

Copié d'Ahmad et al. 2011<sup>88</sup>.

### Expression et localisation subcellulaire

Une première étude sur l'ORF3 en système d'expression en levure a mis en évidence la formation d'une protéine de 123 acides aminés, non glycosylée, qui ne subit aucun clivage<sup>130,145</sup>. En exprimant la protéine ORF3 dans des cellules COS-1 et Huh7, il a été montré que l'ORF3 est une phosphoprotéine, phosphorylée au niveau de la serine 80 par la protéine MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*)<sup>146</sup>, suggérant que l'ORF3 est phosphorylée en réponse à des signaux de croissance extracellulaire. De plus, la protéine possède deux domaines très hydrophobes à l'extrémité N-terminale (les domaines D1 et D2, Figure 9). Par des expériences de fractionnement subcellulaire, il a été montré que l'ORF3 est retrouvée dans la fraction correspondant au cytosquelette et que cette association est perdue si le domaine D1 est supprimé<sup>146</sup>.

### Les domaines protéiques et leurs effets sur différentes fonctions cellulaires

Par son domaine C-terminal (domaine P1 et P2, Figure 9) riche en résidus proline (motifs PXXP), l'ORF3 est capable de se lier à de nombreuses protéines cellulaires : aux protéines possédant un domaine SH3 (pour *src homology 3*)<sup>147</sup> et à la protéine Pyst1, une phosphatase qui régule négativement les protéines MAPK, permettant ainsi l'activation de la protéine ERK, un membre de la superfamille des protéine MAPK<sup>148</sup>. L'ORF3 est également capable d'interagir avec l'AMBP (pour *α1-microglobulin/bikunin precursor*), permettant ainsi son clivage en α1-microglobuline et bikunine dans les hépatocytes<sup>149</sup>. L'interaction entre le motif PSAP présent à l'extrémité C-terminale de l'ORF3 et la protéine TSG101 (pour *tumor susceptibility gene 101*) permettrait l'excrétion de l'α1-microglobuline via le système ESCRT

<sup>150</sup>, qui aurait des effets inhibiteurs sur le système immunitaire. De plus, l'ORF3 interagit par sa région C-terminale avec le deuxième produit de clivage de l'AMBP, la Bikunine <sup>151</sup>. La Bikunine est un inhibiteur de protéase spécifique du foie, ayant également des fonctions inhibitrices sur le système immunitaire. L'ORF3 est également capable de s'homodimériser via son domaine C-terminal <sup>152</sup>.

Par son domaine D2, l'ORF3 interagit avec l'hémopexine, une glycoprotéine permettant le transport de l'hème dans le sang <sup>153</sup>.

L'expression de l'ORF3 induit la surexpression de la protéine de la membrane externe de la mitochondrie VDAC (pour *voltage-dependent anion channel*) ainsi que de l'hexokinase I, qui interagit directement avec VDAC <sup>154</sup>. Cette interaction permet de préserver l'intégrité de la mitochondrie et empêche le relargage du cytochrome c, suggérant que l'ORF3 aurait un rôle dans la survie cellulaire.

L'ORF3 est également capable d'interagir avec des protéines des voies de signalisation antivirales (voir chapitre III-B-2-).

### **Rôle dans la morphogénèse virale et l'excrétion des particules**

En utilisant un clone infectieux codant pour le génome du HEV et muté au niveau de l'ORF3, une première étude a montré que l'ORF3 du HEV n'est pas requise pour la réplication, l'assemblage du virion et l'infectivité dans des cellules Huh7 <sup>155</sup>. Cependant, l'ORF3 est nécessaire à l'infection *in vivo*, suggérant qu'il aurait un rôle dans la sortie des virions de la cellule. Cette hypothèse fut confirmée par la suite en infectant des cellules PLC/PRF/5 avec un clone infectieux présentant une délétion de l'ORF3, réduisant ainsi de 99% le nombre de virions dans le surnageant <sup>156</sup>. De plus, l'ORF3 est présente à la surface des particules virales, participant ainsi à la morphologie de la particule virale. L'ORF3 présente à la surface de la particule serait associée à des lipides <sup>156</sup>. Enfin, l'ORF3 formerait également des complexes multimériques similaires à des viroporines, permettant le relargage des particules virales <sup>157</sup>.

#### *d- L'ORF4 du HEV (génotype 1)*

Très récemment, il a été montré que le stress du RE induisait la traduction d'une quatrième ORF, située entre les nucléotides 2832 et 3311 du HEV-1, nommée ORF4 (158 acides aminés). L'expression de cette ORF n'est pas dépendante de la coiffe mais d'une séquence similaire à



un IRES situé entre les nucléotides 2701 et 2787 <sup>90</sup>. De façon intéressante, l'ORF4 a été retrouvée dans différentes souches de HEV-1 et des anticorps anti-ORF4 ont été détectés dans le sérum d'un patient infecté. Au contraire, l'ORF4 n'a pas été retrouvée dans les autres génotypes. L'ORF4 interagit avec un complexe de protéines virales et cellulaires constitué de l'hélicase, la RdRp, X, eEF1 $\alpha$ 1 (pour *eukaryotic elongation factor 1 isoform-1*) et la  $\beta$ -tubuline, permettant la stimulation de la réplication du HEV <sup>90</sup>.

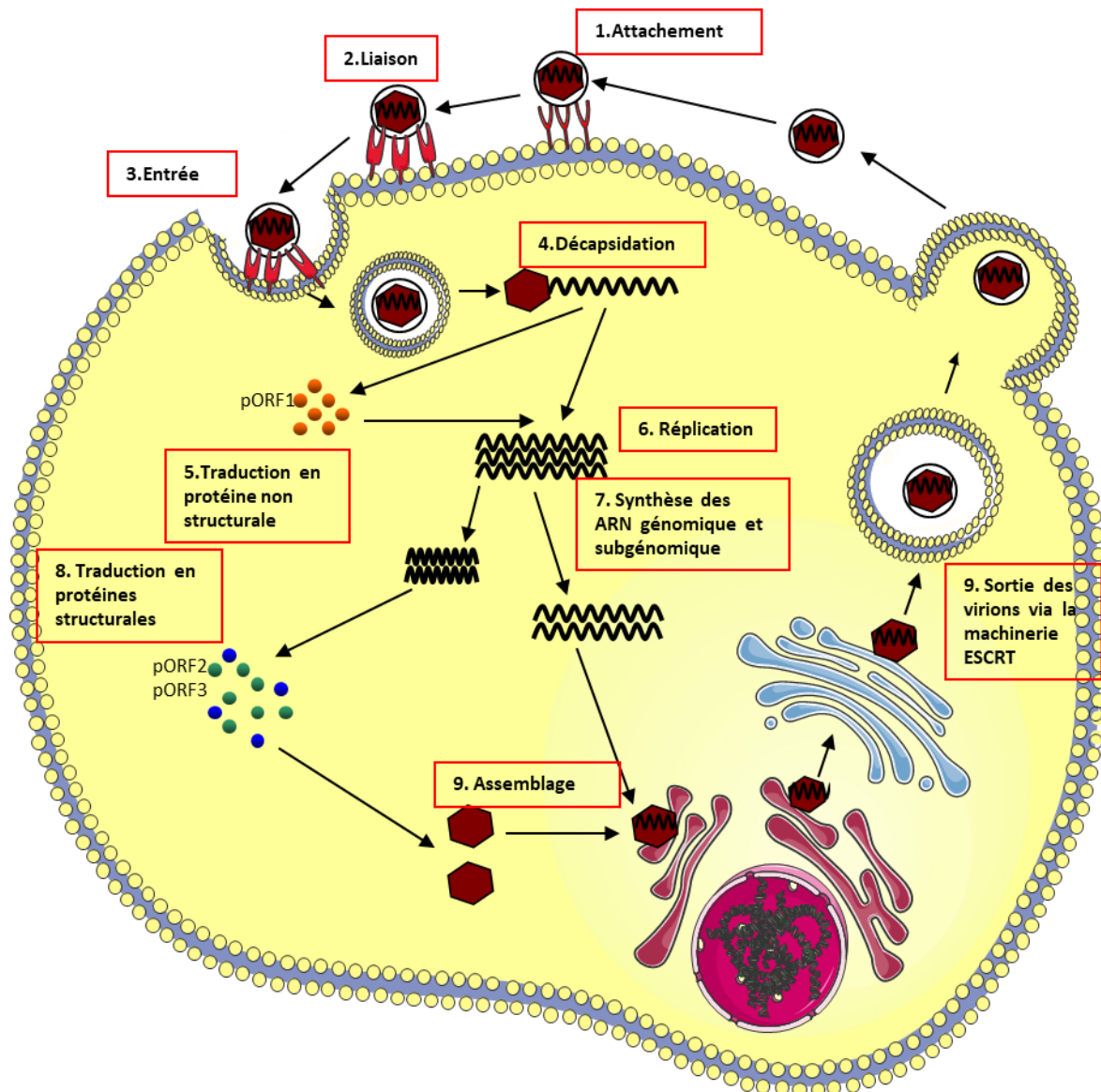
### 3- Le cycle viral du HEV

Par manque de système de culture cellulaire efficace, le cycle viral du HEV a été peu étudié et reste hypothétique à plusieurs étapes. Le HEV présente un cycle viral exclusivement cytoplasmique. Les différentes étapes du cycle sont représentées figure 10.

La première étape du cycle constitue en l'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire. La capsid virale serait capable d'interagir avec les protéoglycanes de type héparan-sulfate membranaires dans des cellules Huh7 <sup>158</sup>, mais aussi avec l'ectodomaine du récepteur à l'asialoglycoprotéine 1 et 2, un récepteur exprimé spécifiquement au niveau du foie, dans des cellules PLC/PRF/5 <sup>159</sup>. Ensuite, la particule virale s'associe à un récepteur n'ayant pas encore été identifié (étape 2), suivi d'une étape d'internalisation de la particule (étape 3) qui semble s'effectuer par la voie dépendante des clathrines et de la dynamine-2 <sup>160,161</sup>. Dans le cas des particules quasi enveloppées, le trafic endosomal et l'acidification seraient des étapes critiques à l'entrée et l'enveloppe serait dégradée dans des endolysosomes avant la décapsidation virale <sup>162</sup>. Il semblerait donc que les particules non enveloppées pénètrent au niveau de la membrane plasmique alors que les particules enveloppées pénètrent au niveau des endolysosomes. Le génome du HEV est ensuite décapsidé par un mécanisme également inconnu.

Certaines protéines cellulaires joueraient un rôle dans le transport intracellulaire de la capsid virale. C'est le cas de la heat-shock protein 90 (HSP90) <sup>163</sup>. En effet, il a été montré qu'une inhibition spécifique de l'HSP90 induit un blocage du transport de la capsid virale. L'HSP90 est une protéine chaperonne normalement impliquée dans le transport de différents récepteurs membranaires. Cela suggère que l'HSP90 permettrait le transport des protéines de capsides vers la membrane cytoplasmique ou une destination cytoplasmique

spécifique. L'interaction entre ORF2 et une autre protéine chaperonne, Grp78 (pour *Glucose regulated protein 78*) ou HSP70 a également été démontrée <sup>164</sup>. Cette protéine étant présente à la fois au niveau de la membrane plasmique et du RE, il a été suggéré qu'elle pourrait être impliquée dans l'endocytose du HEV <sup>164</sup>. Une interaction avec l' $\alpha$ -tubuline a également été montrée <sup>163</sup>, suggérant que la capside utilise le réseau de microtubules pour se déplacer.



**Figure 10. Schéma du cycle viral du HEV.**  
(Voir texte pour explications détaillées).

Après l'étape de décapsidation et du relargage du génome viral dans les cellules, la coiffe de l'ARN viral recrute la sous unité 40S du ribosome pour initier la traduction de la protéine non structurale, l'ORF1 (étape 5). La RdRp codée par l'ORF1 va permettre la réplication de l'ARN

viral (étape 6). Un intermédiaire ARN de polarité négative va être produit par la RdRp <sup>165</sup> et va servir de matrice à la production des ARN génomiques de polarité positive et des ARN subgénomiques (étape 7). L'ARN subgénomique va ensuite être traduit en protéines ORF2 et ORF3 (étape 8).

L'ORF2 va ensuite permettre l'assemblage de la particule virale et l'encapsidation de l'ARN génomique. L'ORF3 va être impliquée dans la sortie des particules. En effet, le domaine C-terminal de l'ORF3 contient un domaine PSAP conservé (proline-sérine-alanine-proline) avec lequel il interagit avec la protéine Tsg101 <sup>166,167</sup>, un composant de la machinerie d'export cellulaire ESCRT. Cette interaction induit l'assemblage des virions dans des corps multivésiculaires, qui vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique <sup>168</sup>. D'autres composants des voies de sécrétions exosomales ont été montrés comme étant requis pour la sortie du HEV des cellules. C'est le cas des protéines Rab27 et Hrs <sup>169</sup>, ainsi que de la protéine Vps4 (pour *vacuolar protein sorting-associated protein 4*), une ATPase qui désassemble les composants de la machinerie ESCRT <sup>167</sup>. De plus, la protéine CD63, un marqueur des exosomes, colocalise avec les protéines ORF2 et ORF3.

L'origine de l'enveloppe du HEV n'est pas encore claire. Il a été suggéré que les membranes proviendraient du réseau trans-golgi (TGN) car elles contiennent la protéine TGOLN2 (pour *trans-golgi network protein 2*) <sup>170</sup>. Enfin, il a été montré que l'ORF3 est capable d'interagir avec les microtubules et augmente leur stabilité <sup>171</sup>. Cette interaction nécessite la présence d'une protéine motrice, la dynéine, et les deux domaines N-terminaux hydrophobes de l'ORF3 sont requis pour cette interaction. Cela suggère que le HEV utiliserait le réseau de microtubules pour se déplacer dans la cellule.

## **G- Les systèmes de culture cellulaire du HEV**

Le HEV a été pendant longtemps un virus difficile à étudier du fait de l'absence de système de culture cellulaire efficace. Cependant, différents systèmes de culture ont commencé à être mis en place ces dernières années. D'une part en utilisant des clones infectieux codant pour le génome complet du HEV, d'autre part en cultivant des virus provenant de fèces ou de sang de patients infectés par le HEV.

## 1- Utilisation de clones infectieux codant pour le génome du HEV

Du fait de l'absence de système de culture cellulaire efficace, des clones infectieux codant pour le génome du HEV-1<sup>94,172</sup>, HEV-3<sup>173-175</sup>, HEV-4<sup>176,177</sup>, HEV aviaire<sup>178,179</sup> et HEV de rat<sup>180,181</sup> ont été développés. L'avantage de l'utilisation de ce système de génétique inverse est qu'elle permet, via des mutations au niveau de gènes d'intérêts, d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réplication du HEV ainsi que la fonction de protéines virales pendant le cycle de réplication. Des mutations dans la région HVR d'un clone infectieux de génotype 1 ont permis de mettre en évidence son rôle dans la réplication<sup>105,106</sup>. De plus, la transfection des ARN transcrits *in vitro* permet de contourner les étapes d'entrée et de décapsidation, étapes qui peuvent restreindre le tropisme viral à un type cellulaire particulier. En effet, une étude a montré que parmi 4 types cellulaires dans lequel l'ARN de HEV-1 pouvait se répliquer (PLC/PRF/5, Huh7, Caco-2 et HepG2/C3A), seules les cellules HepG2/C3A étaient capable d'être infectées<sup>182</sup>. Dans certaines cellules comme les cellules Huh7, la formation, l'excrétion des particules virales, et donc la réalisation d'un cycle viral complet ne sont pas observés<sup>182</sup>. Les clones infectieux peuvent donc être utiles pour mieux comprendre les mécanismes de réplication du HEV mais ne sont pas de bons modèles pour étudier les mécanismes d'entrée et de propagation, d'où la nécessité d'avoir des modèles de cellules infectées.

## 2- Infection de lignées cellulaires par le HEV

L'infection directe de lignées cellulaires avec du virus isolé de sang ou de fèces de patients infectés a pendant longtemps posé problème. Des tentatives de modèles de culture *in vitro* du HEV ont été réalisées dans des hépatocytes primaires de macaques cynomolgus<sup>183,184</sup>. Par la suite, des titres viraux élevés, de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$  copies/ml, ont été obtenus suite à l'infection de la lignée hépatocytaire PLC/PRF/5 ainsi que de la lignée pulmonaire A549 par des souches de HEV-3 et HEV-4 provenant de fèces de patients présentant respectivement une hépatite aiguë et fulminante<sup>185,186</sup>. La propagation réussie des virus dans ces deux lignées était due au titre viral élevé de l'inoculum de départ. En effet, comme les virus à ARN existent sous forme de quasi espèce, un échantillon avec un titre viral élevé a une plus forte

probabilité de contenir des variants possédant des mutations avantageuses leur permettant d'infecter les cellules en culture. L'infection de la lignée A549 avec du virus provenant d'un patient atteint d'une hépatite chronique (HEV-3c) a également été un succès, permettant la mise en place d'une lignée A549 infectée de manière persistante par le HEV <sup>109,187</sup>. Une insertion d'un fragment de l'ORF1 a été retrouvée dans la région HVR du génome. Une des limites du modèle en cellules PLC/PRF/5 est qu'elles contiennent des gènes du HBV intégrés, ce qui pourrait affecter la réplication du HEV. Quant aux cellules A549, ce ne sont pas des cellules d'origine hépatique, elles ne représentent donc pas un modèle pertinent pour l'étude du HEV.

Une souche de HEV-3 (Kernow-C1), isolée d'un patient présentant une hépatite chronique, a été utilisée pour infecter des cellules HepG2/C3A. Après analyse de la séquence du virus adapté au 6<sup>ème</sup> passage, une insertion de 58 acides aminés a été retrouvée dans la région HVR de l'ORF1, correspondant à un fragment d'un gène codant pour la sous-unité S17 du ribosome <sup>107,188,189</sup>. Cette découverte, de paire avec l'étude portant sur l'insertion d'un fragment de l'ORF1 dans la région HVR, semble indiquer que l'adaptation du HEV en culture pourrait nécessiter une insertion dans cette région HVR.

Des cellules hépatocytaires humaines HepaRG, isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1 développée consécutivement à une hépatite C chronique, ont été infectées avec succès par le HEV dans le laboratoire <sup>190</sup>. Ces cellules représentent un très bon modèle d'infection par le HEV. En effet, elles sont capables de se différencier en hépatocytes et cellules biliaires, présentent une activité cytochrome P450 et ont une expression des gènes similaires aux hépatocytes primaires humains (PHHs pour *primary human hepatocytes*).

Récemment, des cellules souches pluripotentes ont été utilisées <sup>41</sup>. Ces cellules ont été différenciées en hépatocytes, cellules mésodermes et neuroprogéniteurs puis infectées avec la souche Kernow-C1. Dans cette étude, seul les hépatocytes permettait la réalisation d'un cycle de réplication complet et la production de virions infectieux, faisant de ces cellules un bon modèle pour l'infection par le HEV. Au contraire, les cellules mésodermes et les neuroprogéniteurs permettaient la réplication du HEV seulement après transfection d'un clone infectieux, suggérant que le virus est bloqué au niveau des étapes d'entrée dans ces cellules. De plus, une autre étude sur différentes lignées neuronales dont des cellules neuronales humaines dérivées de cellules souches pluripotentes a montré que ces cellules étaient permissives à une infection par la souche Kernow-C1 et permettaient une

réplication du virus sur le long terme et la production de virions <sup>43</sup>. Ces lignées sont donc de bons modèles pour l'étude des pathologies neuronales induites par le HEV.

Différents modèles ont donc été mis en place ces dernières années, permettant plus d'études sur la biologie du virus et notamment son interaction avec l'immunité innée.

## H- Les modèles animaux du HEV

Au cours des dernières années, différentes espèces animales ont été utilisées comme modèles d'infection du HEV, mais lors de sa découverte dans les années 90, seuls des modèles de primates avaient été utilisés. Les macaques cynomolgus et rhesus sont sensibles à l'infection par les 4 génotypes humains (HEV-1 à HEV-4), conduisant à la sécrétion de VLPs, observées par microscopie électronique, et au développement d'une hépatite, caractérisée par une élévation des enzymes hépatiques, une virémie et une séroconversion <sup>6</sup>. Cependant, du fait de ressources limitées pour la production de ces animaux, des problèmes éthiques pour leur utilisation, des procédures expérimentales difficiles et chères, peu de données ont été finalement collectées sur la pathogénèse du HEV en utilisant ces modèles.

Depuis l'identification de souches de HEV-3 et HEV-4 naturellement présentes chez les suidés domestiques et sauvages, des porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) ont été infectés avec succès avec des souches provenant de patients infectés par des HEV-3 ou -4 <sup>6</sup>. Les porcs infectés présentent une virémie, une séroconversion et excrètent des particules de HEV infectieuses dans les fèces, tout en restant asymptomatique <sup>191</sup>. Il n'y a aucune preuve de maladie, ni d'élévation des enzymes hépatiques dans ce modèle, toutefois des sites de réplication extra hépatiques du HEV ont été mis en évidence <sup>192,193</sup>. Par ailleurs, le modèle porcin a permis de montrer que les porcs sont résistants à l'infection par des souches de HEV-1 ou HEV-2. Ce modèle animal est donc très utile pour étudier la réplication du HEV et les infections inter-espèces. Plus récemment, un modèle d'infection du HEV a été développé dans des porcs miniatures. Ces porcins peuvent être infectés par les HEV-3 et HEV-4 et présentent les mêmes caractéristiques que l'infection chez le porc domestique <sup>194</sup>. Les porcs miniatures sont plus petits (3 Kg) que les porcs conventionnels (20 Kg) et sont plus faciles à manipuler, ils représentent donc un modèle alternatif au modèle porcin standard.

Grâce à l'identification des souches de HEV aviaires, un modèle de poulet infecté par le HEV a été développé. Le HEV aviaire est associé à une maladie hépatique chez la volaille, le syndrome d'hépatosplénomégalie. Des poulets EOPS, infectés par voie orale, présentent des lésions hépatiques, caractéristiques du syndrome d'hépatosplénomégalie, faisant du poulet un modèle animal pour l'étude de la pathogénèse du HEV <sup>6</sup>. Des sites de réplication extra hépatiques ont également été identifiés <sup>195</sup>.

Depuis l'identification de souches de HEV chez les lagomorphes, l'infection de lapins EOPS par des souches HEV3ra conduit à l'excrétion du virus dans les fèces, une virémie et le développement d'une hépatite, caractérisée par des modifications histologiques du foie et l'augmentation du taux d'ALT dans le sérum <sup>6</sup>. De plus, le développement d'une infection chronique, accompagnée d'une inflammation et d'une fibrose hépatique, a été observé <sup>196</sup>. Des antigènes du HEV et l'ARN viral ont été retrouvés dans des tissus extra hépatiques de lapins infectés <sup>197</sup>. Une transmission verticale du virus et une forte mortalité chez des lapines gestantes ont été observées <sup>198</sup>. Ce modèle peut être utile pour étudier l'infection par le HEV, la pathogénèse causée par les souches de HEV3ra mais également pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins.

Les rongeurs étant faciles à produire et à manipuler, ils sont fréquemment utilisés en recherche. L'infection de rat Wistar avec du HEV provenant de rats sauvages, induisit une séroconversion et l'excrétion du virus dans les fèces <sup>199</sup>. Cependant, les résultats d'infections obtenus après inoculation de rats avec des souches de HEV-1, -2, -3 et -4 restent contradictoires <sup>6</sup> et l'utilité du rat comme modèle pour l'infection par le HEV reste donc encore à démontrer.

Très récemment, des furets ont été inoculés par voie orale avec une souche de HEV de furet, conduisant à une infection caractérisée par la présence d'ARN viral dans les fèces, une virémie, une séroconversion et une élévation significative du niveau d'ALT dans le sang. Ces résultats suggèrent que les furets pourraient être utilisés comme modèles animaux de l'infection par le HEV <sup>200</sup>.

La gerbille de Mongolie pourrait être un modèle prometteur pour l'étude de la réplication et de la pathogénèse des HEV-1 et HEV-4. En effet, des gerbilles ont été infectées avec succès avec une souche de HEV-4 provenant d'un échantillon de foie de porc ou avec une souche de HEV-1 isolée d'un patient présentant une hépatite aiguë <sup>6</sup>. Dans ce modèle, il a été montré que le HEV-4 porcin était capable de passer la barrière hématoencéphalique et se répliquer