



HAL
open science

Étude de la circulation du virus de l'hépatite E entre l'Homme et l'environnement par caractérisation moléculaire de souches humaines et environnementales

Honorine Fenaux

► **To cite this version:**

Honorine Fenaux. Étude de la circulation du virus de l'hépatite E entre l'Homme et l'environnement par caractérisation moléculaire de souches humaines et environnementales. Maladies infectieuses. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0108 . tel-02998315

HAL Id: tel-02998315

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02998315v1>

Submitted on 18 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Honorine FENAUX**

**Étude de la circulation du virus de l'hépatite E entre l'Homme et
l'environnement par caractérisation moléculaire de souches
humaines et environnementales**

Le 16 octobre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Catherine GAUDY-GRAFFIN PU-PH, U1259 INSERM – Université de Tours
« Présidente du jury »

M. Jean-Luc BAILLY MCU, LMGE, UMR CNRS 6023, Clermont-
Ferrand

Examineurs : M. Christophe GANTZER PU, LCPME UMR 7564, CNRS - Université de
Lorraine, Nancy, Directeur de thèse

Mme Evelyne SCHVOERER PU-PH, LCPME, UMR 7564, CNRS, Villers-lès-
Nancy, Co-directrice de thèse

**LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et
l'Environnement) UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine
405, rue de Vandoeuvre
54600 Villers-lès-Nancy**

« Ce sont les microbes qui auront le dernier mot. » Louis Pasteur (1822 ~ 1895)

Remerciements

J'exprime tout d'abord ma reconnaissance au Professeur Christophe Gantzer, qui a accepté d'assurer la fonction de directeur de ma thèse. Merci pour votre pédagogie, votre gentillesse, votre bienveillance. Je remercie le Professeur Evelyne Schvoerer, ma co-directrice de thèse et chef de service. Merci pour tout ce que j'ai appris à votre contact.

J'aimerais exprimer ma gratitude au Professeur Catherine Gaudy-Graffin et au Docteur Jean-Luc Bailly qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail et de siéger dans ce jury.

Merci aux Professeurs Jean-Pierre Bronowicki et Wim van der Poel qui ont accepté de participer aux comités de suivi de ma thèse et de suivre l'évolution de mon travail.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude au Docteur Isabelle Bertrand qui a beaucoup travaillé dans cette étude et a participé à mon encadrement, au Docteur Hélène Jeulin pour ses conseils (et ses cellules !) et au Docteur Sandrine Capizzi pour son encadrement, ses conseils et sa gentillesse. Je remercie également Sibel Berger, pour ses conseils et son aide technique.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe MIC du LCPME pour leurs conseils et les bons moments passés ensemble. Merci à David Santilli, Sandrine Lemoine et Sylvie Kautz qui m'ont permis de mener à bien mon travail en assurant le côté logistique.

Mes remerciements vont également aux techniciens du laboratoire de virologie du CHRU de Nancy pour leurs conseils, le partage des paillasse et des PSM et leur patience pour avoir supporté les « manips » de la recherche et la place prise par nos tubes dans leurs congélateurs ! J'exprime également ma reconnaissance aux autres personnes qui ont contribué à ce travail : les patients ayant donné leur accord pour participer à notre étude, les médecins qui s'en sont occupés, les personnels de l'abattoir de Rambervillers, de la station d'épuration de

Maxéville ainsi que les chasseurs et éleveurs auprès de qui nous avons pu recueillir nos prélèvements animaux.

Je remercie Marine Eschlimann pour son aide, ses conseils et son soutien. Merci pour ses « t'inquiète paupiette » et « ça va bien se passer » ! Merci à Ombeline Blanger, Manon Chassaing et Alexis Gentilhomme qui ont également travaillé sur ce sujet et m'ont apporté une aide technique. Aux virologues du CHRU de Nancy, Hélène, Brice, Cédric et Véronique et aux internes, avec qui nous nous sommes partagé le travail hospitalier et nous sommes organisés pour que chacun puisse s'occuper de la recherche.

Je tiens à remercier tous ceux qui, depuis mes débuts en virologie m'ont formée, encadrée pour les travaux précédents et donné le goût pour cette discipline.

Je remercie enfin mes parents qui m'ont conseillée et soutenue dans les moments difficiles. A mon grand-père paternel qui au début de ma carrière m'a rappelé qu'un virus signifiait un « vieux Soviétique » dans son patois wallon et qui m'a ensuite suggéré de prendre comme sujet de thèse « les nonoparticules ». A mon autre grand-père qui a quitté cette terre peu avant l'aboutissement de ce travail. Merci à tous ceux qui m'ont écoutée patiemment, soutenue tout au long de cette épreuve et conseillée. Merci à ceux qui m'ont aidée à me réapproprier mon travail et à reprendre confiance en moi.

À Gabrielle, pour les informations qu'elle m'a transmises.

À ceux qui, à travers la France, m'ont aidée, conseillée et tendu la main.

À tous ceux que je n'ai pas mentionnés.

À celui que j'aime plus que tout et à qui je dédie tout mon travail.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 7 |
| LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS | 13 |
| LISTE DES FIGURES | 15 |
| I. LE VIRUS DE L'HEPATITE E | 29 |
| A. HISTORIQUE ET DECOUVERTE DU VIRUS | 29 |
| B. TAXONOMIE | 29 |
| C. STRUCTURE | 30 |
| 1. Génome..... | 30 |
| 2. Capside | 31 |
| 3. Quasi-enveloppe..... | 34 |
| 4. Phosphoprotéine..... | 34 |
| 5. ORF4 | 35 |
| D. CYCLE REPLICATIF | 36 |
| 1. Entrée du virus dans les cellules | 36 |
| 2. Traduction – réplication du génome viral | 36 |
| 3. Sortie | 37 |
| E. ÉPIDEMIOLOGIE – TRANSMISSION | 39 |
| 1. Génotypes | 39 |
| 2. Répartition géographique des différents génotypes infectant l'Homme | 39 |
| 3. Transmission | 40 |
| 4. Épidémiologie | 41 |
| F. PATHOGENICITE CHEZ L'HOMME | 42 |
| 1. Clinique..... | 42 |
| 2. Marqueurs biologiques – diagnostic biologique | 46 |
| G. PATHOGENICITE CHEZ L'ANIMAL | 48 |
| 1. Curatif | 49 |
| 2. Préventif | 50 |
| II. METHODES D'ETUDE DU VHE AU LABORATOIRE | 51 |
| A. TYPES D'ECHANTILLONS | 51 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1. | Echantillons humains/animaux | 51 |
| 2. | Echantillons environnementaux..... | 51 |
| B. | METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE | 51 |
| 1. | rt-qPCR en temps réel | 52 |
| 2. | rt-PCR en point final | 52 |
| 3. | Méthodes de séquençage | 52 |
| C. | MICROSCOPIE ELECTRONIQUE..... | 53 |
| D. | CULTURE CELLULAIRE..... | 54 |
| E. | METHODES D'ETUDE DE L'INFECTIOSITE, DERIVEES DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE. | 56 |
| III. | VARIABILITE DU VHE ET SES CONSEQUENCES | 57 |
| A. | MECANISMES GENERAUX DE VARIABILITE VIRALE..... | 57 |
| 1. | Modifications génétiques | 57 |
| 2. | Types de virions produits..... | 57 |
| 3. | Production importante de particules virales..... | 58 |
| 4. | Conséquences en termes de diversité..... | 58 |
| 5. | Notion de quasi-espèce | 58 |
| B. | VARIABILITE DU VHE | 60 |
| 1. | Différences entre génotypes et entre sous-génotypes..... | 61 |
| 2. | Substitutions d'acides aminés connues ayant un impact sur le virus..... | 63 |
| 3. | Substitutions d'acides aminés connues ayant des conséquences cliniques | 68 |
| 4. | Recombinaisons | 70 |
| 5. | Quasi-espèce chez le VHE..... | 71 |
| IV. | CIRCULATION DU VHE DANS L'ENVIRONNEMENT – CIRCULATION CHEZ L'ANIMAL..... | 72 |
| A. | INFECTION DU PORC PAR LE VHE | 72 |
| 1. | Prévalence..... | 72 |
| 2. | Facteurs de risque | 72 |
| 3. | Histoire naturelle de l'infection par le VHE chez le cochon..... | 74 |
| 4. | Transmission du VHE chez les cochons..... | 74 |
| B. | CIRCULATION DU VHE DANS LA CHAINE ALIMENTAIRE | 75 |
| V. | CIRCULATION DU VHE DANS L'ENVIRONNEMENT – CIRCULATION HYDRIQUE..... | 76 |

| | |
|---|------------|
| VI. CIRCULATION DU VHE DANS L'ENVIRONNEMENT – CIRCULATION HYDRIQUE DANS LES PAYS INDUSTRIALISES ET LE NORD-EST DE LA FRANCE ?..... | 77 |
| A. ARGUMENTS EN FAVEUR D'UNE TRANSMISSION HYDRIQUE DES GENOTYPES 3 ET 4 | 77 |
| 1. Prélèvements hydriques ou d'aliments en contact avec l'eau..... | 77 |
| 2. Etudes épidémiologiques..... | 83 |
| B. CIRCULATION DU VHE ENTRE L'HOMME ET L'ENVIRONNEMENT DANS LES PAYS INDUSTRIALISES..... | 83 |
| VII. PERSISTANCE DU VHE DANS L'ENVIRONNEMENT | 87 |
| A. MOYENS D'ETUDE DE LA PERSISTANCE DU VHE | 87 |
| B. PERSISTANCE DU VHE DANS LA VIANDE | 87 |
| C. PERSISTANCE DU VHE DANS L'ENVIRONNEMENT HYDRIQUE | 89 |
| 1. Résistance à la température..... | 89 |
| 2. Résistance aux UV | 92 |
| 3. Résistance au chlore | 94 |
| 4. Autres méthodes de traitement du VHE | 95 |
| MATERIELS ET METHODES | 117 |
| PLAN EXPERIMENTAL..... | 119 |
| I. COLLECTION DES PRELEVEMENTS | 120 |
| A. PRELEVEMENTS HUMAINS | 120 |
| B. PRELEVEMENTS ANIMAUX..... | 120 |
| 1. Animaux sauvages | 120 |
| 2. Animaux domestiques | 120 |
| C. PRELEVEMENTS D'EAUX USEES D'ABATTOIR | 120 |
| D. PRELEVEMENTS D'EAUX USEES URBAINES | 121 |
| E. ÉTUDE D'EAUX DE RIVIERE VIA LES DREISSENES | 121 |
| II. PRETRAITEMENT APPLIQUE AUX PRELEVEMENTS AVANT EXTRACTION | 123 |
| A. PRELEVEMENTS HUMAINS | 123 |
| B. PRELEVEMENTS ANIMAUX..... | 123 |

| | | |
|------|--|------------|
| C. | PRELEVEMENTS HYDRIQUES | 124 |
| D. | PRELEVEMENTS DE DREISSENES | 125 |
| III. | EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES | 125 |
| A. | PRELEVEMENTS HUMAINS, ANIMAUX ET DE DREISSENES | 125 |
| B. | PRELEVEMENTS HYDRIQUES | 125 |
| IV. | RECHERCHE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DU GENOME DU VHE | 127 |
| A. | METHODE UTILISEE | 127 |
| B. | CONTROLE POSITIF ET GAMME DE QUANTIFICATION..... | 128 |
| 1. | Clonage | 128 |
| 2. | Mise au point et étalonnage de la gamme | 129 |
| C. | CONTROLE INTERNE | 131 |
| D. | RENDEMENT DE PRETRAITEMENT ET D'EXTRACTION | 132 |
| V. | AMPLIFICATION GENIQUE DES ECHANTILLONS EN VUE DU SEQUENÇAGE | 133 |
| A. | PCR D'AMPLIFICATION | 133 |
| B. | VERIFICATION DE L'AMPLIFICATION..... | 136 |
| C. | PURIFICATION DES AMPLICONS..... | 136 |
| VI. | SEQUENÇAGE DIRECT | 137 |
| A. | REACTION DE SEQUENCE..... | 137 |
| B. | PURIFICATION..... | 138 |
| C. | SEQUENÇAGE..... | 138 |
| D. | ANALYSE | 139 |
| VII. | SEQUENÇAGE HAUT DEBIT (ULTRA DEEP SEQUENCING, UDS) | 139 |
| A. | ÉCHANTILLONS ANALYSES..... | 139 |
| B. | PREPARATION DE LA « LIBRAIRIE » | 140 |
| 1. | Accroche des TAG..... | 140 |
| 2. | Dosage au Picogreen et dilution..... | 140 |
| 3. | Indexage des fragments | 140 |
| 4. | Vérification des produits | 141 |
| C. | CREATION DU MELANGE ET SEQUENÇAGE | 141 |
| D. | ANALYSE DES SEQUENCES | 141 |

| | | |
|--|---|------------|
| 1. | Distance génétique intra échantillon | 142 |
| 2. | Répartition des variants au sein des échantillons | 142 |
| 3. | Fréquence des différentes mutations et substitutions..... | 142 |
| 4. | Analyse phylogénique..... | 142 |
| 5. | Prédiction de l'antigénicité et de l'hydrophobie | 142 |
| RESULTATS – PRESENTATION GENERALE | | 145 |
| I. | DETERMINATION DE LA CHARGE VIRALE EN VHE..... | 147 |
| A. | RENDEMENT | 147 |
| B. | INHIBITION | 148 |
| C. | VHE | 148 |
| 1. | Échantillons humains..... | 148 |
| 2. | Échantillons animaux..... | 149 |
| 3. | Prélèvements d'eaux usées d'abattoir..... | 149 |
| 4. | Prélèvements d'eaux usées urbaines..... | 149 |
| 5. | Prélèvements de dreissènes | 150 |
| II. | REPARTITION INTRA-ECHANTILLON | 155 |
| A. | NOMBRE D'ECHANTILLONS ANALYSES | 155 |
| B. | NOMBRE DE READS | 156 |
| C. | DISTANCES GENETIQUES INTRA-ECHANTILLON | 156 |
| D. | REPARTITION DES VARIANTS VIRAUX DU VHE AU SEIN DES ECHANTILLONS..... | 156 |
| III. | SEQUENÇAGE – ETUDE DU DOMAINE M D'ORF2 DU VHE..... | 161 |
| A. | ÉCHANTILLONS SEQUENCES | 161 |
| B. | ÉTUDE DES VARIANTS DU VHE OBTENUS EN SEQUENÇAGE HAUT DEBIT..... | 161 |
| C. | ANTIGENICITE ET HYDROPHOBIE PREDITES PAR BIO-INFORMATIQUE | 162 |
| IV. | SEQUENÇAGE – ETUDE DE LA ZONE DE CHEVAUCHEMENT ORF2/ORF3 | 164 |
| A. | ÉCHANTILLONS SEQUENCES | 164 |
| B. | GENOTYPE | 164 |
| C. | RECHERCHE DE « SIGNATURES » EN ACIDES AMINES | 166 |
| D. | HOMOLOGIES ENTRE TYPES DE PRELEVEMENTS..... | 170 |
| E. | ANTIGENICITE ET HYDROPHOBIE PREDITES PAR BIO-INFORMATIQUE..... | 171 |

| | |
|--|------------|
| RESULTATS – ETUDES PUBLIEES | 177 |
| ÉTUDE N°1..... | 179 |
| ÉTUDE N°2..... | 191 |
| VALORISATIONS SCIENTIFIQUES | 241 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 243 |

Liste des principales abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALAT : Alanine Amino transférase

ARN : Acide ribonucléique

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Domaine M : Domaine *Middle*

Domaine P : Domaine *Protruding*

Domaine S : Domaine *Shell*

EMA : Monoazide d'éthidium

FCV : *Feline calicivirus* (calicivirus félin)

FFU : *Focus Forming Unit* (unité formant foyer)

ICC/PCR : *Integrated cell culture/polymerase chain reaction*

IFN : Interféron

Ig : immunoglobulines

MEGA : *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

mTOR : *Mechanistic target of rapamycin* (cible de la rapamycine)

ORF : *Open Reading Frame* (cadre de lecture ouverte)

PBS : *Phosphate Buffered Saline* (tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (amplification génique)

pdb : Paires de bases

PMA : Monoazide de propidium

PRRSV : *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (virus du syndrome reproductif et respiratoire porcin)

RT : *Reverse transcription* (transcription inverse)

rt-qPCR : Transcription inverse et amplification génique quantitative

STEP : Station d'épuration

TFL : *Time to first log reduction* (temps nécessaire pour la première diminution d'un facteur 10)

TP : Taux de prothrombine

UDS : *Ultra Deep Sequencing* (séquençage haut débit)

UI : Unités internationales

UV : Ultraviolets

VHA : Virus de l'Hépatite A

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHE : Virus de l'Hépatite E

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Organisation génomique du VHE | 30 |
| Figure 2 : Schéma de l'assemblage d'une capsidie icosaédrique de type T=3..... | 32 |
| Figure 3 : Représentation linéaire de la protéine ORF2 avec les épitopes décrits... | 33 |
| Figure 4 : Structure de la protéine ORF2..... | 33 |
| Figure 5 : Comparaison de séquences de VHE des géotypes 1 à 4 contenant des codons initiateurs potentiels pour ORF2 et ORF3 | 35 |
| Figure 6 : Cycle réplcatif du VHE | 38 |
| Figure 7 : Prévalence des IgG et IgM anti-VHE chez les donneurs de sang dans les différents départements français et prévalence de dons du sang ARN-VHE positifs | 42 |
| Figure 8 : Évolution des paramètres biologiques lors de l'infection par le VHE | 48 |
| Figure 9 : Algorithme pour le diagnostic d'une infection par le VHE | 49 |
| Figure 10 : Particules virales, obtenues à partir des selles d'un volontaire infecté suite à une inoculation expérimentale, et agrégées par le sérum d'un convalescent | 54 |
| Figure 11 : Représentation de la répartition de la population virale en quasi-espèce au sein d'un hôte (109)..... | 59 |
| Figure 12 : L'effet de « survie du plus plat » | 60 |
| Figure 13 : Structure de l'ARN monocaténaire en tige-boucle | 65 |
| Figure 14 : Principales substitutions au sein d'ORF2 | 67 |
| Figure 15 : Circulation du VHE entre l'Homme, les animaux et l'environnement..... | 86 |
| Figure 16 : Plan expérimental sur les prélèvements | 119 |
| Figure 17 : Localisation géographique des différents prélèvements | 121 |
| Figure 18 : Localisation géographique des différents sites d'incubation des dreissènes | 122 |
| Figure 19 : Principe de l'extraction utilisant des billes de silice sur l'automate EasyMag..... | 126 |
| Figure 20 : Liaison de la membrane de silice à l'eau et à l'ADN | 126 |
| Figure 21 : Cartographie d'ORF2 et ORF3 avec représentation des amorces | 129 |
| Figure 22 : Cartographie du plasmide pCRTMII-TOPO® | 130 |
| Figure 23 : Principe de la réaction de séquence..... | 137 |
| Figure 24 : Pourcentage de positifs et quantification du VHE..... | 154 |

| | |
|---|-----|
| Figure 25 : quantification des bactériophages dans les dreissènes, et représentation du type de milieu dans lequel se situe le site..... | 155 |
| Figure 26 : Représentation de la proportion des différents variants au sein de chaque prélèvement en acides aminés dans le cadre ORF3..... | 158 |
| Figure 27 : Représentation de la proportion des différents variants au sein de chaque prélèvement en acides aminés dans le cadre ORF2..... | 160 |
| Figure 28 : Présence de deux variants majoritaires en nucléotides et en acides aminés dans le cadre ORF3 mais pas dans le cadre ORF2 chez la patiente H4661 | 161 |
| Figure 29 : Séquences obtenues en séquençage haut débit sur la région ORF2 M en acides aminés..... | 162 |
| Figure 30 : Représentation de l'antigénicité et de l'hydrophobie prédites de substitutions d'acides aminés dans le domaine M d'ORF2..... | 163 |
| Figure 31 : Comparaison des séquences nucléotidiques avec des séquences de référence des génotypes 1 à 4 du VHE | 165 |
| Figure 32 : Séquences en acides aminés de la zone de chevauchement ORF2/ORF3, cadre de lecture ORF3 du VHE | 167 |
| Figure 33 : Séquences en acides aminés de la zone de chevauchement ORF2/ORF3, cadre de lecture ORF2 du VHE | 169 |
| Figure 34 : Étude de l'homologie entre les séquences de VHE sur les différents types de prélèvement. L'étude est ici présentée sur la séquence en acides aminés dans le cadre de lecture ORF3..... | 170 |
| Figure 35 : Étude de l'homologie entre les séquences de VHE sur les différents types de prélèvement. L'étude est ici présentée sur la séquence en acides aminés dans le cadre de lecture ORF2..... | 171 |
| Figure 36 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt dans le cadre de lecture ORF3..... | 173 |
| Figure 37 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt dans le cadre de lecture ORF2..... | 174 |
| Figure 38 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt pour le patient 14 dans le cadre de lecture ORF3 | 175 |
| Figure 39 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt pour le patient 14 dans le cadre de lecture ORF2 | 175 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Probabilité d'une relation causale entre l'infection par le VHE et les manifestations extra-hépatiques supposées..... | 44 |
| Tableau 2 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les eaux usées non traitées | 79 |
| Tableau 3 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les eaux usées traitées | 82 |
| Tableau 4 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les fruits de mer mollusques bivalves | 84 |
| Tableau 5 : Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la rt-qPCR VHE en temps réel..... | 127 |
| Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la rt-qPCR VHE en temps réel..... | 127 |
| Tableau 7 : Programme de rt-qPCR temps réel pour VHE et VHC..... | 128 |
| Tableau 8 : Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la rt-qPCR VHE en temps réel..... | 131 |
| Tableau 9 : Mélange réactionnel pour la rt-qPCR VHC en temps réel..... | 132 |
| Tableau 10 : Séquence des amorces pour la rt-PCR VHE en point final | 133 |
| Tableau 11 : Mélanges réactionnels de la rt-PCR VHE en point final..... | 134 |
| Tableau 12 : Programme de rt-PCR en point final pour VHE..... | 135 |
| Tableau 13 : Mélange réactionnel de la PCR2 VHE en point final..... | 135 |
| Tableau 14 : programmes de PCR2 en point final pour VHE..... | 136 |
| Tableau 15 : Mélange réactionnel de la réaction de séquence..... | 138 |
| Tableau 16 : Programme de la réaction de séquence | 138 |
| Tableau 17 : Caractéristiques des patients..... | 151 |

Introduction

Le virus de l'hépatite E (VHE) entraîne des hépatites pouvant être symptomatiques ou non. Des manifestations graves sont possibles et peuvent conduire à une morbidité sévère, au décès ou à des pathologies chroniques. Selon l'organisation mondiale de la santé, le VHE infecte chaque année 20 millions de personnes à travers le monde, donnant lieu à 3,3 millions de cas d'hépatite aiguë et l'estimation de la mortalité liée au VHE était de 44000 décès en 2015 [1].

Le VHE est un virus circulant dans le monde entier, notamment dans les pays industrialisés, ce qui n'était pas connu jusqu'à récemment et a été révélé à la faveur de l'amélioration de la sensibilité des tests sérologiques.

Le pouvoir pathogène du VHE n'est pas encore très bien connu : nous savons que ce virus entraîne des hépatites de sévérité variable (pouvant aller de la forme asymptomatique à l'hépatite fulminante avec nécessité de transplantation hépatique), des manifestations graves avec taux de mortalité élevé chez les femmes enceintes ainsi que des manifestations extra-hépatiques (neurologiques et rénales, notamment) dont l'étendue reste encore à préciser. La physiopathologie de l'atteinte par le VHE doit aussi être mieux comprise : les mécanismes entraînant une infection d'une gravité particulière chez la femme enceinte ne sont pas encore clairement élucidés de même que les mécanismes conduisant aux manifestations extra-hépatiques. Les facteurs conduisant à une hépatite asymptomatique ou fulminante ne sont pas encore clairs non plus. Le VHE peut entraîner des formes chroniques chez les patients immunodéprimés avec évolution rapide vers la cirrhose ; les facteurs entraînant une forme chronique lors de l'infection d'un patient immunodéprimé doivent être explorés.

La présentation très polymorphe de l'infection entraîne des problèmes de sous diagnostic : le médecin n'évoquera pas forcément cette hypothèse diagnostique devant un tableau clinique atypique.

Dans les pays en développement, le VHE connaît une transmission par voie hydrique, strictement humaine et les cas sont groupés (présentation épidémique). Les géotypes de VHE circulant dans les pays industrialisés infectent certains animaux (porcins, notamment) et les humains se contaminent principalement par ingestion de viande crue ou mal cuite d'animaux contaminés. Dans ces pays, les cas se présentent de manière sporadique. Les voies de circulation du VHE dans les pays industrialisés ne sont pas encore claires, une transmission par voie hydrique est suspectée.

La transmission du virus dépend en partie de sa capacité à rester infectieux en dehors d'un hôte, dans un milieu donné (persistance). Même si des travaux portant sur la persistance du VHE dans différents milieux et sous différentes conditions (température, UV...) ont été réalisés ces dernières années, il reste encore beaucoup d'inconnues sur la persistance du VHE et donc sur sa transmission.

Le VHE, est, comme tous les virus à ARN, variable. Ceci entraîne l'existence de plusieurs génotypes, eux-mêmes subdivisés en sous-génotypes. Par ailleurs, chez un hôte, la population est répartie en quasi-espèce avec, le plus souvent, un variant majoritaire et de nombreux variants minoritaires mais pouvant néanmoins jouer un rôle dans la pathogénèse virale. La distribution du VHE en quasi-espèces pourrait favoriser certains variants viraux plutôt que d'autres et permettre une adaptation de certains virus minoritaires à des environnements changeants, vivants ou inertes.

Le VHE peut exister sous deux formes : une forme non-enveloppée retrouvée dans les selles et l'environnement ou une forme dite quasi-enveloppée retrouvée dans le sang et en culture cellulaire. Le virus ne présente pas le même profil de persistance ni le même pouvoir d'infection selon la forme sous laquelle il se trouve. Toute cette variabilité rend délicate l'interprétation des résultats des études : selon le génotype (et donc l'origine géographique) et la forme du virus étudié, les résultats peuvent ne pas être transposables ni généralisables. La variabilité peut également entraîner des problèmes de diagnostic (baisse de la sensibilité des tests du fait de la variabilité de la cible) et de traitement.

La prévention des infections par le VHE constitue un enjeu sanitaire important à travers le monde. Cette prévention passe par une meilleure connaissance du virus et une meilleure compréhension de sa transmission et de sa circulation et donc de sa variabilité, de son pouvoir pathogène et de sa persistance.

Objectifs des travaux de thèse

Le VHE est un virus très fréquemment rencontré à travers le monde, y compris dans les pays industrialisés où il est responsable de nombreuses infections pouvant donner des atteintes graves. Il s'agit par conséquent d'un enjeu sanitaire important. Afin de prévenir les infections graves et leurs complications, des actions préventives seraient à mettre au point qui, dans ce contexte, reposent principalement sur le contrôle de la circulation du virus dans l'environnement et les produits destinés à la consommation humaine. Cependant, la circulation du VHE dans l'environnement dans les pays développés est encore mal connue. De plus, la vaccination des populations à risque est l'autre volet préventif à envisager.

Le VHE est retrouvé en France avec un gradient nord-sud concernant la séroprévalence, qui est élevée en Lorraine.

Notre objectif était d'étudier, avec des outils moléculaires explorant le génome viral, la circulation du VHE entre l'Homme et l'environnement, en Lorraine.

Dans ce but, une collection d'échantillons biologiques (sanguins et fécaux) issus de patients suivis au CHRU de Nancy a été constituée, pour caractériser des expressions cliniques polymorphes et étudier la variabilité génétique des souches de VHE. Les patients présentaient des terrains différents et des hépatites de sévérité variable.

De plus, afin de préciser le circuit du virus, des collectes d'échantillons environnementaux (eaux usées urbaines, eaux usées d'un abattoir porcin, selles porcines, foie et selles de sangliers, mollusques d'eau douce) ont été réalisées en 2016, 2017 et 2018, visant à documenter avec des outils moléculaires la circulation du VHE en Lorraine, région prise pour modèle d'une région urbaine et semi-urbaine de pays industrialisé.

Le VHE de génotype 3, majoritaire dans les pays développés et notamment en France, infecte l'Homme et des hôtes animaux. On observe dans le même temps des variations dans le virus et, notamment, dans les protéines en contact avec l'extérieur du virus : les protéines ORF2 et ORF3. Ces protéines étant externes, elles jouent un rôle dans les interactions du virus avec son environnement proche : récepteurs cellulaires, système immunitaire de l'hôte et surfaces du milieu extérieur. L'étude des variations de ces protéines peut donc nous renseigner sur la circulation

du VHE entre ses hôtes naturels et l'environnement. Il s'agissait dans le cadre de nos travaux expérimentaux, de mettre en évidence des « signatures moléculaires » - acides aminés spécifiques d'un pouvoir pathogène viral, ou spécifiques d'un type d'hôte ou d'environnement.

Données bibliographiques

I. Le virus de l'hépatite E

A. Historique et découverte du virus

La notion de « jaunisse » a été retrouvée dans un traité de médecine sumérien 3000 ans avant notre ère [2]. Hippocrate (-460 -375) a décrit les caractéristiques cliniques de la jaunisse épidémique [2]. Vers le milieu du XXe siècle, l'existence d'au moins deux types d'hépatites infectieuses a été décrite : l'une avec une incubation courte et l'autre avec une incubation longue [2], l'une était associée à une contamination féco-orale, l'autre à une contamination par injection (vaccination, transfusion). Les virus des hépatites B et A ont été découverts en 1970 et à la fin des années 1970 respectivement. L'existence d'une hépatite « non-A, non-B » de transmission parentérale a été établie en 1974 [2] et le virus de l'hépatite C a été découvert en 1989. L'existence d'une hépatite « non-A, non-B » de transmission entérique a été établie dans les années 1980 lorsque les premiers tests sérologiques pour le diagnostic de l'hépatite A ont été utilisés [3]. En Inde, l'observation avait été faite d'hépatites ayant un fort taux de létalité chez les femmes enceintes ; une épidémie dans la région du Cachemire en 1978 a donné lieu à une large enquête, laissant suspecter un virus d'hépatite « non-A, non-B » à transmission entérique [4]. En 1983, Balayan a mis en évidence des particules virales dans les selles d'un volontaire ayant ingéré des selles de patients fortement suspects d'hépatite « non-A, non-B » de transmission entérique et ayant développé des signes d'hépatite 36 jours après [5]. L'antigène du VHE a été identifié en 1989 [6].

B. Taxonomie

Le VHE appartient à la famille des *Hepeviridae*, genre *Orthohepevirus*. Un autre genre de la famille, le genre *Piscihepevirus* infecte les truites. Le genre *Orthohepevirus* comporte des espèces infectant les oiseaux (*Orthohepevirus B*), les rongeurs, soricomorphes et carnivores (*Orthohepevirus C*) et les chauves-souris (*Orthohepevirus D*) [7]. Le VHE infectant les humains est un *Orthohepevirus A*. Récemment, un *Orthohepevirus C* a été mis en cause dans un cas d'hépatite chez un patient immunodéprimé, bien que la voie de transmission dans ce cas ne soit pas claire [8].

C. Structure

Le VHE est un virus de forme sphérique, de 27-34 nm pour la forme non-enveloppée et de 50-110 nm pour la forme quasi-enveloppée [9].

1. Génome

Le génome du VHE est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 7200 bases, présentant une coiffe de 7-méthylguanosine en 5' [10], indispensable au caractère infectieux du virus, et une queue poly-A en 3'. La région codante est encadrée par une région non codante de 25 nucléotides en 5' et une région non codante de 65 nucléotides en 3' [11]. La région codante comporte trois cadres de lecture ouverte (ORF1-ORF3) (figure 1). Il existe une région de jonction située entre ORF1 et le début de la région codant l'ARN subgénomique [10]. Deux éléments cis-réactifs ont été localisés : le premier chevauche la région 3' d'ORF2 et la zone non codante en 3' et est essentiel pour la réplication ; le deuxième est localisé dans la région de jonction et pourrait être le promoteur de la transcription de l'ARN subgénomique [10].

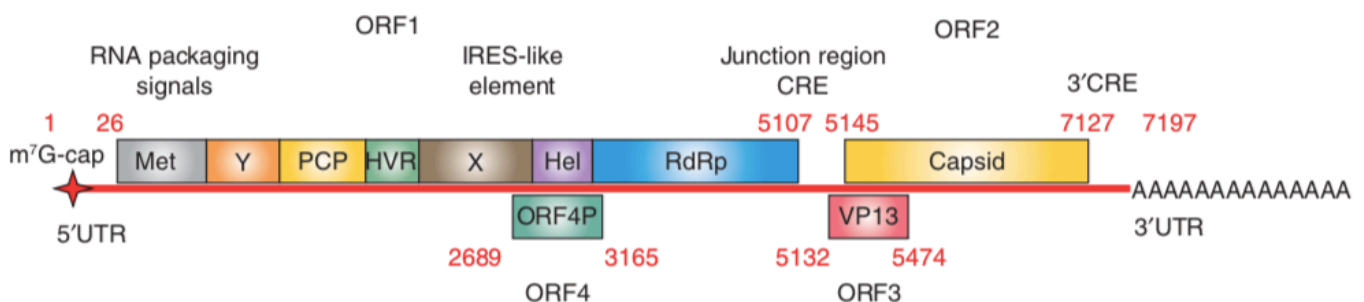


Figure 1 : Organisation génomique du VHE

(d'après Kenney *et al.*, 2012 [12]). UTR : région non traduite, m⁷G-cap : coiffe en 5', met : méthyltransférase, PCP : domaine cystéine protéase « papaine-like », HVR : région hypervariable, Hel : hélicase, RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante, CRE : élément cis-réactif, VP13 = ORF3, ORF4 est traduit grâce à un élément IRES (*internal ribosome entry site*)-like.

ORF1 comporte environ 5000 bases et code une polyprotéine non structurale d'environ 186 kDa impliquée dans la synthèse de l'ARN. Les modifications post-traductionnelles sont encore peu connues mais la thrombine et le facteur X activé semblent jouer un rôle dans le clivage de la polyprotéine, et ceci à un stade très

précoce du cycle répliatif du VHE [13]. La protéine ORF1 comporte plusieurs domaines (figure 1) :

- La méthyltransférase à l'extrémité N-terminale dont le rôle est de mettre la coiffe de l'ARN génomique [14],
- Un domaine « Y » dont la fonction n'est pas encore claire, même s'il a été montré que les cystéines en positions 336 et 337 et le tryptophane en position 413 étaient très conservés et cruciaux pour la réplication virale. Il a été suggéré que ces résidus joueraient un rôle dans le ciblage des protéines virales vers les membranes du complexe de réplication. Par ailleurs, la structure de l'ARN du domaine Y semble importante pour la réplication virale [12].
- Un domaine cystéine protéase « papaïne-like » qui, en plus de son activité protéase, serait impliqué dans l'échappement immunitaire par son activité antagoniste de l'interféron (IFN)- β [12],
- Une région riche en proline contenant une région hypervariable,
- Un domaine « X » (ou macrodomaine), qui pourrait jouer un rôle dans la transformation de l'ADP-ribose-1'-monophosphate en ADP ribose ainsi qu'un rôle d'interférence avec l'IFN- β [12].
- Un domaine hélicase qui jouerait un rôle dans la 1^{ère} étape de synthèse de la coiffe [15].
- Un domaine ARN polymérase ARN-dépendante.

ORF2 compte 1980 bases et code la protéine de capsid, qui compte 660 acides aminés. ORF3 compte 369 bases et code une petite phosphoprotéine. Un quatrième cadre de lecture ouverte, ORF4, a été décrit pour le génotype 1 : la protéine ORF4 joue un rôle important dans la réplication des virus de ce génotype [16].

2. Capsid

Le VHE possède une capsid icosaédrique composée de la protéine codée par le gène ORF2. La capsid comporte 180 protéines ORF2, un treillis icosaédrique T=3 (figure 2), avec des intermédiaires décameriques [17]. Cette protéine comporte 660 acides aminés et sa masse est estimée à 72 kDa [10]. Elle est impliquée dans l'assemblage de la particule virale et dans ses interactions avec les cellules cibles. Il

Il y a un peptide signal en N-terminal (résidus 28-101) entraînant une sécrétion de la protéine dans le réticulum endoplasmique [10,18]. La partie N-terminale est également impliquée dans la liaison de la protéine de capsid à l'ARN, entraînant le début de l'encapsidation [17]. Trois domaines ont été décrits :

- Domaine S (*shell*) : acides aminés 129-319 (le plus conservé entre les différents génotypes [17])
- Domaine M (*middle*) : acides aminés 320-455
- Domaine P (*protruding*) : acides aminés 456-606 [19].

Le domaine S se situe le plus vers l'intérieur de la particule virale [17]. A l'interface entre les domaines M et P (acides aminés 445 à 467), une région riche en proline est décrite [20]. Il existe 3 sites de N-glycosylation : les asparagines 132, 310 et 562 [21]. Plusieurs sites antigéniques ont été décrits (figure 3) : un épitope immunodominant conformationnel entre les acides aminés 394 et 457 et un épitope neutralisant entre les acides aminés 452 et 617 [22]. Des épitopes linéaires ont également été décrits au niveau des acides aminés 410 à 415 et 426 à 429 [23] ainsi que 407 à 410 et 458 à 462 dans des virus de génotype 4 [24].

La protéine ORF2 forme un homodimère au niveau de l'extrémité C-terminale (figure 4) ; les résidus 503, 548, 552, 555, 557, 561, 598 et 600 sont importants pour maintenir le dimère. Les résidus 597, 598, 599, 601 et 602 jouent également un rôle dans la formation du dimère [10].

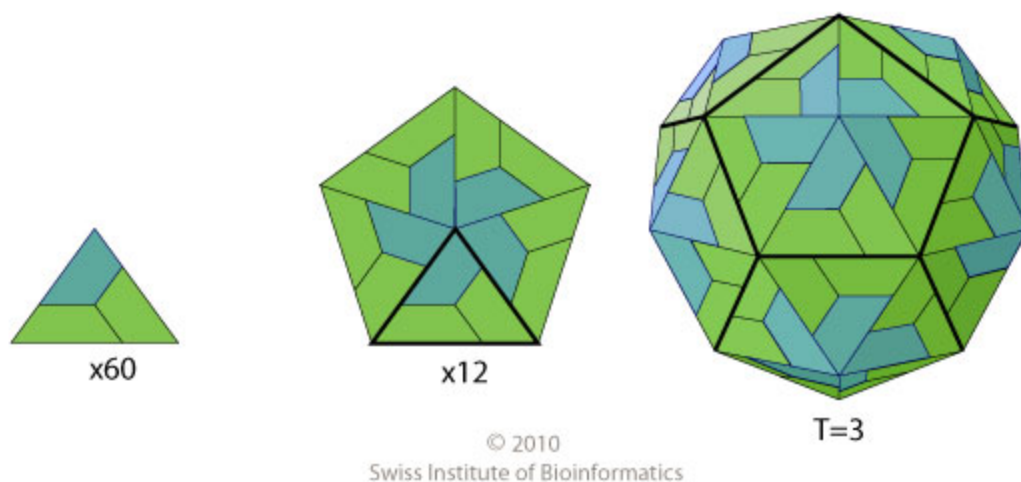
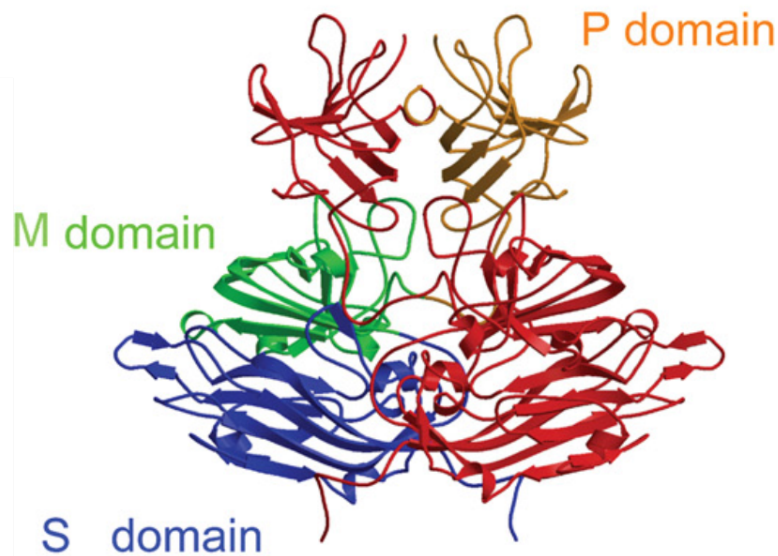
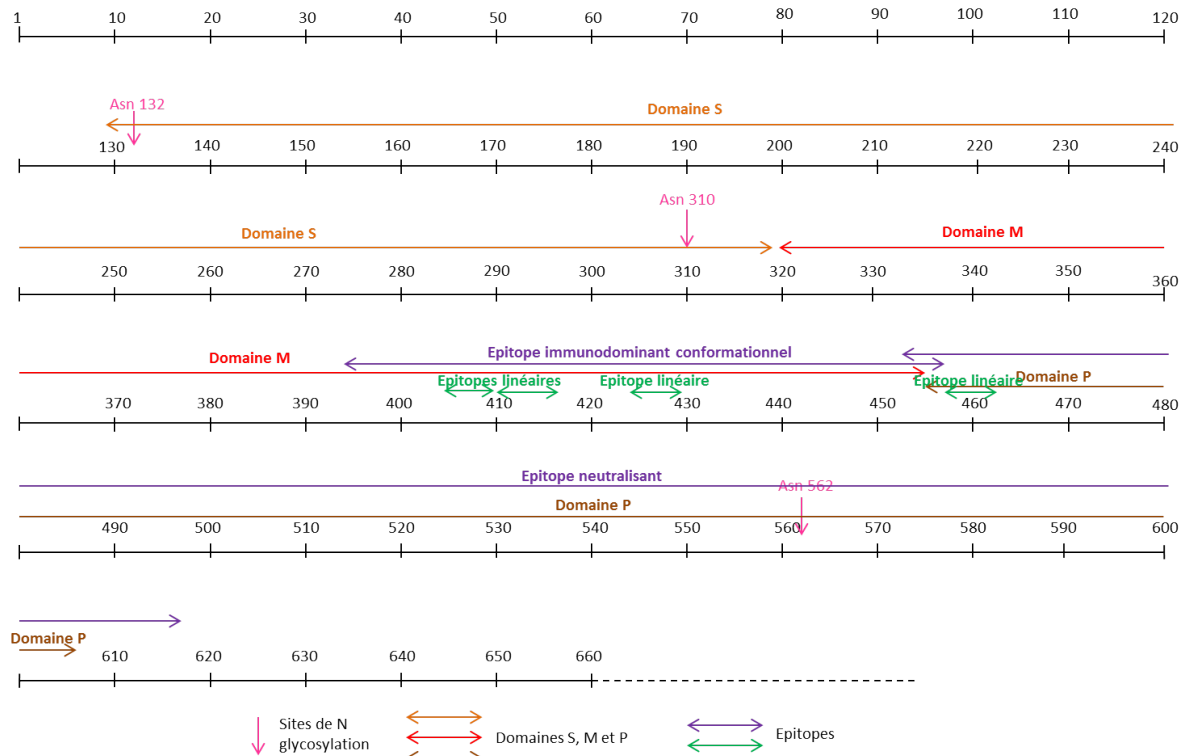


Figure 2 : Schéma de l'assemblage d'une capsid icosaérique de type T=3
(d'après Viral Zone [25])



(d'après Xing *et al.*, 2010 [17]). Structure dimérique de la protéine de capside. Une sous-unité est colorée en rouge, et l'autre est colorée selon le domaine : bleu = S, vert = M, orange = P.

Durant le cycle de réplication du VHE, la protéine ORF2 est à un moment transloquée dans le noyau de la cellule hôte, où elle pourrait jouer un rôle dans le contrôle de certaines fonctions cellulaires afin de favoriser la réplication virale et/ou de modifier la réponse antivirale de la cellule infectée [26].

En culture, la protéine ORF2 est produite sous trois isoformes. Une seule isoforme est associée aux particules virales infectieuses et il s'agit de la moins abondante. Elle ne semble pas subir de modifications post-traductionnelles. Les deux autres formes subissent des modifications post-traductionnelles (glycosylation et sialylation) et sont secrétées. Des tests réalisés sur des séra de patients semblent montrer que, là aussi, les deux isoformes d'ORF2 secrétées et non associées à des particules infectieuses sont présentes en plus grande abondance que l'isoforme associée aux particules infectieuses [27]. Ceci pourrait avoir un rôle de leurre pour le système immunitaire et participer à une stratégie virale d'échappement immunitaire. Le début de la protéine ORF2 ne semble pas être le même pour les trois isoformes (acide aminé 14 pour la forme associée aux particules infectieuses, acides aminés 34 et 102 pour les deux autres isoformes) [26].

3. *Quasi-enveloppe*

Le VHE, bien qu'étant un virus non enveloppé, peut exister sous une forme « quasi-enveloppée », associée à des lipides. Le virus semble être produit par les cellules sous cette forme et circuler dans le sang sous cette forme mais perd cette couche lipidique lors d'un contact avec les acides biliaires et enzymes pancréatiques : il se retrouve donc sous forme non-enveloppée lorsqu'il est excrété dans les selles [28]. La quasi-enveloppe est dérivée des exosomes et est composée de cholestérol, phospholipides, sphingomyélines, phosphatidyléthanolamines, phosphoinositides et céramides [29].

4. *Phosphoprotéine*

Le gène ORF3 code une petite phosphoprotéine de 123 acides aminés (114 selon certains auteurs), ayant une masse moléculaire de 13kDa. Cette protéine interagit avec le cytosquelette *via* son domaine N-terminal hydrophobe ; elle s'associe avec les microtubules par des interactions électrostatiques [30]. Selon une étude publiée en 2017, la protéine ORF3 présente les caractéristiques d'un canal

ionique nécessaire à la sortie des virions de la cellule [31]. L'extrémité C-terminale serait orientée vers la lumière du réticulum endoplasmique tandis que l'extrémité N-terminale phosphorylée serait du côté du cytosol. La protéine ORF3 comporte deux domaines N-terminaux hydrophobes et deux régions C-terminales riches en proline. Elle interagit avec la protéine ORF2 et ceci pourrait jouer un rôle dans l'assemblage des virions. La protéine ORF3 est présente au niveau du virion quasi-enveloppé [10,32,33]. Elle semble nécessaire pour la propagation du virus dans le foie [34]. Une particularité du début d'ORF3 a été décrite chez le VHE de génotype 4 : il existe une insertion d'un uracile juste après le deuxième codon AUG, entraînant un décalage de cadre de lecture avec initiation de la traduction par différents codons en ORF3 et ORF2. Ceci allongerait ORF2 de 14 acides aminés et raccourcirait ORF3 de 9 acides aminés [35] (figure 5). Il n'y a pas de différence d'antigénicité observée [36].



Figure 5 : Comparaison de séquences de VHE des génotypes 1 à 4 contenant des codons initiateurs potentiels pour ORF2 et ORF3

(d'après Okamoto [35]). Rectangles gris : codons initiateurs potentiels d'ORF3, rectangles blancs : codons initiateurs potentiels d'ORF2. L'insertion d'un uracile retrouvée exclusivement dans les isolats de génotype 4 est indiquée par le triangle noir. Une barre horizontale marque le codon UGA terminal d'ORF1.

5. ORF4

La protéine ORF4 a été décrite pour le génotype 1 et comporte entre 139 et 158 acides aminés [16]. Elle est nécessaire au fonctionnement de la polymérase des virus de ce génotype. La protéine ORF4 est synthétisée lors d'un stress du réticulum endoplasmique, qui pourrait être lié à la réponse antivirale (et serait également présent lors de la grossesse). Sa traduction n'est pas régulée de la même façon que celle d'ORF1 (qui passe par la coiffe) ; il semble exister une structure IRES-*like* au niveau de l'ARN qui déclencherait la traduction d'ORF4. La protéine ORF4 interagirait avec des protéines de l'hôte, notamment le facteur d'élongation eucaryotique 1, isoforme 1 (eEF1 α 1), ce qui lui permettrait de promouvoir l'activité de

la polymérase. Pour le VHE de génotype 3, des protéines de l'hôte assureraient la fonction d'ORF4. La présence de cette protéine chez le VHE de génotype 1 et son expression uniquement lors d'un stress du réticulum endoplasmique expliqueraient que, contrairement au VHE de génotype 3, le VHE de génotype 1 ne peut pas se multiplier *in vitro* dans des cellules de mammifères en conditions standard [16].

D. Cycle répliatif (figure 6)

1. Entrée du virus dans les cellules

Le récepteur cellulaire du VHE n'est pas connu à ce jour. Les mécanismes d'entrée sont différents et d'efficacité variable selon qu'il s'agisse de la forme non-enveloppée ou de la forme quasi-enveloppée : le VHE quasi-enveloppé s'attache de manière beaucoup moins efficace aux cellules que la forme non-enveloppée ce qui entraîne une infection des cellules à un taux plus bas [37].

La forme non-enveloppée s'attache initialement à la membrane cellulaire par les molécules d'héparane sulfate [28] et possiblement la protéine *heat shock cognate protein 70* (HSC 70) [12].

L'entrée de la forme quasi-enveloppée est dépendante des deux GTPases Rab5 et Rab7 [37].

Le virus rentre dans la cellule par endocytose, en utilisant la clathrine et la dynamine-2 [38]. L'entrée de la forme quasi-enveloppée nécessite une acidification endosomale et la dégradation des lipides dans les lysosomes : la quasi-enveloppe serait dégradée dans les endolysosomes avant la décapsidation [37]. Les protéines de choc thermique HSP90 et Grp78 sont impliquées dans le transport intracellulaire des virions [12].

2. Traduction – répliation du génome viral

Après la décapsidation, ORF1 est traduit et les protéines non structurales sont synthétisées. Un brin d'ARN de polarité négative va alors être synthétisé à partir de l'ARN génomique de polarité positive. Ce nouveau brin d'ARN servira de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN génomique ainsi que pour la synthèse de l'ARN subgénomique : il s'agit d'un ARN de 2,2 kb comportant ORF2 et ORF3. L'ARN subgénomique est traduit en protéines ORF2 et ORF3 qui serviront à l'encapsidation des nouveaux ARN génomiques pour former les nouveaux virions [33].

3. Sortie

La protéine ORF3 est nécessaire pour cette étape, et son interaction avec de nombreuses protéines est importante, dont la protéine TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) de l'hôte [33] ; cependant cette nécessité d'ORF3 est débattue [39]. Le VHE utilise la voie des exosomes et des corps multivésiculaires pour sortir de la cellule [40]. Il semble être sous forme quasi-enveloppée lors de sa sortie : il est sous cette forme dans le surnageant de nombreuses lignées cellulaires ainsi que dans les échantillons de sérum mais perd la quasi-enveloppe lors du contact avec les acides biliaires et enzymes pancréatiques, il se trouve sous forme non-enveloppée dans les selles [28,32]. La sortie s'effectue majoritairement au pôle apical de la cellule et il y aurait une différence de composition de la quasi-enveloppe entre les particules produites par le pôle apical et par le pôle basolatéral [41]. La protéine ORF2 sous forme glycosylée soluble est sécrétée en quantité similaire aux deux pôles de la cellule [41].

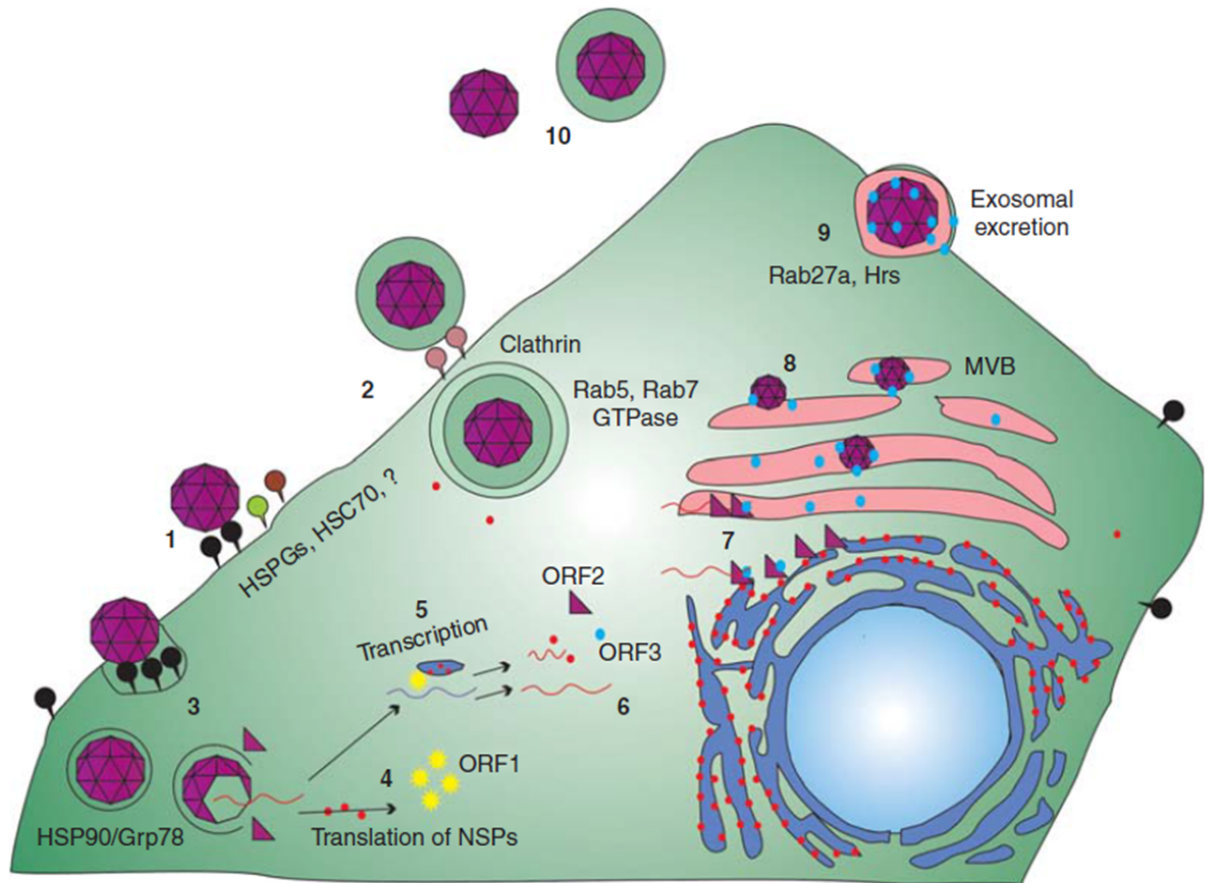


Figure 6 : Cycle réplcatif du VHE

d'après Kenney et al., 2019 [12]. (1) Les virions non-enveloppés s'attachent aux récepteurs cellulaires avant l'étape d'internalisation. (2) L'entrée des virions quasi-enveloppés est sous la dépendance des GTPases Rab 5 and Rab7 et une étape de dégradation des lipides dans les lysosomes est nécessaire. (3) Transport des virions vers le site de libération du génome. (4) L'ARN génomique sert d'ARN messager pour la traduction d'ORF1.

(5) Les protéines non structurales transcrivent l'ARN de polarité positive en un ARN de polarité négative. L'ARN subgénomique est généré à partir de l'ARN de polarité négative et est traduit en protéines ORF2 et ORF3. (6) Les ribosomes de l'hôte poursuivent la traduction en protéines ORF1, ORF2 et ORF3. (7) ORF2 s'associe à l'ARN génomique et commence sa multimérisation. ORF3 se lie à ORF2 durant le transit vers la membrane cellulaire. (8) Les particules virales acquièrent probablement une quasi-enveloppe par bourgeonnement dans des vésicules intracellulaires. (9) Les virions quasi-enveloppés sont libérés à la membrane cellulaire via la voie exosomale. (10) Les virions perdent leur quasi-enveloppe lors du transit par les voies biliaires.

E. Épidémiologie – transmission

1. Génotypes

Bien qu'il n'existe qu'un seul sérotype, différents génotypes ont été décrits chez le VHE. La classification en génotypes a été débattue mais les spécialistes sont parvenus à un consensus récemment [7]. Il existe actuellement huit génotypes : les génotypes 1 à 4 sont les principaux génotypes infectant l'Homme. Les génotypes 1 et 2 sont, d'après les données actuelles, strictement humains tandis que les génotypes 3 et 4 provoquent également des zoonoses, pouvant infecter de nombreux types de mammifères, notamment les porcins, cerfs et lapins [42–45]. Les génotypes 5 et 6 infectent les sangliers et, en l'état actuel des connaissances, n'infectent pas l'Homme [46]. Pour ce qui est du génotype 7, il touche principalement les camélidés et un cas de transmission à l'Homme a été décrit, engendrant une hépatite chronique [47]. Le génotype 8 infecte les camélidés [46]. Le génotype 1 comporte six sous-génotypes (1a-1f), le génotype 2 (plus rarement retrouvé) comporterait deux sous-génotypes (2a-2b), le génotype 3 comporte trois clades : le clade 3efg, qui regroupe les sous-génotypes 3e, 3f et 3g ainsi que cinq variants non classés, le clade 3abchij qui regroupe les sous-génotypes 3a, 3b, 3c, 3h, 3i, 3j ainsi que quatre variants non classés ; le clade 3ra est un peu à part et comporte un sous-type infectant les lapins mais pouvant infecter l'Homme [48]. Le génotype 4 comporte neuf sous-génotypes (4a-4i) ; quant aux génotypes 5 à 8, il n'y a pas encore de classification nette en sous-génotypes (peu de séquences complètes sont disponibles à ce jour) même s'il semble pour le moment y avoir deux clades dans chacun des génotypes 6 et 7 [7].

2. Répartition géographique des différents génotypes infectant l'Homme

Les génotypes 1 et 2 sont principalement retrouvés dans des pays en voie de développement avec des mauvaises infrastructures hydriques. Le génotype 1 a été décrit en Asie (sous-continent indien, Chine, Bangladesh, Népal, Pakistan et Afghanistan) et en Afrique sub-saharienne. Le génotype 2 est plus rarement retrouvé ; il a été décrit au Mexique et dans certains pays d'Afrique (Nigeria, Tchad, Soudan et République centrafricaine) [49].

Le génotype 3 est plus ubiquitaire. Il est retrouvé en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique latine, en Afrique du Sud, en Asie, Australie et Nouvelle-

Zélande. Le génotype 4 est retrouvé en Chine, au nord du Japon, en Inde et de manière sporadique en Europe [9,49].

Le génotype 7 a été, pour le moment, retrouvé aux Émirats Arabes Unis, au Pakistan, en Somalie ainsi qu'au Kenya [50].

Au sein du génotype 3, une étude réalisée en Europe montre que la distribution des clades était différente entre les prélèvements issus de France par rapport aux autres pays européens : le clade 3efg est plus courant en France que le clade 3abchij, alors que le contraire est observé dans les autres pays européens (différence statistiquement significative) [48].

3. *Transmission*

Les génotypes 1 et 2 sont exclusivement humains et ont une transmission hydrique. Le péril fécal peut contaminer les eaux souterraines, les récoltes ou les canaux ; les eaux des rivières, utilisées pour la boisson, la baignade ou pour laver la vaisselle peuvent être contaminées [51]. Les génotypes 3 et 4 peuvent infecter les humains mais également différentes espèces animales : cochons, sangliers, cerfs ou lapins. Ils se transmettent par ingestion de viande contaminée crue ou mal cuite [42–45] ou une exposition aux porcs [52–54] (vétérinaires, personnel de ferme ou d'abattoir, notamment). Le génotype 7 infecte les camélidés ; un cas de transmission à l'Homme a été décrit : le patient mangeait de la viande de chameau et buvait du lait de chamelle [47].

Le VHE peut également être transmis par voie transplacentaire, par l'allaitement ainsi que par voie sanguine (lors de transfusions, notamment), bien que ce dernier mode de transmission semble moins efficace, possiblement du fait de la présence de virus sous forme quasi-enveloppée [37].

La transmission du VHE de personne à personne a été longtemps controversée mais il semble que cela ne soit pas un mode de transmission très important [51]. Une étude portant sur une épidémie au nord de l'Ouganda a mis en évidence comme facteurs de risque le fait d'avoir des récipients de stockage de l'eau à large ouverture (*odds ratio* 2,83 (1,16–6,94)) et le fait de se laver les mains dans un récipient commun (*odds ratio* 1,90 (1,07–3,38)) [55]. Les auteurs suggèrent qu'une contamination de l'eau de boisson a pu survenir au sein du foyer (ce qui aurait eu

pour effet de multiplier les cas secondaires autour d'un cas) et qu'une contamination de personne à personne semble possible bien qu'inhabituelle.

4. *Épidémiologie*

Les génotypes 1 et 2 circulent principalement dans les pays en développement où ils se transmettent par voie hydrique. Ces deux génotypes entraînent des épidémies. Les épidémies surviennent périodiquement alors que la population est exposée en permanence à la pollution fécale : il semble que peu après une épidémie, de nombreuses personnes aient des taux protecteurs d'anticorps, ce qui empêche la survenue d'une autre épidémie pendant un temps, puis les anticorps vont diminuer progressivement et une nouvelle épidémie sera possible en dessous d'un certain seuil d'anticorps [51].

Les génotypes 3 et 4, quant à eux, entraînent plutôt des cas sporadiques. De nombreux cas sont asymptomatiques et les cas les plus symptomatiques sont surtout retrouvés chez des hommes de plus de 50 ans. Il y a longtemps eu (et il y a encore) un problème de sous-diagnostic de l'infection à VHE dans les pays développés : fréquence des infections asymptomatiques, faible sensibilité des tests diagnostiques et notamment sérologiques et absence de recherche spécifique de ce virus par les médecins devant un tableau de cytolysé hépatique [56].

En France, le génotype le plus fréquemment retrouvé est le génotype 3 ; il existe un gradient Nord-Sud concernant la séroprévalence avec des séroprévalences plus élevées dans le Sud [57] (Sud-Ouest, notamment). A noter une séroprévalence relativement élevée dans le Nord-Est (figure 7).

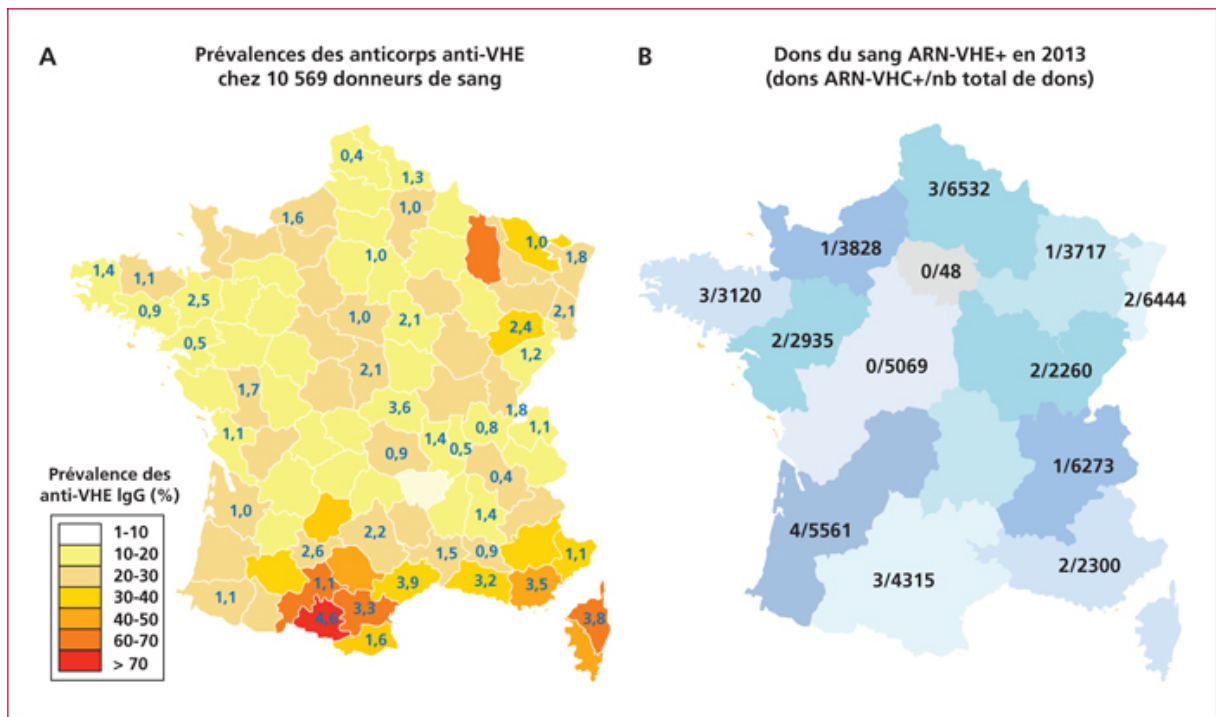


Figure 7 : Prévalence des IgG et IgM anti-VHE chez les donateurs de sang dans les différents départements français et prévalence de dons du sang ARN-VHE positifs

A) Prévalence des IgG et IgM anti-VHE chez les donateurs de sang dans les différents départements français. B) Prévalence de dons du sang ARN-VHE positifs. Les nombres en bleu : séroprévalence des anti-VHE IgM (%). (D'après Guillaume *et al.*, 2018 [58]).

F. Pathogénicité chez l'Homme

1. Clinique

L'infection par le VHE chez l'Homme est le plus souvent asymptomatique (80% des cas liés aux génotypes 1 et 2 [59], 67 à 98% des cas dans les pays développés [60]).

1.a) Atteinte hépatique

Le virus possède un tropisme hépatocytaire et peut donner des hépatites de symptomatologie et de gravité variables : les symptômes habituels d'hépatite sont possibles (nausées, vomissements, douleurs abdominales, asthénie, ictère...) et, dans 2% des cas, il y a une hépatite fulminante [61]. Les hommes âgés sont les personnes les plus fréquemment symptomatiques dans les pays développés (génotype 3) tandis que les hommes jeunes et les femmes enceintes sont les plus

touchés dans les pays en développement (génotypes 1 et 2). L'incubation dure 2 à 6 semaines et l'ictère est présent dans 40% des cas dans les pays en développement [60].

1.b) Atteintes extra-hépatiques

Des atteintes extra-hépatiques liées au VHE ont été décrites récemment. Le lien de causalité n'est pas toujours clair entre ces atteintes et le VHE [62] :

- ❖ Force : l'association doit être forte,
- ❖ Consistance : l'association doit avoir été constatée par plusieurs auteurs,
- ❖ Temporalité : la temporalité doit être compatible (atteintes extra-hépatiques survenant en même temps ou au décours de l'infection par le VHE),
- ❖ Plausibilité et analogie : la physiopathologie doit avoir déjà été étayée pour d'autres infections (exemple : virus de l'hépatite C)
- ❖ les données expérimentales doivent être en faveur d'une relation causale.

Le [tableau 1](#) retrace l'imputabilité actuellement estimée pour les principales atteintes extra-hépatiques du VHE. La physiopathologie de ces atteintes extra-hépatiques pourrait être associée au virus et/ou à l'hôte.

Tableau 1 : Probabilité d'une relation causale entre l'infection par le VHE et les manifestations extra-hépatiques supposées (d'après Pischke et al., 2017 [62])

| Assumed extrahepatic manifestation | Current data | Hill's criteria | Estimated likelihood of causal relationship |
|------------------------------------|---|---|---|
| Neuralgic amyotrophy | <ul style="list-style-type: none"> Acute HEV infection in 11% of NA patients HEV replication in neuronal cells proven (<i>in vitro</i>) | <ul style="list-style-type: none"> Strong association, temporality Experimental | Very probable |
| Guillain-Barré syndrome | <ul style="list-style-type: none"> Acute HEV infection in 10% of GBS patients from India and 5% from the Netherlands HEV replication in neuronal cells proven (<i>in vitro</i>) Typical post-infectious condition | <ul style="list-style-type: none"> Strong association, temporality, consistency (consistent findings in two independent cohorts) Experimental Plausibility | Very probable |
| Cryoglobulinemia | <ul style="list-style-type: none"> 9/10 during HEV infection Elevated anti-HEV seroprevalence rate in patients with idiopathic cryoglobulinemia Similar mechanisms described for HCV | <ul style="list-style-type: none"> Temporality Plausibility | Possible |
| Glomerulonephritis | <ul style="list-style-type: none"> 9/51 patients with renal impairment during chronic HEV infection Similar mechanisms described for HCV Evidence from various experimental data | <ul style="list-style-type: none"> Strong association, Plausibility Experimental | Very probable |
| Acute pancreatitis | <ul style="list-style-type: none"> Large number of reports from HEV-GT1 region describing AP shortly after the diagnosis of acute HEV infection Known for other viral infections, e.g., HAV/HBV/HCV-infection | <ul style="list-style-type: none"> Temporality, consistency Plausibility | Very probable |
| Hematological diseases | <ul style="list-style-type: none"> Several cases observed. High incidence of MGUS during HEV infection in a single study (However, it is possible that underlying haematological disease made patients susceptible for HEV infection) | <ul style="list-style-type: none"> Strong association | Possible |
| Meningitis | <ul style="list-style-type: none"> HEV detection in CSF HEV replication in neuronal cells proven | <ul style="list-style-type: none"> Temporality, plausibility Experimental | Possible |
| Autoimmune hepatitis | <ul style="list-style-type: none"> Elevated anti-HEV seroprevalence rate in AIH patients | | Under debate |
| Thyroiditis | <ul style="list-style-type: none"> Only single case reports | | Doubtful |
| Myocarditis | <ul style="list-style-type: none"> Single cases Only one single small study, which did not observe an association | | Doubtful |

- Atteintes neurologiques

Ces complications concerneraient 5% des patients infectés par le VHE [63], tout en sachant que le VHE est encore une infection sous diagnostiquée y compris dans ses manifestations hépatiques. L'infection par le VHE est associée aux syndromes de Guillain-Barré et de Parsonage-Turner ainsi qu'à des méningo-encéphalites [64,65]. La causalité reste à établir dans d'autres atteintes neurologiques comme les mononévrites multiples ou les myosites [64]. Les cas de syndrome de Guillain-Barré associés au VHE ont été rapportés dans des pays développés comme dans des pays en développement, laissant supposer que cette atteinte n'est pas « génotype – spécifique » [62]. L'ARN du VHE peut être retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien [62].

- Atteintes rénales

Elles ont été principalement rapportées avec le génotype 3 [62]. Des protéinuries, diminutions du débit de filtration glomérulaire ou encore syndromes néphrotiques ont été observés lors d'infections par le VHE. Des biopsies rénales réalisées lors d'épisodes d'hépatite aiguë ont montré des glomérulonéphrites membranoprolifératives, des glomérulonéphrites membranaires et des néphropathies à IgA. Des cryoglobulinémies ont également été décrites. Les anomalies rénales et la cryoglobulinémie s'améliorent voire se normalisent lors de l'éradication virale [64].

- Autres manifestations extra-hépatiques

Les manifestations neurologiques et rénales sont, à ce jour, les mieux connues et les mieux décrites. D'autres atteintes moins fréquentes sont suspectées : hématologiques (thrombopénies, gammopathies monoclonales de signification indéterminée, anémies hémolytiques), pancréatiques, thyroïdiennes ou myocardiques [62].

1.c) Cas de la femme enceinte

Contrairement aux autres virus hépatotropes ainsi qu'aux génotypes 3 et 4 du VHE, les génotypes 1 et 2 du VHE peuvent entraîner des formes graves chez la femme enceinte : la létalité est de 20-30%. Le VHE peut également entraîner des éclampsies, des hémorragies, des hépatites fulminantes chez la mère, ainsi que des avortements, morts fœtales *in utero*, prématurités et morts périnatales. Chaque année, le VHE serait responsable de 2400 à 3000 morts fœtales *in utero*, sans compter les morts fœtales liées au décès anténatal de la mère [66]. Les causes de cette sur-morbidité materno-fœtale ne sont pas encore très claires. Néanmoins, une étude récente met en lumière le fait que le VHE de génotype 1 se réplique plus fortement dans le placenta humain que le VHE de génotype 3, y induit plus de lésions tissulaires (apoptose et nécrose, notamment), modifie plus fortement le milieu cytokinique et chemokinique et diminue la production d'IFN III (physiologiquement augmentée durant les derniers mois de la grossesse), ce qui n'est pas le cas du VHE-3 [67]. Par ailleurs, il semble que les taux élevés d'œstradiol augmentent la réplication du VHE (testé sur une souche de génotype 4) [68]. La sérine-thréonine kinase cible de la rapamycine (*mechanistic target of rapamycin* (mTOR)) semble

avoir une action inhibitrice de la réplication du VHE ; cette protéine est régulée à la baisse durant la grossesse, ce qui pourrait en partie expliquer la sensibilité particulière des femmes enceintes à l'infection par le VHE [69].

1.d) Cas du sujet immunodéprimé

Des infections à VHE chroniques (persistance de l'ARN du VHE plus de 3 mois dans le sang) ont été décrites chez des patients immunodéprimés : chez des patients transplantés d'organe solide ou de cellules souches hématopoïétiques, infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou bien recevant des traitements immunosuppresseurs ou une chimiothérapie. Les infections chroniques ont été décrites très principalement avec des virus de génotype 3 (bien que de rares descriptions mentionnent les génotypes 4 et 7) [70] ; la question se pose de savoir si cela est observé parce que le génotype 3 est un plus grand pourvoyeur d'infections chroniques pour des raisons virologiques ou bien parce que la plupart des patients immunodéprimés se trouvent dans les zones géographiques où le génotype 3 est majoritaire.

2. Marqueurs biologiques – diagnostic biologique

2.a) Marqueurs non spécifiques

Une cytolyse hépatique avec augmentation des transaminases et notamment des Alanine Amino transférases (ALAT) peut être observée 3 à 6 semaines après le contage [71]. Le taux d'ALAT maximal considéré comme normal se situe vers 35-50 unités internationales (UI)/L. Lors d'une infection par le VHE, le taux d'ALAT se trouve habituellement entre 1000 et 3000 UI/L, mais l'intervalle est élevé [60]. En cas d'insuffisance hépatocellulaire, une baisse du taux de prothrombine (TP) et du facteur V est observée.

2.b) Marqueurs spécifiques indirects

Les IgM apparaissent 3 à 6 semaines après le contage et persistent plusieurs mois tandis que les IgG apparaissent peu après les IgM et persistent plusieurs années [71] (figure 8). La cinétique des anticorps peut être perturbée voire inexistante chez les patients immunodéprimés.

2.c) Marqueurs spécifiques directs

L'ARN du VHE se positive dans le sang et dans les selles environ 2 semaines après le contage. La phase virémique dure à peu près un mois tandis que l'excrétion dans les selles dure environ 6 semaines (figure 8).

2.d) Stratégie diagnostique

Selon les dernières recommandations européennes [72], le diagnostic biologique du VHE devrait être réalisé en cas de :

- Hépatite au retour d'une zone d'endémie du VHE de génotypes 1 ou 2
- Symptômes compatibles avec une hépatite aiguë
- Élévation non expliquée des transaminases chez un patient immunodéprimé
- Suspicion d'hépatite induite par un traitement
- Transaminases élevées après avoir reçu des produits sanguins.

Il est également suggéré de réaliser ce diagnostic en cas de :

- Poussée inexpliquée dans le cadre d'une hépatite chronique
- Syndrome de Parsonage-Turner, syndrome de Guillain-Barré ou encéphalite/myélite, quelles que soient les enzymes hépatiques
- Protéinurie.

Le diagnostic d'une infection par le VHE repose en première intention sur la recherche des IgM spécifiques. L'ARN du VHE peut être recherché dans le sang lors du diagnostic, notamment chez les patients immunodéprimés, et dans le sang et les selles pour le suivi (figure 9). Les IgG anti-VHE ne sont pas recommandées pour le diagnostic d'une infection en cours [71].

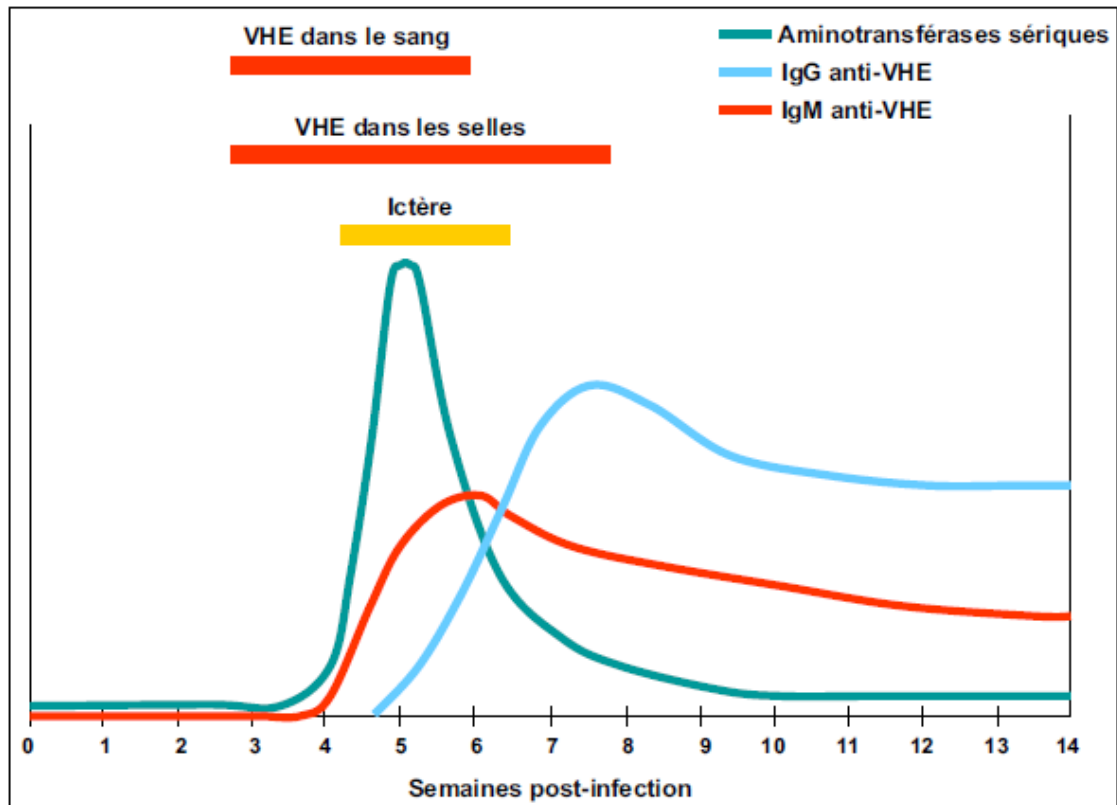


Figure 8 : Évolution des paramètres biologiques lors de l'infection par le VHE
(d'après Izopet *et al.*, 2015 [73])

G. Pathogénicité chez l'animal

L'infection par le VHE est considérée comme étant asymptomatique chez l'animal [74].

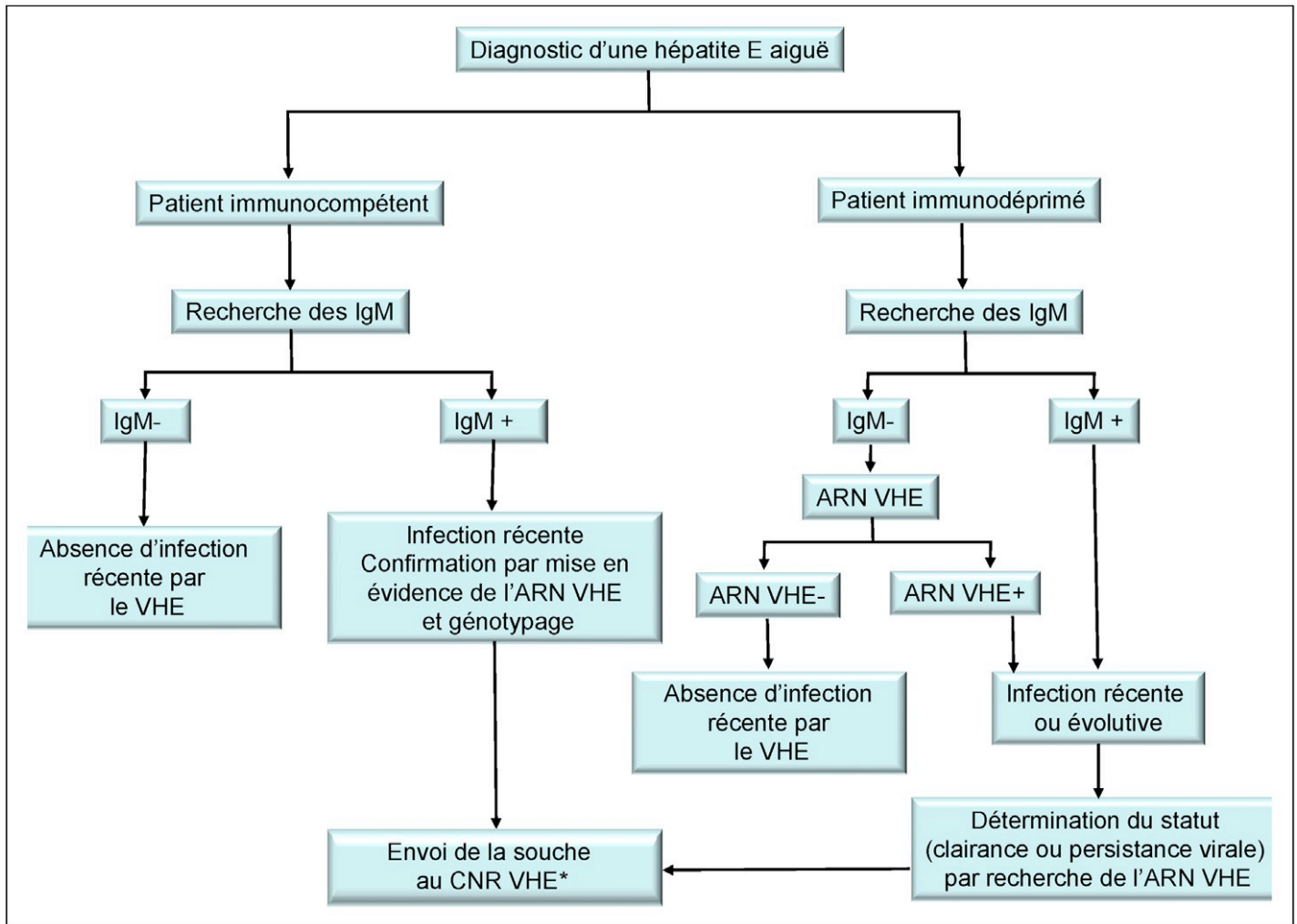


Figure 9 : Algorithme pour le diagnostic d'une infection par le VHE
(d'après Izopet et al., 2015 [73])

H. Traitement

1. Curatif

Dans les cas d'infections aiguës du sujet immunocompétent, aucun traitement n'est nécessaire. Chez les patients immunodéprimés ayant une infection chronique par le VHE, une diminution de l'immunodépression peut être tentée quand elle est possible, ce d'autant plus que certains traitements immunosuppresseurs ont une action stimulatrice de la réplication du VHE *in vitro* : ciclosporine A (par inhibition des cyclophilines A et B [75]), tacrolimus, rapamycine (également appelée sirolimus) et everolimus (par inhibition de la sérine-thréonine kinase mTOR pour ces deux derniers [69]). En cas d'impossibilité de diminution de l'immunosuppression ou d'échec de celle-ci, un traitement antiviral peut être envisagé ; la molécule utilisée préférentiellement est la ribavirine, éventuellement associée à l'interféron alpha pégylé [76]. La ribavirine est contre-indiquée chez la femme enceinte du fait de sa

tératogénicité, cependant du fait de la gravité possible de certaines infections à VHE pour la mère et le fœtus, la possibilité de donner un traitement dans ce cas doit être étudiée [76]. Le sofosbuvir a un temps été envisagé : il inhibe la réplication de l'ARN du VHE de génotype 3 *in vitro* [21], mais ne donne pas de résultats satisfaisants *in vivo*. Il est à noter qu'un immunosuppresseur, l'acide mycophénolique, a une action inhibitrice sur la réplication du VHE par déplétion du *pool* nucléotidique intracellulaire [75]. D'autres molécules sont à l'étude, telles que le zinc ou le silvestrol (dérivé de la plante *Aglaia foveolata*) et pourraient être utilisées dans le traitement du VHE chez les patients immunodéprimés, seules ou en association avec la ribavirine [77,78]. Dans tous les cas, un traitement symptomatique peut être donné : antalgiques, antispasmodiques, antiémétiques et mise au repos du patient (arrêt de travail). L'arrêt ou du moins la limitation des substances hépatotoxiques est de toute façon recommandée.

2. Préventif

La prévention repose sur le contrôle de la circulation du virus. Cela nécessite une bonne connaissance des voies de transmission. Il est possible de contrôler le réseau hydrique afin d'éviter que le VHE puisse contaminer des biens de consommation : bonne séparation des canalisations d'eaux usées et d'eau potable, entretien des canalisations, latrines, utilisation d'eau potable pour l'irrigation des cultures...

Un vaccin a été développé (HEV 239, Hecolin®) en Chine et est efficace notamment dans la prévention des infections par le VHE de génotype 4. Ce vaccin, commercialisé uniquement en Chine est recommandé pour les sujets présentant un risque élevé d'infection par le VHE ou de forme grave (éleveurs, personnes manipulant des produits alimentaires, militaires, femmes enceintes ou personnes voyageant en pays d'endémie). Il comporte un schéma d'injection en trois doses de 30 µg d'antigène purifié chacune sur six mois (M0, M1 et M6) [79]. Le vaccin comporte 239 acides aminés, il s'agit d'un peptide recombinant exprimé dans une bactérie (*Escherichia coli*), les acides aminés 368 à 606 de la protéine ORF2 d'une souche de génotype 1 [79,80].

II. Méthodes d'étude du VHE au laboratoire

Les méthodes de détection indirecte (recherche d'anticorps anti-VHE) ayant déjà été traitées (paragraphe I.F.2.b), il ne sera ici question que des méthodes de détection directe.

A. Types d'échantillons

1. *Echantillons humains/animaux*

Des échantillons peuvent être prélevés sur des humains/animaux infectés ou suspects de l'être. Des échantillons de sang et de selles peuvent être prélevés. En cas d'analyse *post mortem* des échantillons de foie et de bile peuvent également être prélevés. Chez l'Homme, dans le cadre des manifestations extra-hépatiques liées au VHE, d'autres types d'échantillons peuvent être prélevés : liquide céphalo-rachidien pour les manifestations neurologiques, urines voire ponction-biopsie rénale pour les manifestations rénales... Dans le cadre d'études sur des mollusques, l'animal entier peut-être étudié ou bien, de préférence, uniquement le tissu digestif [81] (qui donne en général de meilleurs rendements).

2. *Echantillons environnementaux*

Il s'agit notamment d'échantillons hydriques. Il peut s'agir d'eaux usées avant ou après traitement (prélevées en entrée ou sortie de station d'épuration), d'eaux de rivière, du robinet ou encore d'eaux usées d'abattoir (eau ayant servi à nettoyer les débris laissés par l'abattage des animaux)... La caractéristique de ces échantillons est que les agents pathogènes y sont dilués. Il y a donc des étapes de concentration à effectuer, pouvant varier selon l'agent pathogène à étudier. Plusieurs méthodes de concentration ont été décrites comme l'adsorption-élution sur poudre de verre, l'ultrafiltration tangentielle [82] ou la flocculation au lait écrémé [83].

B. Méthodes de biologie moléculaire

Il s'agit des techniques de PCR, ici précédées par une étape de transcription inverse (le VHE est un virus à ARN). La PCR (ou la transcription inverse) est précédée d'une étape d'extraction qui vise à lyser les protéines et purifier les acides nucléiques présents dans le prélèvement (et qui, par conséquent, inactive totalement tous les virus présents dans ce prélèvement). Les méthodes de biologie moléculaire

recherchent l'ARN du virus et sont donc utiles lors du diagnostic d'une infection, de la recherche de VHE dans un prélèvement dans le cadre d'études épidémiologiques ou portant sur la présence de VHE dans des prélèvements environnementaux. Elles ne préjugent pas de l'état d'infectiosité du virus mis en évidence.

1. *rt-qPCR en temps réel*

Il s'agit d'une technique permettant la détection et la quantification du génome viral : elle répond à la question « Y a-t-il du génome viral dans cette échantillon ? Si oui, en quelle quantité ? ». C'est une technique très utilisée en laboratoire de virologie : elle est sensible, spécifique et rapide. En général, elle utilise des amorces et sondes pouvant reconnaître une zone conservée donc elle ne permet pas de distinguer entre les différents génotypes.

2. *rt-PCR en point final*

Cette méthode consiste à faire une PCR puis à faire migrer le produit amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose (présence d'une bande à la taille attendue). Elle est utilisée pour amplifier l'ADNc avant séquençage.

3. *Méthodes de séquençage*

3.a) Séquençage direct (dit de Sanger)

Cette technique permet de séquencer le variant majoritaire présent dans le prélèvement. Cela peut permettre d'effectuer des comparaisons entre les variants majoritaires de différents prélèvements et d'établir des liens phylogénétiques, ainsi que d'identifier le génotype voire le sous-génotype [84].

3.b) Clonage – séquençage

Il s'agit d'une méthode permettant d'explorer quelques variants minoritaires en plus du variant majoritaire. C'est la méthode de référence mais elle présente certains inconvénients : elle prend du temps, est coûteuse et sa sensibilité est limitée par le nombre de clones étudiés [85]. Dans le meilleur des cas, environ 100 clones peuvent être séquencés, ce qui est partiellement représentatif d'une population de millions, voire plus, de particules virales.

3.c) Séquençage haut débit (ou *Ultra Deep Sequencing*, UDS)

Ces méthodes permettent la production de millions de séquences en une seule série et commencent à devenir moins coûteuses que les précédentes méthodes. De nombreuses techniques différentes d'UDS ont été développées, telle que les techniques Illumina (séquençage par synthèse), Ion Torrent ou le pyroséquençage. Chacune d'entre elles a ses avantages et le choix de la technique utilisée dépendra des équipements disponibles localement, de l'expérience personnelle du laboratoire et du type de micro-organisme étudié [86].

Dans toutes ces techniques, les séquences doivent ensuite être analysées avec des logiciels informatiques. Des comparaisons peuvent être effectuées entre les différentes sous-populations d'un même prélèvement. La diversité (distance génétique entre les variants de la quasi-espèce) et la complexité (taille du répertoire de variants) peuvent être calculées entre les différentes sous-populations d'un même prélèvement [87], afin d'appréhender la répartition des variants et d'avoir une idée de la pression de sélection.

C. Microscopie électronique

Le VHE a initialement été identifié entre autres à l'aide de la microscopie électronique [5] (figure 10). Cette technique, difficile à mettre en œuvre et coûteuse, n'est plus utilisée en diagnostic. Elle peut être utilisée en recherche, selon les informations recherchées, notamment lorsqu'il s'agit d'étude de la structure [17,27].

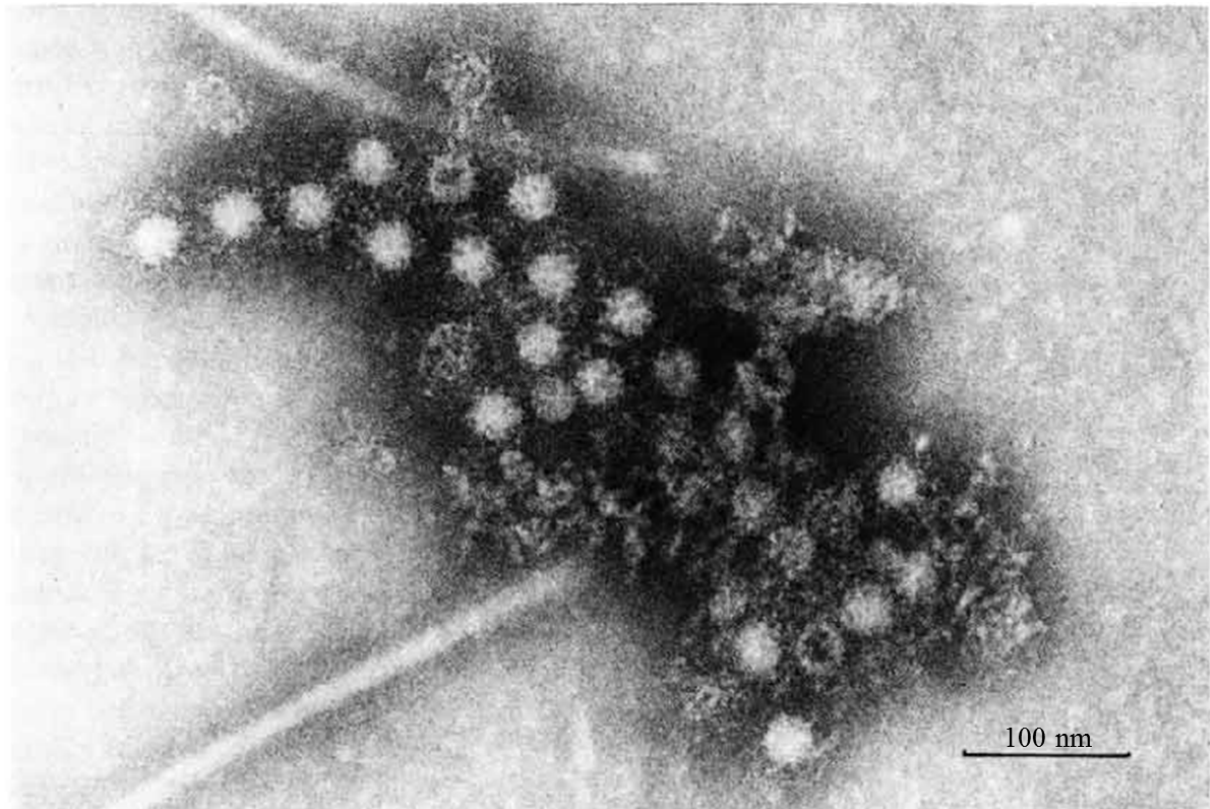


Figure 10 : Particules virales, obtenues à partir des selles d'un volontaire infecté suite à une inoculation expérimentale, et agrégées par le sérum d'un convalescent (d'après Balayan et al., 1983 [5]).

D. Culture cellulaire

Les techniques de culture cellulaire sont difficiles à mettre en œuvre, longues et peu sensibles mais présentent l'avantage de ne mettre en évidence que du virus infectieux. Cela peut être utile, par exemple, dans le cadre d'études de résistance du virus à divers traitements physiques ou chimiques.

Le VHE est un virus difficile à cultiver et, pendant longtemps, il n'y avait pas de système de culture disponible pour ce virus. Au cours des dernières années, quelques systèmes ont pu être trouvés. Deux isolats venant de selles humaines ont pu être cultivés sur des cellules PLC/PRF/5 (hépatome humain) et A549 (cancer humain du poumon). L'un de ces isolats (JE03-1760F) appartient au génotype 3 et l'autre (HEV-JF5/15F) au génotype 4 et a été isolé chez un patient présentant une hépatite fulminante. L'isolat de génotype 4 a été propagé de manière plus efficace que celui de génotype 3 [88]. Les cellules humaines HepG2 et Huh7 (carcinome hépatique) ne sont pas permissives à l'infection par les isolats JE03-1760F et HEV-JF5/15F venant de selles ; en revanche il est possible de propager ces isolats sur

ces cellules lorsqu'ils ont été adaptés à la culture cellulaire [32]. Des isolats de génotype 1, 3 et 4 provenant de prélèvements sanguins peuvent être cultivés sur des cellules PLC/PRF/5 et A549 [32]. Une souche de VHE, la souche Kernow-C1 (génotype 3), isolée d'une selle d'un patient infecté chroniquement, est capable d'infecter des lignées cellulaires humaines (les lignées de carcinome hépatique HepG2/C3A et Huh7.5, la lignée d'hépatome PLC/PRF/5, la lignée de carcinome pulmonaire A549 et la lignée d'adénocarcinome colorectal Caco-2), porcines (les lignées de cellules rénales LLC-PK1, LLC-PK1A et SK-RST) et de cerf (la lignée de cellules hépatiques OHH1.Li). Après avoir été passée 6 fois sur la lignée HepG2/C3A, la souche Kernow-C1 se multiplie plus efficacement sur ces cellules [89]. La lignée cellulaire LLC-PK1 semblait être la plus permissive à l'infection par les souches Kernow-C1 et Kernow-C1/p6 [89]. Un séquençage a montré que la souche Kernow-C1/p6 comportait une insertion de 58 acides aminés au sein de la région hypervariable d'ORF1, correspondant à de l'ARN ribosomal S17 humain ; il s'avère que cette insertion était présente, mais de façon très rare, sur l'isolat (issu d'une selle d'un patient) avant culture [89]. Les virus comportant cette insertion sont sélectionnés au fur et à mesure des passages et des études plus poussées ont montré que la taille de l'insert ainsi que sa séquence en acides aminés étaient importantes pour la capacité du virus à se multiplier en culture cellulaire [39]. Un isolat d'un patient infecté chroniquement, LBPR-0379 (génotype 3), présente un avantage de croissance sur les cellules HepG2/C3A [90]. Une souche isolée d'un plasma humain, JRC-HE3 (génotype 3) a été capable de se multiplier en culture sur des cellules A549 et plus efficacement sur des cellules PLC/PRF/5 [91]. Une souche issue d'un sérum humain, UA1 (génotype 4), a été capable de se multiplier en culture sur des cellules A549 [91].

Afin d'être plus sensible, une technique dérivée a vu le jour, l'*Integrated cell culture/polymerase chain reaction* (ICC/PCR). Une culture est effectuée pendant quelques heures à quelques jours, selon le virus et sa quantité, puis une PCR est effectuée sur le fruit de la récolte. C'est une méthode plus rapide que la culture conventionnelle, elle permet la mise en évidence de virus ne produisant pas d'effet cytopathique, ne met en évidence que les virus infectieux et permet de surmonter le problème des inhibiteurs de PCR [92].

E. Méthodes d'étude de l'infectiosité, dérivées de la biologie moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire étant plus simples à utiliser que les méthodes de culture cellulaire, certaines techniques ont été proposées afin de pouvoir n'amplifier que des virus infectieux en biologie moléculaire.

Une méthode par traitement à la RNase a été développée : l'échantillon est traité par RNase avant l'extraction. De cette façon les ARN libres (correspondant à des virus dégradés) sont détruits et seul l'ARN des virus initialement physiquement intègres est retrouvé après extraction. Cette méthode a été utilisée pour étudier la résistance du VHE à la température [93].

D'autres approches ont été proposées récemment afin d'apprécier l'intégrité de la capsid : l'utilisation d'agents intercalants tels que le monoazide de propidium (PMA) et le monoazide d'éthidium (EMA). Le principe est que ces molécules entrent dans les cellules en cas de rupture d'intégrité de la membrane, se lient de manière covalente à l'ADN et inhibent la PCR [94]. Cette approche a été testée sur des bactéries et, plus récemment, des tentatives ont été faites sur des virus à ARN [95,96] avec différents résultats. Cette méthode peut être prise en défaut si le virus est non infectieux tout en gardant une capsid intacte ; d'autre part, la structure secondaire de l'ARN semble interférer avec la fixation de ces agents intercalants [96]. Les résultats obtenus par cette méthode peuvent également varier en fonction du virus étudié et de la zone de son génome étudiée en PCR [95].

III. Variabilité du VHE et ses conséquences

A. Mécanismes généraux de variabilité virale

1. Modifications génétiques

Les virus possèdent une variabilité génétique supérieure à celle des autres êtres vivants, particulièrement les virus à ARN. Les virus à ADN possèdent le plus souvent un ADN double brin, ce qui entraîne une contrainte de stabilité. La polymérase des virus à ARN est dépourvue d'activité de correction 3'-5' exonucléase et de nombreuses erreurs de réplication par incorporation d'un mauvais nucléotide (mutations ponctuelles) se produisent. Par exemple, pour le VIH (ARN simple brin), le taux de mutations est de 10^{-4} /site/réplication ; pour les virus de la famille des *Herpesviridae* (ADN double brin), le taux de mutations est de 10^{-5} - 10^{-7} /site/réplication ; en comparaison, le taux de mutations dans une cellule eucaryote est de 10^{-8} - 10^{-11} /site/réplication [97]. En ce qui concerne le VHE, le taux d'erreur serait de $1,40-1,72 \times 10^{-3}$ /site/an [35].

Les modifications peuvent aussi être dues à des phénomènes d'insertion ou de délétion de nucléotides.

Des échanges de matériel génétique peuvent également se produire. La recombinaison entre virus infectant la même cellule existe, surtout pour les virus à ADN et les rétrovirus (possibilité d'utiliser des enzymes dans la cellule hôte pour effectuer la recombinaison sur de l'ADN) mais est plus rare chez les virus à ARN sans stade d'ADN dans le cycle répliatif [98]. Des échanges de matériel génétique peuvent également se produire entre cellule eucaryote et virus [99-101].

2. Types de virions produits

Ces modifications génétiques peuvent avoir diverses conséquences sur le nouveau virion. Celui-ci peut ne pas pouvoir se répliquer, ce qui entraîne une « suppression » de la modification génétique. Il peut également avoir une réplication diminuée et/ou une virulence diminuée, ce qui entraîne un désavantage par rapport au virus de phénotype sauvage. Les modifications génétiques peuvent entraîner la production de virions ayant un avantage de réplication et/ou une virulence augmentée. Si le nouveau virion possède un avantage répliatif sur le virus sauvage, la modification génétique aura tendance à voir sa fréquence augmenter. Enfin, le nouveau virion peut être résistant à une ou plusieurs molécules antivirales.

3. Production importante de particules virales

Lors d'une infection, de nombreuses particules virales sont produites par jour. Par exemple, une cellule infectée produit de l'ordre de 100 à 1000 virions [102]. Chez un sujet infecté par le VIH, de l'ordre de 10^{10} virions seraient libérés chaque jour [103] et chez un sujet infecté par le VHC, 10^{12} particules virales sont libérées par 24h [104]. La conséquence est que des virions mutants sont produits chaque jour.

4. Conséquences en termes de diversité

Ceci entraîne l'émergence de variations au sein d'une espèce : présence de différents génotypes et sous-types.

5. Notion de quasi-espèce

La présence de cette variabilité au sein d'un hôte entraîne une distribution en quasi-espèce : il s'agit d'un mélange de populations virales génétiquement distinctes mais apparentées (figure 11). Une quasi-espèce est une population de virions de même espèce, mais hétérogène, au sein d'un organisme hôte [105]. Cela est lié au taux de mutation important et à la production élevée de nouveaux virions. De nombreuses mutations sont produites, pouvant avoir un impact sur le « *fitness* » viral. Des pressions de sélection provenant du système immunitaire, de l'hôte ou du milieu extérieur peuvent avoir un impact sur la variabilité virale. La fréquence d'un variant est associée à ses capacités répliquatives mais aussi à sa probabilité d'être généré *de novo* par mutation de ses « voisins » [106]. Un variant avec un *fitness* bas peut être maintenu à une fréquence élevée s'il est couplé (génétiquement proche) à un variant bien représenté et ayant un *fitness* élevé [106]. Ce n'est pas forcément le variant ayant les capacités répliquatives les plus élevées qui sera majoritaire, cela dépend aussi, entre autres, des « voisins » et du taux de mutation : la théorie de la « survie du plus plat » a été décrite (figure 12).

Cette répartition en quasi-espèce peut avoir des conséquences : par exemple la virulence du poliovirus est déterminée par la diversité des quasi-espèces [107]. Il peut y avoir une coopération entre les populations virales : certains variants peuvent faciliter la colonisation des tissus, d'autres peuvent échapper à l'immunité et d'autres encore être plus résistants dans l'environnement [108]. L'étude d'une quasi-espèce virale repose sur deux paramètres : la complexité et la diversité. La complexité est la taille du répertoire de variants ; elle peut être appréhendée par l'entropie

nucléotidique et calculée par l'entropie de Shannon. La diversité génétique correspond à la distance génétique entre les variants de la quasi-espèce.

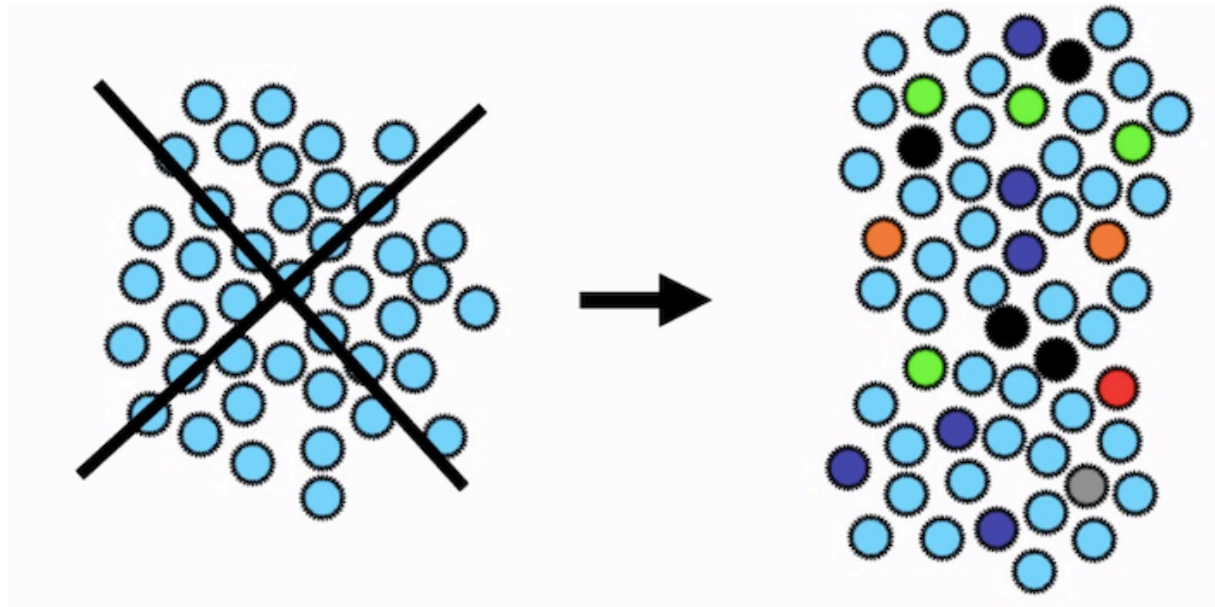


Figure 11 : Représentation de la répartition de la population virale en quasi-espèce au sein d'un hôte [109]

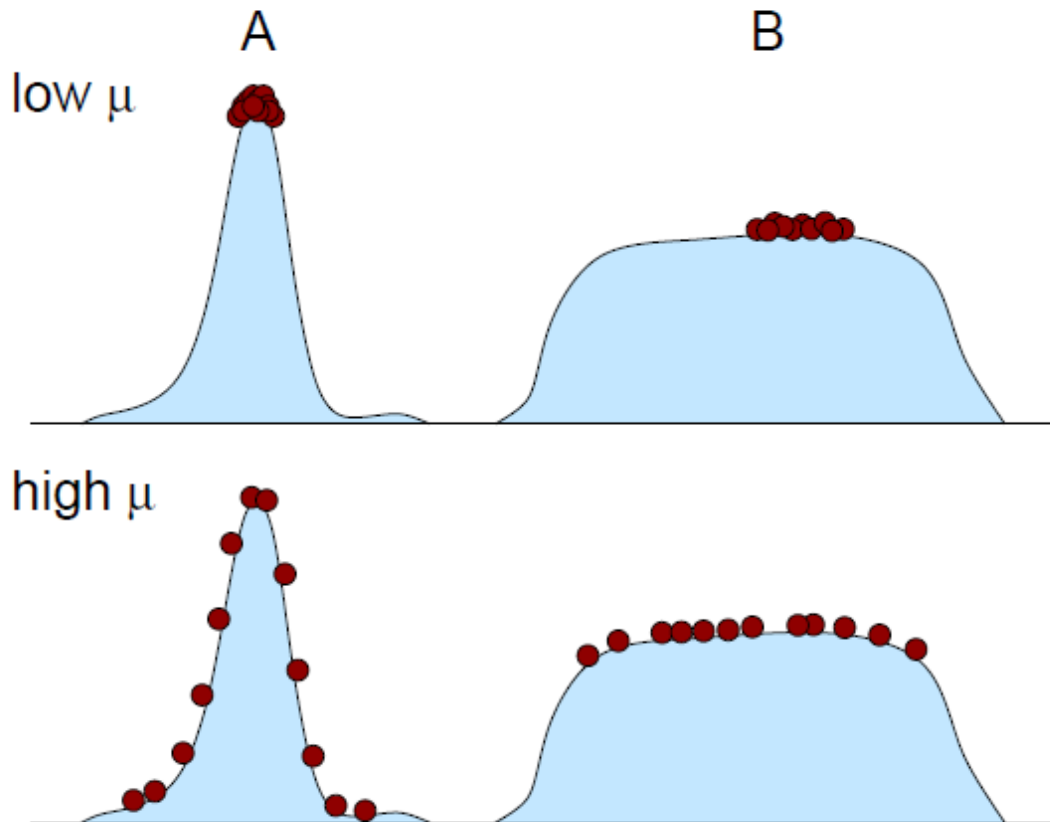


Figure 12 : L'effet de « survie du plus plat »

(d'après Wilke [110]). Avec un taux de mutation (μ) faible (image du haut), les variants s'accumulent près du haut du pic de *fitness* et, ainsi, les variants du pic A surpassent ceux du pic B. Avec un taux de mutation élevé (image du bas), la plupart des variants du pic A sont localisés à de faibles *fitness* tandis que les variants du pic B restent proches du *fitness* optimal ; ainsi le *fitness* moyen des variants du pic B est plus élevé que le *fitness* moyen des variants du pic A et les variants du pic B surpassent ceux du pic A.

B. Variabilité du VHE

Le VHE étant un virus à ARN, il possède une variabilité importante. Il a, par exemple, été noté une variabilité génétique entre les isolats responsables d'épidémies distinctes [111].

1. Différences entre génotypes et entre sous-génotypes

1.a) Description

L'homologie nucléotidique entre VHE de génotypes différents a été mesurée à 75% tandis que celle au sein d'un génotype donné est supérieure à 81% [112].

Il a été montré que l'ancêtre commun des VHE de mammifère est entre le VHE-1/2 et le VHE-3/4 : il a été estimé qu'une souche ancestrale a évolué vers le VHE humain d'une part et le VHE zoonotique d'autre part il y a plus de 500 ans. Ensuite les deux génotypes se sont séparés [113].

Des travaux ont été menés sur le taux de sélections positive et négative sur le génome du VHE. La sélection est dite positive quand les mutations non silencieuses sont plus fréquentes que les mutations silencieuses ; elle est dite négative quand les mutations silencieuses sont les plus fréquentes : la sélection est en faveur de la conservation de l'acide aminé. La plupart des sites de sélection positive ont été localisés dans la région de chevauchement ORF2/ORF3 [114]. Les zones fonctionnelles d'ORF1 et ORF2 sont beaucoup plus sous pression de sélection négative que la région ORF3. Les codons sous pression de sélection positive sont principalement localisés dans les régions N-terminale d'ORF2 (les 111 premiers acides aminés) et C-terminale d'ORF3 (zone interagissant avec des protéines de l'hôte, les substitutions pourraient être impliquées dans le spectre d'hôte). Au sein d'ORF1, les codons sous pression de sélection positive sont uniquement situés dans la zone de la polymérase. Les codons sous pression de sélection positive ne sont pas les mêmes suivant le génotype, notamment en ce qui concerne le génotype 1 [115]. Les régions ORF1 et ORF2 – portion non chevauchante – présentent de nombreux sites de sélection négative qui sont, proportionnellement, en plus grand nombre dans le génotype 1 que dans les génotypes 3 et 4 [114].

Les génotypes 3 et 4 comporteraient plus de positions polymorphiques que les génotypes 1 et 2. La grande diversité génétique observée dans les virus de génotypes 3 et 4 pourrait refléter l'adaptation de ces génotypes à plusieurs espèces d'hôtes [114]. Si l'on prend différentes séquences de référence appartenant aux génotypes 1 et 3 et que l'on calcule, sur les acides aminés des domaines M et P d'ORF2, les distances entre différentes séquences appartenant un même génotype, on peut retrouver des distances plus grandes au sein du génotype 3 qu'au sein du

génotype 1 : dans le domaine M, les distances moyennes entre séquences sont de 0,004 pour le génotype 1 et 0,015 pour le génotype 3, tandis que dans le domaine P, elles sont de 0,010 pour le génotype 1 et 0,026 pour le génotype 3 [108].

1.b) Conséquences

Les différences entre génotypes peuvent impacter l'antigénicité du VHE et son interaction avec le système immunitaire de l'hôte. Des travaux ont montré que des IgG ou IgM issues de séra humains ayant été en contact avec un VHE de génotype 3 ou 4 ont tendance à réagir avec une plus grande affinité avec un VHE de génotype 3 ou 4 qu'avec un VHE de génotype 1 ou 2. Des IgM issues de séra humains ayant été en contact avec un VHE de génotype 1 réagissaient avec plus d'affinité avec un VHE de génotype 3 ou 4 qu'avec un VHE de génotype 1 ou 2, tandis que les IgG réagissaient avec plus d'affinité avec un VHE de génotype 3, suivi des VHE de génotypes 1 et 2 et, en dernier, un VHE de génotype 4 [19]. Il est intéressant de noter que la protéine de capsid de la souche VHE de génotype 3 utilisée pour cette étude présente la plus grande région exposée, ce qui pourrait expliquer la forte immunoréactivité avec les différents séra. La surface de la protéine de capsid de la souche de génotype 2 semble également avoir une forte antigénicité. Par ailleurs, des VHE de différents génotypes ne présentent pas le même profil antigénique au niveau de la capsid bien qu'on observe une plus grande similarité entre génotypes 1 et 2 et entre génotypes 3 et 4 qu'entre génotypes 1 et 2 d'une part et génotypes 3 et 4 d'autre part. Le degré d'exposition des résidus antigéniques peut varier d'un génotype à l'autre. Le résidu arginine 512, bien qu'indispensable pour la neutralisation du VHE de génotype 1 par des anticorps, n'est pas indispensable pour la neutralisation des VHE d'autres génotypes [19]. Ceci pourrait avoir un impact en termes d'immunisation de l'hôte contre le virus mais également en termes de sensibilité des tests de détection des anticorps ou antigènes, en diagnostic biologique.

Tous les génotypes existant et ayant été décrits à ce jour n'infectent pas l'Homme de la même façon : les génotypes 1 à 4 sont les principaux génotypes infectant l'Homme tandis que, pour les génotypes 5, 6 et 8, aucune infection humaine n'a été décrite à ce jour. De plus, tous les génotypes ne donnent pas les mêmes

formes cliniques ni la même gravité. Par exemple l'infection d'une femme enceinte par le VHE de génotype 1 entraîne une morbidité et une létalité plus importantes qu'une infection par le VHE de génotype 3. L'infection par le VHE de génotype 4 est associée à un niveau plus élevé d'ALAT et à un taux de prothrombine plus bas que l'infection par le VHE de génotype 3 [116]. Au sein du génotype 3, une étude réalisée en Europe montre que la distribution des clades n'était pas différente entre les virus isolés chez des patients asymptomatiques (donneurs de sang) et chez des patients ayant une hépatite symptomatique [48]. Les causes de ces différents pouvoirs pathogènes selon le génotype ne sont pas claires. Il peut être noté que le VHE de génotype 4 possède un mécanisme différent de traduction d'ORF3, ce qui peut entraîner des différences. Les différents génotypes n'évoluent pas au contact des mêmes populations et il existe des différences immunitaires entre les groupes humains (par exemple au niveau des allèles d'antigènes leucocytaires, HLA) pouvant entraîner des pressions de sélection différentes sur les virus [117]. Des différences dans les protéines et donc des différences répliquatives ainsi que dans les interactions avec le système immunitaire de l'hôte ou l'environnement pourraient également expliquer ces différences entre génotypes.

2. Substitutions d'acides aminés connues ayant un impact sur le virus

2.a) ORF1

Au sein de la cystéine protéase « papaïne-like », des modifications des acides aminés H443L, C457A, C459A, C471A, C472A, C481A, C483A, H497L ou H590L entraînent un arrêt complet de la réplication de l'ARN viral *in vitro* [118]. Ceci montre l'importance des résidus cystéine et histidine pour l'activité de cette enzyme, d'autant plus que des mutations silencieuses n'entraînent pas d'impact. Il s'avère que la dyade catalytique constituée par les acides aminés C434 et H443 et les motifs bivalents de liaison aux métaux (C457–H458–C459 et C481–C483) sont essentiels pour l'intégrité structurelle de cette protéase [119]. L'activité de cette enzyme semble donc importante pour la réplication du virus et des mutations entraînant une modification de structure peuvent en entraver l'activité [119].

La région dite « hypervariable » située au sein d'ORF1 comporte une portion N-terminale de 35 acides aminés non hypervariable. La zone hypervariable a une longueur différente suivant la souche et le génotype ; elle comporte 70 à 72 acides

aminés dans le génotype 1, 68 dans le génotype 2, 80 à 86 dans le génotype 3 et 84 dans le génotype 4 [120]. Les délétions de grande taille dans cette région ont un impact en termes de répllication et de virulence virales [120]. Il semble que cette région soit importante pour l'infectiosité mais pas pour la répllication virale *in vivo* [119]. Une insertion d'un fragment de polymérase dans la région hypervariable trouvée chez un patient entraîne, avec une insertion d'un autre fragment de la région hypervariable et une mutation ponctuelle A723V, une répllication augmentée du virus *in vitro* ; néanmoins, l'étude montre qu'une insertion dans cette région n'a pas forcément un effet amplificateur de la répllication selon le contexte (autres modifications génétiques non encore identifiées), la séquence et la longueur de l'insertion : d'autres insertion d'un fragment codant la polymérase dans la région hypervariable entraînent une suppression de la répllication virale [121].

Des substitutions ont été décrites au sein de l'ARN polymérase virale. Les substitutions Y1320H and G1634R entraînent *in vitro* une augmentation de l'activité répllicative, tandis que la substitution K1383N réduit la répllication et induit une sensibilité à la ribavirine *in vitro*, bien qu'elle semble augmenter la résistance à cette molécule *in vivo* chez un patient, ce qui expliquerait que cette substitution, bien que défavorable pour le *fitness* viral, ait été sélectionnée chez ce patient traité par ribavirine. La substitution K1383N pourrait avoir un impact sur la fidélité de la polymérase [121]. La substitution V1213A diminue la répllication du VHE de génotype 3, notamment lorsqu'elle est associée aux substitutions S605P et I978V. La présence d'une valine en position 1213 a un effet positif sur la répllication des VHE de génotypes 3 et 4 tandis que, pour le génotype 1, c'est la présence d'une alanine plutôt que d'une valine qui a un effet positif [122].

2.b) Zone de jonction

La zone de jonction entre ORF1 et ORF2/ORF3 est une zone très conservée. Il y a un élément cis-réactif et une structure tige-boucle. Une structure tige-boucle (également appelée structure en épingle à cheveux) est formée par de l'ARN monocaténaire, grâce à des complémentarités de bases. Lorsque deux régions contiennent des séquences complémentaires, elles peuvent s'apparier et former localement une zone en double brin ; la région située entre les séquences complémentaires formera alors la boucle (figure 13). Ce type de structure est

retrouvé dans les ARN de transfert, dans les ribozymes (molécules d'ARN ayant une fonction enzymatique) ou dans des ARN codants, où elle joue un rôle dans la régulation de la traduction. En ce qui concerne le VHE, la portion de la zone de jonction constituée en tige-boucle est importante pour la réplication virale, tant par la séquence (motif AGA, notamment) que par la structure [123]. Plusieurs codons initiateurs AUG possibles existent pour ORF3 et celui marquant le début de la protéine n'est pas encore clair, d'autant plus que plusieurs pourraient être utilisés en alternance et qu'il existe une variation selon le génotype. Dans le génotype 3, lorsque le 3^{ème} codon AUG initiateur d'ORF3 est muté – premier codon initiateur pour certains isolats – il y a une abolition totale de l'infectiosité *in vivo* [124].

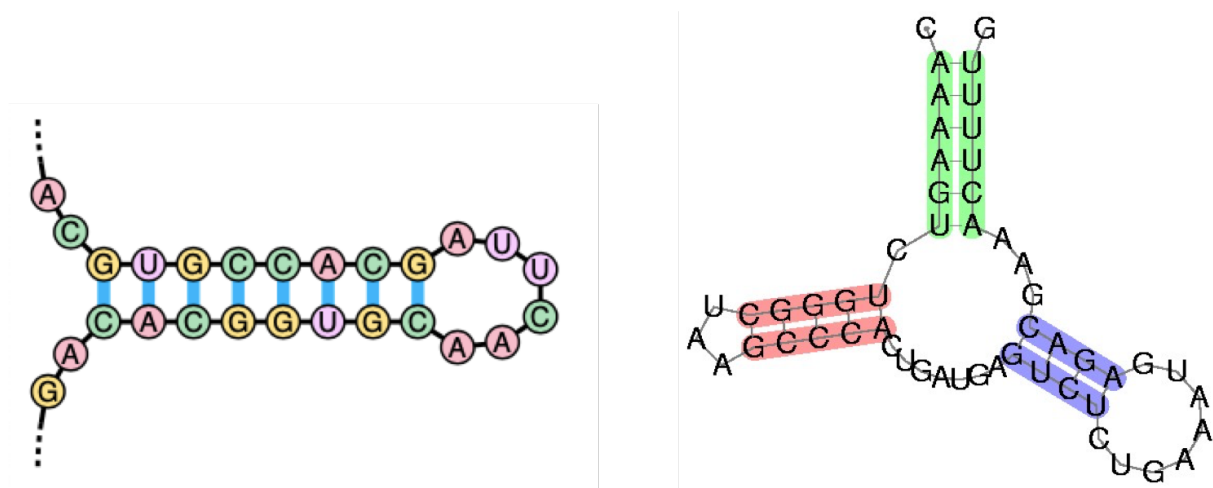


Figure 13 : Structure de l'ARN monocaténaire en tige-boucle [125]

2.c) ORF2

Sur ORF2, les mutations T5338C, A5362G et C6356T, responsables des modifications F51L, T59A et S390L entraînent un virus atténué chez le porc. Ces mutations semblent apparaître naturellement [126]. Une étude plus poussée de la part des auteurs montre que la substitution F51L contribue partiellement à l'atténuation virale et que les substitutions T59A et S390L entraînent chacune une atténuation plus forte chez le cochon (incidence plus faible de la virémie, excrétion virale fécale d'apparition retardée et de durée plus faible, virémie d'apparition retardée et de durée plus faible et charges virales plus basses dans le sang et la bile) [127]. Des substitutions sur les positions 137, 310 et 311 (particulièrement

asparagine devenant glutamine), empêchent la glycosylation des acides aminés 132 et 310. Ces modifications ne touchent pas la réplication virale ni la synthèse de la protéine de capsid ; néanmoins elles empêchent la formation de la particule virale, ce qui provoque une inhibition de l'infectiosité [119]. Une substitution au niveau de l'acide aminé 562 (3^e site de glycosylation de la protéine) ne gêne pas l'assemblage de la particule virale, mais cette particule n'est pas infectieuse [128]. La substitution N562Q toucherait la dimérisation de la protéine ORF2 [128]. Néanmoins ce dernier résultat est contesté : selon une autre étude, les substitutions N562D et N562Q ne bloqueraient pas la dimérisation (selon les auteurs, cette différence de résultats pourrait résulter de l'utilisation de différents systèmes d'expression de la protéine) [129]. Les substitutions N562Q/D/P/Y empêchent ou réduisent très fortement la glycosylation mais cela ne modifie pas l'apparition des anticorps chez l'animal. La glycosylation pourrait jouer un rôle de diminution de liaison des anticorps. L'absence de dimérisation ou de glycosylation ne semblant pas avoir un impact très important sur l'immunogénicité et la neutralisation, il ressort que la présence de substitutions spécifiques semble avoir un plus grand impact sur l'activité des épitopes neutralisants que la glycosylation ou la dimérisation [129]. La forme non glycosylée de la protéine ORF2 est beaucoup moins stable que la forme glycosylée et il s'avère que la protéine ORF3 interagit plus facilement avec la forme non glycosylée [130]. En fait, il est probable que la protéine ORF3 interagisse avec la protéine ORF2 avant ses modifications post-traductionnelles : la séquence N-terminale d'ORF2 est protéolysée mais la protéine ORF3 ne peut pas interagir avec une protéine ORF2 qui n'est pas de longueur totale [130]. Les principales substitutions sus citées sont représentées sur la [figure 14](#).

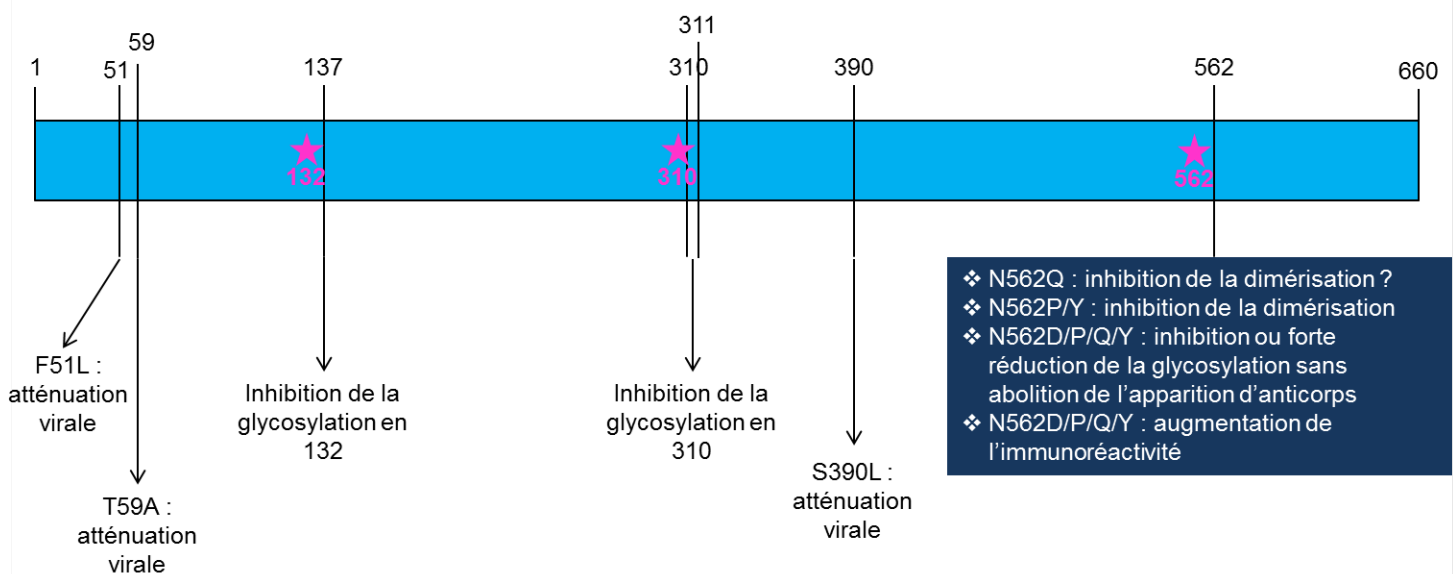


Figure 14 : Principales substitutions au sein d'ORF2

Les chiffres indiquent les positions en acides aminés. Les sites de glycosylation sont indiqués par une étoile rose.

2.d) ORF3

La protéine ORF3 interagit avec la protéine ORF2. Une région de 25 acides aminés d'ORF3 (acides aminés 57 à 81) est nécessaire pour cette interaction [130]. Une sérine phosphorylée en position 79 d'ORF3 est essentielle pour l'interaction entre ORF2 et ORF3. La substitution S79A (qui entraîne la substitution V66G sur le cadre ORF2) diminue très fortement le pouvoir pathogène du VHE. En revanche la substitution S79L (mutation silencieuse sur le cadre ORF2) n'entraîne pas, ou très peu, de baisse d'infectiosité. La phosphorylation de la sérine 79 n'est donc pas nécessaire pour l'infection *in vivo*, néanmoins un rôle de cette phosphorylation dans la diffusion du virus dans l'organisme et notamment à des sites extra-hépatiques ne peut pas être éliminé [34]. Deux motifs PSAP, au niveau des positions 86-89 et 95-98 (le premier n'existant que dans certains isolats de génotype 3) sont importants pour la sortie du virion et l'acquisition de sa quasi-enveloppe [131]. Une mutation dans ces motifs est associée à une répllication virale diminuée [119].

3. Substitutions d'acides aminés connues ayant des conséquences cliniques

Il est tout d'abord important de noter que des variations chez l'hôte, qu'elles soient liées à une grossesse, à l'âge ou bien à des polymorphismes touchant le système immunitaire, le foie ou d'autres organes peuvent rendre compte de variations dans la présentation clinique de l'infection ; la variabilité virale n'est pas le seul facteur en cause.

3.a) ORF1

Les substitutions L1110F et V1120I au sein de l'hélicase sont souvent retrouvées dans des hépatites fulminantes liées au génotype 1. Ces substitutions, seules ou associées ne semblent pas avoir d'impact sur l'activité « déroulement » de la protéine, mais ont un impact négatif léger sur la réplication *in vitro* [132]. Devhare et son équipe, ayant travaillé sur ce sujet, émettent l'hypothèse que l'augmentation de la gravité de l'hépatite et de la charge virale observée en présence des substitutions L1110F et V1120I pourrait être liée à des anomalies d'interaction entre l'hélicase et des protéines de l'hôte et/ou des protéines virales [132]. Au sein d'isolats de génotype 3, la substitution V1213A (V239A du domaine de l'hélicase) pourrait être associée à une virulence accrue [133] ; cependant cette substitution semble diminuer la réplication du VHE de génotype 3 *in vitro* [122]. Une étude portant sur des isolats de génotype 1 retrouve six substitutions d'acides aminés au sein d'ORF1, qui sont significativement associés à une hépatite fulminante : F179S (méthyl transférase), A317T (domaine Y), T735I (région hypervariable), L1110F (hélicase), V1120I (hélicase) et F1439Y (polymérase) [134]. Au sein d'une autre étude indienne, les substitutions C1483W et N1530T (situées dans la polymérase virale) ont été identifiées comme étant significativement associées à une hépatite fulminante, des charges virales plus élevées, un TP plus bas et une mortalité plus élevée chez les patients [135].

3.b) ORF2

La substitution L278F dans ORF2 semble être associée à une hépatite asymptomatique [48]. De même, la substitution P259S dans la capside est significativement associée à une hépatite fulminante [136]. Une étude japonaise montre qu'une mutation nucléotidique silencieuse mettant un uracile en position 3148 (zone de l'hélicase) est significativement associée à une hépatite fulminante et à un

TP plus bas [137]. La même équipe a également mis en évidence la présence d'une cytosine en position 5907 (gène de la capsid) comme étant associée, avec l'uracile en position 3148, à une hépatite fulminante chez les patients infectés par le VHE de génotype 3 ou 4, ainsi qu'à un TP plus bas. La cytosine en position 5907 semble également être associée à des charges virales plus élevées ($\geq 10^5$ copies/ml) à la phase initiale [138]. Ces deux mutations sont silencieuses donc le mécanisme par lequel elles pourraient modifier l'issue de la maladie n'est pas clair ; en ce qui concerne la position 5907, les auteurs suggèrent que la mutation pourrait modifier la structure secondaire de l'ARN, ce qui pourrait modifier la traduction du gène de capsid. Les deux sites 3148 et 5907 étant distants l'un de l'autre et pas sur le même cadre de lecture ouverte, les deux mutations agissent probablement de manière indépendante l'une de l'autre [138].

3.c) ORF3

En Inde, une délétion de 246 nucléotides au sein d'ORF3 a été identifiée sur des isolats cliniques (nucléotides 5187 à 5433), sans que l'on n'ait plus d'informations sur les conséquences cliniques [119,139].

3.d) Résistances au traitement

Au sein de la polymérase virale, la substitution G1634R semble associée à un échec de traitement par la ribavirine. En réalité, cette substitution n'entraîne pas de résistance à la ribavirine mais augmente la réplication virale (ce résultat a été retrouvé chez les génotypes 1 et 3) [140]. Dans une étude française, la charge virale des patients dont le VHE est porteur de la substitution G1634R est plus élevée que celle des patients dont le virus n'est pas porteur [141]. La substitution G1634R ne compromet pas la réponse à un retraitement par la ribavirine [141]. La ribavirine entraîne des mutations chez les virus à ARN et la substitution G1634R/K peut apparaître sous traitement [119]. En effet, chez des patients atteints d'hépatite E chronique et traités par ribavirine, la variabilité augmente dans les trois ORF (les mutations nucléotidiques consistent plus en des transitions qu'en des transversions) et diminue après l'arrêt du traitement (si le traitement échoue à éradiquer le VHE) [142]. Une étude, réalisée chez un patient ayant présenté un échec de traitement par la ribavirine, montre les substitutions G1634R, Y1320H et K1383N, toutes trois localisées dans la polymérase virale, ainsi qu'une insertion dans la région

hypervariable. *In vitro*, la substitution K1383N diminue la réplication virale et augmente la sensibilité à la ribavirine. Les deux autres substitutions augmentent la réplication et pourraient donc compenser la perte de *fitness* liée à K1383N. Cette dernière pourrait avoir un impact sur la fidélité de la polymérase, qui serait bénéfique pour le virus lors d'un traitement par ribavirine. L'insertion d'un fragment de polymérase dans la région hypervariable augmente la réplication, mais si cette insertion se produit d'une manière différente, on observe une diminution importante de la réplication [121].

Selon certains auteurs, cette acquisition de mutations sous ribavirine pourrait entraîner l'émergence de variants donnant une évolution clinique plus compliquée, des manifestations extra-hépatiques ou une transmission différente [119]. En effet, de nouveaux variants pourraient émerger, avec un pouvoir pathogène différent et des mutations au sein d'ORF2 ou ORF3, ce qui pourrait entraîner des modes de transmission différents par rapport à avant le traitement.

4. *Recombinaisons*

Certaines équipes ont pu mettre en évidence des événements de recombinaison entre différents sous-types de VHE. Il s'agit majoritairement de recombinaisons intra-génotype [143] bien qu'un recombinant génotype 3-4 ait été identifié en Chine. Les recombinaisons semblent avoir lieu majoritairement au Japon, et les zones du génome viral les plus impliquées sont le domaine X, l'hélicase et la polymérase [115]. Le génotype 2 (séquence mexicaine) pourrait être un recombinant entre deux génotypes différents, ce qui expliquerait sa « rareté ». Les événements de recombinaison chez le VHE ne semblent pas fréquents et l'évolution du VHE serait surtout liée à des mutations ponctuelles [144]. L'événement de recombinaison nécessite la co-infection d'une même cellule par deux virus différents. Ceci, bien que peu probable peut se produire comme cela a été le cas chez un patient japonais infecté en même temps par une souche de VHE de génotype 3 et une de génotype 4 [145].

Un isolat intéressant a été étudié : il aurait trois souches parentales. Les deux premières appartiennent au génotype 4, l'une a été isolée chez un cochon en Chine et l'autre chez un patient japonais ayant voyagé récemment en Chine. La troisième souche appartient au génotype 3 et a été isolée chez un patient japonais. Il y aurait

donc eu recombinaison intra- et inter-génotype. Il est à noter que la recombinaison inter-génotype a eu lieu au sein du gène de la capsid. Ceci pourrait produire une protéine ayant une meilleure capacité à échapper à la réponse immunitaire [146].

5. *Quasi-espèce chez le VHE*

Le phénomène de quasi-espèce a été décrit pour le VHE [147].

Une compartimentation des quasi-espèces du VHE a été décrite chez un patient en France : les variants retrouvés dans le LCR n'étaient pas les mêmes que dans le sérum. Les auteurs suggèrent que cela pourrait être en faveur de l'émergence de variants neurotropes (ou bien qu'il s'agisse d'une petite quantité de virus passée dans le compartiment méningé et ayant évolué pour son propre compte) [148].

Une étude a été réalisée chez des patients transplantés d'organe solide et atteints par le VHE. L'objectif était d'évaluer la corrélation entre la variabilité génétique virale et le passage à la chronicité voire le développement d'une cirrhose. La pression de sélection sur le VHE a également été étudiée. Il s'avère que plus les domaines P et M d'ORF2 ont une variabilité élevée et plus la probabilité de développer une infection chronique est élevée. De manière similaire, plus le domaine M a un coefficient K_a (mutations non silencieuses par site non synonyme)/ K_s (mutations silencieuses par site synonyme) bas et plus la quasi-espèce est sélectionnée avec l'émergence de variants stables et avantageés [87]. Le macrodomaine (ou domaine X) et la région riche en proline d'ORF1 présentent également une hétérogénéité plus importante chez les patients évoluant vers la chronicité que chez les patients éradiquant le virus [149]. L'impact de la répartition en quasi-espèce est important chez les patients transplantés d'organe solide. De plus, l'infection chronique entraîne une excrétion fécale prolongée de virus infectieux.

IV. Circulation du VHE dans l'environnement – circulation chez l'animal

Les génotypes 3 et 4 du VHE sont principalement transmis par voie zoonotique : ingestion de viande d'un animal contaminé. En effet, de nombreuses études vont dans ce sens à travers le monde.

A. Infection du porc par le VHE

Plusieurs études réalisées dans le monde animal ont étudié l'infection du cochon d'élevage par le VHE.

1. Prévalence

L'infection par le VHE est très fréquente chez les cochons d'élevage. A l'échelle mondiale, selon les études, 30 à 100% des fermes porcines présentent au moins un cochon séropositif et 10 à 100% des fermes étudiées présentent au moins un cochon positif pour l'ARN du VHE [150]. La séroprévalence des cochons étudiés varie de 8 à 93% [150] ; en France, par exemple, une étude de 2011 retrouve une séroprévalence de 31% chez les cochons en âge d'être abattus [151]. La prévalence de l'ARN de VHE se situe entre 1 et 89% selon les études à travers le monde ; dans un pays donné les prévalences ne semblent pas varier en fonction du temps [150]. Une étude réalisée en Ecosse a montré, chez des cochons en âge d'être abattus, une prévalence de 44,4% de l'ARN du VHE dans le sang [152]. En France, selon une étude de 2011, la prévalence chez des cochons à l'abattoir est de 4%. Des disparités ont été décrites selon la région : les fermes situées dans l'ouest de la France ont une probabilité plus importante d'avoir au moins un cochon avec un ARN positif [151].

2. Facteurs de risque

Des facteurs de risque de haute prévalence dans une ferme ont été identifiés. Une étude française a identifié des facteurs de risque de présence du VHE dans le foie des cochons à l'abattage : écart de plus de 20 jours entre le premier et le dernier chargement pour abattage de cochons du même lot (ceci pouvant être dû au fait que les cochons envoyés en premier, c'est-à-dire qui ont pris du poids le plus rapidement, pourraient encore être en phase d'excrétion virale), taux d'échange à la naissance supérieur à 25% (porcelets nourris par une truie différente de leur mère biologique), absence de port de bottes spécifiques par les éleveurs, terrain génétique de la mère

et origine de l'eau bue par les cochons (risque plus élevé pour des eaux d'origine superficielle). Cette même étude identifie des facteurs de risque associés à une séropositivité à l'âge d'abattage : une *down period* (temps pendant lequel on enlève les animaux des locaux afin de pouvoir procéder au nettoyage des locaux) de la nurserie d'au moins 4 jours, une distance inférieure ou égale à 80 cm entre le sol en caillebotis du local d'engraissement et la fosse de fumier, un mélange de cochons de différents locaux entre les étapes de naissance et de nurserie et une acclimatation des cochettes par distribution de placenta et fèces de truies (pratiques effectuées en vue d'immuniser la cochette) [153].

Une étude réalisée en Mongolie semble montrer que la séroprévalence est plus faible dans les fermes de petit effectif (120 cochons au maximum, dans cette étude) [154] ; une étude réalisée en Italie retrouve des prévalences d'ARN du VHE plus élevées dans les fermes élevant plus de 1000 truies [155]. Néanmoins, une étude réalisée en Thaïlande montre des séroprévalences plus élevées chez des cochons élevés dans des fermes ayant entre 30 et 300 cochons que dans des fermes ayant plus de 300 cochons. L'étude menée par les auteurs a montré que, dans les grandes fermes, l'eau donnée aux animaux est plus souvent traitée, des mesures de désinfection sont plus souvent utilisées et ces fermes ont un accès facilité à des vétérinaires [156]. En Chine, une étude montre également que la séroprévalence est plus élevée dans des fermes familiales (20 à 50 cochons) que dans des grandes fermes, ces dernières nourrissant les porcs avec des produits formulés commercialement et ayant accès à de meilleures conditions sanitaires et de logement des porcs [157].

Le type de gestion (biologique ou conventionnelle) peut également avoir un impact : dans une étude néerlandaise, la séroprévalence des cochons était plus élevée dans les fermes biologiques que dans les fermes traditionnelles [158].

Une influence saisonnière sur la prévalence de l'ARN VHE chez le porc a également été décrite : un pic important aurait lieu en mars-avril suivi d'un pic plus faible en septembre-octobre [150].

En Corse, le type d'élevage (beaucoup de fermes pratiquant un élevage en plein air) et la présence d'hybrides entre cochons et sangliers, jouant possiblement

un rôle dans la dissémination de pathogènes dont le VHE entre cochons d'élevage et sangliers, pourrait favoriser la dissémination du virus [159].

3. *Histoire naturelle de l'infection par le VHE chez le cochon*

L'infection par le VHE semble survenir à des âges différents selon les études, entre 30 et 140 jours d'âge [150]. Ceci relève d'estimations basées sur des analyses sérologiques. Le placenta porcine ne permet pas la transmission d'anticorps de la truie aux porcelets (il s'agit d'un placenta de type épithéliochorial), les porcelets absorbent des anticorps *via* le colostrum et cela leur confère une immunité passive. Ce phénomène d'immunité passive joue un rôle dans la transmission du VHE et l'âge lors de l'infection mais ne doit pas faire oublier le rôle des pratiques d'élevage et d'hygiène [160].

L'excrétion du virus a, en revanche, été plus étudiée. La période d'excrétion virale se situe principalement entre un mois et demi et cinq mois avec un pic vers 90 jours. A l'âge de 185 jours (âge courant d'abattage), la probabilité d'excrétion se situe vers 6% [150].

Certains facteurs peuvent influencer sur l'infection par le VHE. La co-infection par le virus du syndrome reproductif et respiratoire porcine (PRRSV) entraîne une période de latence (délai d'apparition de la première selle positive) plus longue, une durée d'infection plus longue par le VHE, une excrétion virale plus longue et plus élevée, augmentant le risque de transmission à d'autres cochons [161], la virémie est également plus longue [162]. Par ailleurs, un cochon infecté par le PRRSV développerait une infection à VHE avec de plus faibles doses virales [161]. Ces modifications pourraient augmenter la probabilité qu'un cochon soit encore porteur du VHE lorsqu'il atteint l'âge de l'abattoir.

4. *Transmission du VHE chez les cochons*

Les cochons excrètent le VHE dans leurs selles voire dans leurs urines [163]. Ils sont très fréquemment en contact avec les selles et urines les uns des autres et les déjections peuvent souiller la nourriture ou la boisson des animaux [150]. Les cochons ont également des contacts entre eux au sein d'un enclos et le mélange des cochons à différents stades de production peut avoir un impact sur la propagation du virus [150]. Les truies reproductrices jouent un rôle car elles transmettent une immunité passive aux porcelets et pourraient également transmettre le virus aux

porcelets lors de l'allaitement dans les caisses de mise bas ; il semble que les truies autour de la période de mise bas ont souvent une excrétion fécale de VHE. Par ailleurs, la transmission transplacentaire du VHE chez le porc est controversée [150].

La persistance du virus dans les fermes est liée à la capacité du virus à rester dans l'environnement des animaux, à la réintroduction régulière de virus dans les fermes et à la capacité du virus à survivre et à se répandre la population (ceci étant étudié par le taux de reproduction de base ou R0) [150]. Le calcul du R0 (nombre moyen d'individus infectés par un individu infecté) a donné des résultats variables selon les études, allant de 1,41 à 8,8 [150]. Une transmission directe est possible au sein d'un enclos, mais aussi une transmission entre enclos différents, induisant par la suite une transmission du virus entre animaux du deuxième enclos [164]. La transmission du VHE est facilitée par la co-infection avec le PPRSV.

B. Circulation du VHE dans la chaîne alimentaire

Le VHE a été retrouvé dans des produits alimentaires d'origine porcine destinés à la consommation humaine [165–167] et des cas humains liés à cela ont été identifiés [42]. Une étude menée au Japon a retrouvé de l'ARN du VHE dans sept paquets de foie de porc cru sur 363 : il s'agissait d'un échantillon de génotype 4 et de six échantillons de génotypes 3, les charges virales étaient comprises entre 10^2 et 10^7 copies/g [168]. Une étude canadienne a retrouvé de l'ARN du VHE de génotype 3 dans 36 pâtés de porc sur 76 et dans deux foies de porc sur 19 [169]. Il existe un lien entre la consommation de viande porcine ou de cerfs ou le travail auprès de porcins et la séropositivité vis-à-vis du VHE ou bien la probabilité de développer une hépatite E [170–173]. Une étude réalisée sur des chasseurs allemands semble montrer, parmi d'autres facteurs, l'intérêt de porter des gants de protection durant le dépeçage de sangliers [174].

La viande de gibier peut également être infectée : une étude réalisée dans le sud de la France chez des sangliers, cerfs, et lapins sauvages retrouve de l'ARN du VHE dans les foies de 5,8% des sangliers, 3,2% des cerfs et 5,0% des lapins sauvages [175].

Le virus peut être retrouvé dans le foie des cochons mais ne semble pas être retrouvé dans les muscles [176]. Néanmoins, une étude allemande réalisée sur des

sangliers, retrouve du VHE dans un prélèvement musculaire de l'un d'entre eux [174], et une étude française semble montrer une probabilité plus importante de retrouver du VHE dans les muscles dans le cas d'une co-infection avec le PRRSV [162]. Une étude récente soulève le problème de la présence de VHE dans du sang de porc et des produits qui en dérivent : du sang de porc ou des produits dérivés de sang de porc peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire [177].

V. Circulation du VHE dans l'environnement – circulation hydrique

Ce phénomène est considéré comme concernant principalement le VHE de génotypes 1 et 2. Il est retrouvé dans les zones du monde où l'assainissement des eaux n'est pas optimal, et c'est là que sont majoritairement mis en évidence les génotypes 1 et 2.

Ainsi, le génotype 1 a été décrit en Asie (sous-continent indien, Chine, Bangladesh, Népal, Pakistan et Afghanistan) et en Afrique sub-saharienne. Le génotype 2 a été décrit au Mexique et dans certains pays d'Afrique (Nigeria, Tchad, Soudan et République centrafricaine) [49].

De nombreuses épidémies ont été décrites, associées à la circulation hydrique du virus [178–181], et certaines ont eu lieu dans des camps de réfugiés en Afrique subsaharienne [182].

Dans ces régions du monde, beaucoup de gens n'ayant pas accès aux sanitaires, leurs selles peuvent contaminer les eaux souterraines, les récoltes ou les canaux ; les eaux des rivières, utilisées pour la boisson, la baignade ou pour laver la vaisselle peuvent être contaminées [51]. La contamination des eaux environnementales peut également entraîner la contamination des fruits de mer ou d'eau douce (ces animaux filtrent l'eau et peuvent concentrer des virus en leur sein) destinés à être mangés. Des eaux contaminées risquent d'être utilisées pour irriguer des cultures et, ainsi, contaminer des fruits et légumes.

VI. Circulation du VHE dans l'environnement – circulation hydrique dans les pays industrialisés et le nord-est de la France ?

Le VHE est un virus se transmettant par voie hydrique dans les pays en voie de développement (génotypes 1 et 2) et par ingestion de viande d'animaux infectés ou contact avec ces animaux dans les pays développés (génotypes 3 et 4). Néanmoins il existe des éléments laissant penser à la possibilité d'une transmission hydrique également dans les pays développés, avec les génotypes 3 et 4.

A. Arguments en faveur d'une transmission hydrique des génotypes 3 et 4

Parfois aucune transmission du cochon à l'Homme n'est observée ; une contamination indirecte par l'environnement est donc probable mais difficile à prouver [113].

1. Prélèvements hydriques ou d'aliments en contact avec l'eau

Plusieurs études ont décrit la présence de VHE dans des prélèvements hydriques ainsi que dans des fruits de mer.

Comme le montre le [tableau 2](#), des études réalisées à travers le monde et notamment en Europe, retrouvent du VHE dans des prélèvements d'eaux usées. Les occurrences sont très variables, allant de 0 à 93%, et 100% en Inde, mais l'interprétation de ces résultats doit tenir compte des volumes et périodes de prélèvement très variables d'une étude à l'autre ainsi que de la variabilité des méthodes utilisées. En Europe, le principal génotype retrouvé est le génotype 3, avec quelques études retrouvant du génotype 1. En Asie, le génotype 1 est retrouvé en Inde, ce qui n'est pas surprenant et les génotypes 3 et 4 sont retrouvés dans les pays plus développés que sont la Chine et le Japon. Quelques études ont été réalisées, principalement en Europe, sur des prélèvements d'eaux usées traitées ([tableau 3](#)) : quelques prélèvements positifs ont été retrouvés, en Espagne, en Norvège et en Inde ; du VHE de génotypes 1 et 3 a été retrouvé en Norvège, tandis qu'il s'agit d'un génotype 1a en Inde. Des données quantitatives pourraient être utiles afin d'avoir des données sur la diminution des charges virales après traitement.

Des prélèvements réalisés dans des eaux de surface de divers pays montrent des prévalences inférieures à celles des eaux usées non traitées et ne dépassant pas 20% [183–186].

Les fruits de mer filtrent l'eau lors de leur processus d'alimentation et peuvent concentrer certains virus [187]. Des études ont été réalisées à travers le monde sur des coquillages bivalves afin de rechercher le VHE (tableau 4). Les principaux types concernés sont des huîtres, coques, moules, palourdes et des espèces asiatiques. Le génotype 3 est retrouvé en Europe et les génotypes 3 et 4 en Asie.

Des prélèvements de fruits et légumes en contact avec de l'eau (irrigation) ont été réalisés et montrent des résultats positifs dans certaines études au Canada et dans divers pays européens [188–191].

Tableau 2 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les eaux usées non traitées

NA : non applicable, ND : non fait, nc : non communiqué.

| Localisation | Volume | Période d'échantillonnage | Occurrence | Positifs/Total | Génotype (n) | Charge virale (copies/L) | Références |
|-----------------|--------|---------------------------|------------|----------------|----------------|--------------------------------------|------------|
| Europe | | | | | | | |
| Espagne | 40 ml | 7 ans 2 mois | 43,5 % | 20/46 | 3 (6) | ND | [192] |
| Espagne | 42 ml | 7 ans 2 mois | 31,8 % | 29/91 | 1 (1), 3 (14) | 3,2×10 ⁴ | [193] |
| Espagne | 50 ml | 1 an 6 mois | 13,5 % | 5/37 | ND | ND | [194] |
| France | | 1 mois | 25 % | 1/4 | 3 (1) | ND | [192] |
| France | 1 l | 3 mois | 22,2 % | 4/18 | 3f (4) | 10 ³ -6,3×10 ⁵ | [165] |
| Grèce | | 2 mois | 0% | 0/5 | NA | ND | [192] |
| Grèce | 100 ml | 1 an 9 mois | 0 % | 0/48 | NA | NA | [195] |
| Italie | 10 ml | 1 an | 16 % | 19/118 | 1 (18), 3 (1) | ND | [196] |
| Italie | 500 ml | 1 an | 4,76 % | 1/21 | 3 (1) | ND | [197] |
| Norvège | 40 ml | 1 an | 8 % | 4/50 | Probable 3 (2) | ND | [198] |
| Portugal | 60 ml | 2 mois | 6,7 % | 2/30 | 3 (2) | ND | [199] |

| | | | | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------|--------|--------|--------|---------------------|-------|
| Royaume-Uni | 20 ml | 9 mois | 93 % | 14/15 | 3 (14) | ND | [200] |
| Suède | | 2 mois | 0% | 0/4 | NA | ND | [192] |
| Suède | 5 l | 1 mois | 33,3% | 1/3 | ND | 4,5x10 ⁴ | [201] |
| Suisse | 500 ml | 1 an | 32,3 % | 40/124 | 1 (1) | 7,8x10 ⁴ | [202] |
| Suisse | 90 ml | 1 an | 24,1 % | 15/62 | | | [202] |
| Amérique du Nord | | | | | | | |
| États-Unis | 40 ml | 1 mois | 20 % | 1/5 | 3 (1) | ND | [192] |
| Amérique du Sud | | | | | | | |
| Argentine | 1500 ml | 4 ans | 6,3 % | 3/48 | 3 (3) | ND | [203] |
| | 2 l | 6 mois | 30 % | 3/10 | 3 (3) | ND | [204] |
| Colombie | 50- | 3 mois | 0 % | 0/10 | | NA | [204] |
| | 1500 ml | 17 mois | 20 % | 2/10 | | NA | [204] |
| Afrique – Moyen Orient | | | | | | | |
| Égypte | 4 l | 1 an 2 mois | 0 % | 0/76 | NA | NA | [205] |
| Égypte | 5 l | 5 mois | 23,1 % | 3/13 | ND | 6,9x10 ² | [206] |
| Israël | 1 l | 2 ans | 8,3 % | 14/169 | 3 (5) | ND | [207] |
| Tunisie | 80 ml | nc | 0 % | 0/24 | NA | NA | [208] |
| Asie | | | | | | | |
| Chine | 10 ml | 3 mois | 1,3 % | 2/152 | 4 (2) | ND | [209] |
| Inde | 500 ml | 3 mois | 100 % | 9/9 | ND | ND | [210] |

| | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------|--------|--------|---------|--|-------|
| Inde | 200 µl- 10 ml | 1 an | 11 % | 9/82 | 1a (10) | ND | [211] |
| Inde | 32 ml | 2 ans | 41 % | 79/192 | 1 (6) | ND | [212] |
| Japon | 50 ml | 1 an 6 mois | 1,6 % | 1/62 | 3 (1) | ND | [213] |
| Japon | 50 ml | 11 mois | 11 % | 3/28 | ND | 1,7x10 ⁵ -1,8x10 ⁶ | [214] |
| Océanie | | | | | | | |
| Polynésie Française | 500 ml | nc | 16,7 % | 1/6 | ND | < 1,4x10 ³ | [215] |

Tableau 3 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les eaux usées traitées

NA : non applicable, ND : non fait.

| Localisation | Volume analysé | Période d'échantillonnage | Occurrence | Positifs/Total | Génotype (n) | Charge virale | Références |
|-----------------|-------------------|---------------------------|------------|----------------|--------------|---------------|------------|
| Europe | | | | | | | |
| Espagne | 50 ml (prétraité) | 1 an 6 mois | 12,5% | 4/32 | ND | ND | [194] |
| Espagne | 10 l | 1 an 6 mois | 0 % | 0/22 | NA | NA | [194] |
| Italie | 500 ml | 1 an | 0 % | 0/21 | NA | NA | [197] |
| Italie | 500 ml | 1 an | 0% | 0/21 | NA | NA | [216] |
| Norvège | 40 ml | 1 an | 8 % | 4/50 | 1 (1) 3 (1) | ND | [198] |
| Portugal | Non précisé | 4 mois | 0% | 0/60 | NA | NA | [199] |
| Suisse | 500 ml | 1 an | 0 % | 0/25 | NA | NA | [202] |
| Afrique | | | | | | | |
| Égypte | 2 l | 1 an 2 mois | 0% | 0/38 | NA | NA | [205] |
| Asie | | | | | | | |
| Inde | 10 ml-200 µl | 1 an | 10,88 % | 5/46 | 1a | ND | [211] |
| Japon | 200-500 ml | 1 an 6 mois | 0 % | 0/53 | NA | NA | [213] |

2. Etudes épidémiologiques

Des études menées dans des pays développés semblent montrer une séroprévalence plus élevée chez les personnes consommant des fruits de mer ou buvant de l'eau non en bouteille. Deux études menées en France chez des donneurs de sang montrent des séroprévalences plus élevées chez les consommateurs de moules [217] et d'huîtres [218] par rapport aux non-consommateurs. Une de ces études montre également une séroprévalence plus élevée chez les consommateurs d'eau non en bouteille par rapport aux consommateurs d'eau en bouteille [218]. Il n'est pas possible, en sérologie, de distinguer le génotype dans la mesure où il n'y a qu'un seul sérotype ; néanmoins, dans des pays où le génotype 3 est largement majoritaire, nous pouvons penser que les patients ayant une sérologie positive ont rencontré du VHE de génotype 3. Une épidémie à bord d'un bateau de croisière britannique semble avoir été liée à la consommation de fruits de mer et un VHE de génotype 3 a pu être identifié chez trois cas [219]. Une étude menée en Cornouailles a montré un risque plus élevé d'infection par le VHE pour les personnes vivant près des côtes tandis qu'il n'y avait aucune différences entre celles vivant loin ou près d'un élevage porcin [220]. Par ailleurs, une épidémie liée à un VHE de génotype 4 et soupçonnée d'être d'origine hydrique a été décrite dans une maison de retraite en Chine [221].

B. Circulation du VHE entre l'Homme et l'environnement dans les pays industrialisés

Nous proposons, avec ces informations, un schéma possible de circulation du VHE dans l'environnement dans les pays développés (figure 15).

Tableau 4 : Différentes études menées à travers le monde concernant la prévalence du VHE dans les fruits de mer mollusques bivalves

NA : non applicable, ND : non fait ; nc : non communiqué, UDP : unités détectables par PCR.

| Localisation | Période d'échantillonnage | Animaux | Occurrence | Positifs/Total | Génotype (n) | Charge virale | Références |
|---------------------------------------|---------------------------|---------|------------|----------------|--------------|--|------------|
| Europe | | | | | | | |
| Ecosse | nc | Moules | 85,4% | 41/48 | 3 (11) | 5,4x10 ³ -1,6x10 ⁵ UI/ml | [222] |
| Ecosse | nc | Moules | 3,0% | 8/270 | 3 (3) | 62,4 UI/ml (1 échantillon) | [223] |
| Ecosse | nc | Huîtres | 2,5% | 1/40 | ND | | [223] |
| Espagne | 8 mois | Moules | 0% | 0/51 | NA | NA | [224] |
| Espagne | 18 mois | Moules | 14,8% lots | 12 lots/81 | 3e (6) | 6,7x10 ¹ à 8,6x10 ⁴ copies/g de tissu digestif | [225] |
| Finlande (importé du Danemark) | 8 mois | Moules | 6% | 3/51 | ND | 1,3x10 ² -3,5x10 ² UDP/g | [224] |
| France | 2 ans | Coques | 0% | 0/49 | NA | NA | [187] |
| France | 2 ans | Huîtres | 0% | 0/66 | NA | NA | [187] |

| | | | | | | | |
|------------------|--------------|-------------------------|------------------|--------------|---------|---|-------|
| France | 2 ans | Palourdes | 0% | 0/65 | NA | NA | [187] |
| France | 2 ans 6 mois | Moules | 0% | 0/94 | NA | NA | [187] |
| Italie | Ponctuel | Moules | 8,1% | 3/37 | 1 | ND | [226] |
| Italie | nc | Moules | 2,7% | 8/298 | 3 (2) | 3x10 ¹ -9x10 ¹ copies/g | [227] |
| Italie | nc | Couteaux | 4,9% | 2/41 | | de tissu digestif | [227] |
| Italie | nc | Moules | 0% | 0/9 | NA | NA | [228] |
| Italie | nc | Palourdes | 0% | 0/2 | NA | NA | [228] |
| Italie | 2 ans 7 mois | Moules | 0% | 0/50 | NA | NA | [197] |
| Italie | 2 ans 7 mois | Palourdes | 0% | 0/6 | NA | NA | [197] |
| Italie | 2 ans | Moules | 0% | 0/108 | NA | NA | [229] |
| Asie | | | | | | | |
| Chine | 1 an 10 mois | <i>A. granosa</i> | 14,3%/kg | nc | 4 (nc) | ND | [230] |
| Chine | 1 an 10 mois | <i>S. subcrenata</i> | 28,2%/kg | nc | | ND | [230] |
| Chine | 1 an 10 mois | <i>R. philippinarum</i> | 11,5%/kg | nc | | ND | [230] |
| Japon | 4 mois | Yamato-Shijimi | 6,25% paquets | 2 paquets/32 | 3 (nc) | ND | [231] |
| Corée | nc | Huîtres | 8,7% | 14/161 | 3a (14) | ND | [232] |
| Thaïlande | 2 ans | Coques | 0% | 0/69 | NA | NA | [233] |
| Thaïlande | 2 ans | Huîtres | 0% | 0/52 | NA | NA | [233] |
| Thaïlande | 2 ans | Moules | 0% | 0/92 | NA | NA | [233] |

VII. Persistance du VHE dans l'environnement

La persistance du virus dans l'environnement joue un rôle important dans son potentiel de transmission.

A. Moyens d'étude de la persistance du VHE

Les méthodes de référence sont les méthodes de culture *in vitro* ou bien les expériences pouvant être réalisées *in vivo*. Les méthodes de PCR mettent en évidence le génome du virus, que celui-ci soit intègre et infectieux ou endommagé et non infectieux, elles ne peuvent pas être utilisées dans ce contexte car, dans les études d'inactivation, le but est de savoir si le virus reste infectieux ou non après un traitement donné. Des méthodes dérivées de la PCR ont été développées (traitement par RNase, PMA, EMA, cf paragraphe II.E.).

Le VHE est un virus variable du point de vue du génotype ou du sous-génotype, de l'existence sous forme de quasi-espèce au sein d'un hôte et du point de vue de l'existence de formes quasi-enveloppées et non enveloppées. Ceci peut entraîner des différences en ce qui concerne la sensibilité à divers traitements. Pour l'étude de la persistance, il s'agit donc de connaître l'origine du virus sur le plan géographique (permet de supposer le génotype probable) voire de connaître son génotype et sur le plan du type de prélèvement (permet de supposer si le virus est sous forme quasi-enveloppée ou non enveloppée).

Par ailleurs, le milieu dans lequel se situe le virus peut avoir une influence. Par exemple, si le virus est dans de l'eau pure, il sera inactivé plus facilement que dans d'autres milieux où la présence de protéines « protège » le virus, comme par exemple en présence d'albumine ou bien dans les eaux usées contenant des déchets [234,235]. Nous allons ici étudier deux types de milieux : la viande, car une transmission zoonotique du VHE est claire dans les pays industrialisés et l'eau car le VHE se transmet par voie hydrique dans les pays non industrialisés et possiblement également dans les pays industrialisés.

B. Persistance du VHE dans la viande

Afin que la viande ne comporte pas de VHE infectieux, elle doit être suffisamment cuite pour que le VHE soit inactivé par la chaleur. Nous allons voir les

travaux effectués dans diverses études pour étudier le type de cuisson, le temps et la température nécessaires afin de garantir l'innocuité de la viande.

Une étude a été réalisée par Feagins et son équipe sur des foies de porc infectés par du VHE de génotype 3. Après divers traitements thermiques, des homogénats ou des petits cubes (0,5 à 1 cm²) de foie ont été injectés à des cochons, après homogénéisation : les homogénats cuits à 56°C (par incubation dans un bain d'eau chaude) pendant 1h ont entraîné des infections chez quatre des cinq cochons auxquels ils ont été injectés ; les cubes sautés à 191°C dans de l'huile de colza durant cinq minutes et ceux qui ont été bouillis durant cinq minutes n'ont pas entraîné d'infection chez les cochons auxquels ils avaient été injectés après avoir été homogénéisés [236]. Cependant, si les morceaux de foie de porc sont plus gros, la température et le temps de cuisson risquent de devoir être plus élevés afin d'inactiver le VHE. Il est recommandé aux Etats-Unis, lors de la cuisson de la viande, de viser une température interne de 71°C [236].

Une étude a été réalisée par Barnaud et son équipe. Un foie de porc infecté par le VHE (génotype 3) a été traité pour faire du pâté. Les morceaux de pâté ont ensuite été traités par des bains chauds de 62°C, 68°C ou 71°C pendant 5 minutes à 2 heures. Après cette étape, les morceaux étaient traités de façon à être injectés à des cochons dont l'excrétion fécale et la séroconversion ont ensuite été suivies. Le groupe de cochons ayant reçu la préparation traitée à 71°C 20 minutes a été le seul groupe dans lequel aucun des cochons n'a présenté d'excrétion fécale ou de séroconversion ; après nécropsie, le VHE a été recherché par biologie moléculaire dans les foies de ces cochons : cette recherche s'est avérée négative [237]. Les auteurs ont souligné le fait que, contrairement à la contamination de certains types de nourriture (fruits ou légumes) où la contamination s'effectue en surface, ici le virus se trouve en profondeur dans l'aliment. Par ailleurs, la présence de lipides aurait un rôle protecteur et contribuerait à la stabilité thermique du VHE [237].

Une étude a été réalisée par Imagawa et son équipe à partir de VHE de génotypes 3 (souche 83-2) et 4 (souche 121-12), issu de culture et injecté dans de la viande de porc hâchée. Les concentrations dans la viande avant traitement étaient de 1.86×10^2 IU/g pour le génotype 3 et 8.49×10^1 IU/g pour le génotype 4. La souche de génotype 3 était inactivée après 5 minutes à 65°C ou 30 minutes à 63°C ;

la souche de génotype 4 était inactivée après 5 minutes à 70°C ou 30 minutes à 63°C. A la température de 65°C pendant 5 minutes, la souche de génotype 3 était inactivée, ce qui n'était pas le cas de celle de génotype 4 [238]. Il est à noter que la concentration initiale était faible, ce qui peut sous-estimer le temps et la température nécessaires pour inactiver le virus.

Imagawa et son équipe ont également réalisé une étude de cuisson de différents types de viande (longe de porc, foie de porc et viande de porc hâchée) par deux méthodes différentes pendant cinq minutes (ébullition et rôti) et mesuré les températures internes de la viande pendant la cuisson et dans les cinq minutes suivant l'arrêt de celle-ci. Selon toutes les méthodes, la température interne a été supérieure à 70°C. Le foie de porc est un type de viande plus facile à faire cuire que la longe. La viande hâchée bouillie est le type de viande et de cuisson qui a atteint le plus faible pic de température. Par ébullition la viande atteint une température plus élevée que la viande rôtie mais refroidit plus vite [238].

C. Persistance du VHE dans l'environnement hydrique

En conditions naturelles, la température et les rayons ultraviolets (UV) du soleil sont les deux principaux facteurs pouvant inactiver le VHE dans l'eau.

1. Résistance à la température

Il existe encore peu de données concernant la résistance du VHE dans diverses conditions. Les études s'y étant intéressées présentent des températures différentes, des temps différents, des modes d'évaluation différents et sont difficiles à comparer entre elles. Par ailleurs, les méthodes de détection basées sur de la culture fournissent des résultats variables et parfois uniquement qualitatifs. Les résultats peuvent varier selon la souche virale testée [239].

Nous pouvons effectuer des comparaisons par rapport à une revue écrite par Bertrand et son équipe et qui compare les résistances à la température de nombreux virus [240]. Cette étude est réalisée dans plusieurs types de matrices : simples et complexes et compare différentes gammes de températures (<50°C et ≥50°C) et différentes méthodes d'évaluation : culture cellulaire et PCR. Dans cette revue, les auteurs ont déterminé le temps (exprimé en jours) jusqu'à la diminution d'un facteur 10 de la quantité initiale : le *time to first log reduction* (TFL) pour plusieurs virus entériques. Le \log_{10} TFL a ensuite été utilisé pour effectuer les comparaisons.

Une étude réalisée sur des suspensions de selles comportant du VHE de génotype 1 montre une diminution d'infectiosité (évaluée par culture cellulaire puis immunofluorescence) d'un \log_{10} après exposition à 56°C 15 minutes [239]. Le TFL était donc de 0,01 jour dans ces conditions, ce qui est proche du TFL observé pour des virus entériques très résistants tels que les phages PhiX174 et les phages ARN F-spécifique de génogroupe I. Le VHE pourrait donc être plus résistant que le virus de l'hépatite A (VHA) dans ces conditions, mais nous disposons encore de peu de données concernant le VHE par rapport au VHA. Dans cette étude, les virus provenaient de selles et étaient donc probablement sous forme non enveloppée.

Dans une autre étude, Yunoki et son équipe ont travaillé sur la résistance du VHE (évaluée par une méthode de culture cellulaire – évaluant l'infectiosité) à la température dans une solution de 25% d'albumine et dans une solution de tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). A 60°C, les TFL étaient de 0,02 et 0,007 jours respectivement [234]. Dans ces deux cas, la comparaison avec la revue de Bertrand [240] suggère que le VHE présente une résistance proche de celle observée pour les phages ARN F-spécifiques et plus élevée que celle du VHA. Dans le cas d'une chaleur sèche, le TFL semblait être de 0,4 jours à 60°C et de 0,16 jours à 80°C, ce qui est plus élevé que sous les conditions précédentes de chaleur liquide [234]. Il est à noter que dans cette étude, les virus provenaient de selles de cochon et étaient probablement sous forme non enveloppée.

Pour ce qui est des virus sous forme quasi-enveloppée, une étude a été réalisée par Johne et son équipe sur des virus en suspension dans du milieu de culture cellulaire. Les températures testées étaient comprises entre 60 et 80°C, et l'infectiosité virale était mesurée par culture cellulaire et immunofluorescence. Le TFL était de 20 secondes, soit $2,3 \times 10^{-4}$ jours à 70°C [241]. Du fait de l'utilisation d'une forme quasi-enveloppée dans cette étude, nous avons tenté une comparaison avec un autre virus enveloppé. Nous avons choisi le virus de l'hépatite C (VHC) : il s'agit d'un virus déjà bien étudié et dont le génome se compose, comme pour le VHE, d'un ARN simple brin de polarité positive. Une étude, notamment, a étudié la résistance du VHC à la température ; le virus était dans 100 μ l milieu de culture cellulaire à la concentration de $2,5 \times 10^4$ unités formant foyer (FFU)/ml et présentait un TFL d'environ 40 secondes soit 6×10^{-4} jours à 65°C [242]. La résistance du VHE sous forme quasi-enveloppée à de fortes températures se rapprocherait donc de celle observée pour le VHC.

Schielke et son équipe ont travaillé sur une suspension de foie d'un sanglier infecté ; il s'agissait par conséquent d'une forte proportion de VHE quasi-enveloppé. Ils ont travaillé avec une méthode basée sur le traitement à la RNase avant extraction des acides nucléiques et PCR, de façon à n'amplifier que les virions intacts. L'étude portait sur le chauffage sur une courte durée de particules de VHE de génotype 3 insensibles à la RNase. Une réduction de 74% a été observée après incubation à 56°C 15 minutes et des taux de réduction au-delà de 99% (de -2.16 à -4.42 log₁₀) ont été observés après une incubation à 56°C 30 et 60 minutes et à 60°C 15, 30 et 60 minutes [93]. Dans le cas du VHC, une inactivation de 3,6 log₁₀ a été observée dans du sérum humain à 56°C pendant 30 minutes [242]. Cependant, il est nécessaire d'être prudent pour ce type de comparaison car les expériences de Schielke ont été pratiquées en utilisant une technique dérivée de la PCR pour la détection du VHE insensible à la RNase [93], tandis que celles de Song sur le VHC l'ont été en utilisant une méthode de culture cellulaire [242].

Une étude de 2018, basée sur du VHE issu de culture (quasi-enveloppé) de génotypes 3 (souche 83-2) et 4 (souche 121-12), a étudié la persistance du virus à des températures allant de 56 à 80°C, dans du milieu de culture. L'infectiosité était ensuite mesurée par culture puis PCR. Le calcul de TFL n'est pas possible avec cette étude. La souche de génotype 3, partant d'une concentration de 1,74 x 10³ UI/ml, était inactivée à 70°C 1 minute, 65°C 5 minutes, 60°C 10 minutes ou 58°C 60 minutes. La souche de génotype 4, partant d'une concentration de 1,83 x 10³ UI/ml, était inactivée à 75°C 1 minute (mais pas 70°C 1 minute, contrairement à celle de génotype 3) ou 65°C 5 minutes. De manière intéressante, après chauffage à 65°C 3 minutes, la souche de génotype 3 était inactive, contrairement à la souche de génotype 4, et après chauffage à 70°C 1 minute, la souche de génotype 3 était inactive, contrairement à la souche de génotype 4 [238]. Comme indiqué plus haut, les résultats peuvent varier selon la souche et le génotype testés. Si l'on compare avec le VHC, celui-ci est totalement inactivé en 40 minutes à 56°C, tandis que le VHE de génotype 3 était actif après 60 minutes à 56°C (cette température n'a pas été testée sur le VHE de génotype 4) ; le VHC est totalement inactivé en 8 minutes à 60°C, tandis que le VHE de génotype 3 est encore infectieux après 5 minutes mais pas après 10 minutes (la température de 60°C n'a été testée qu'une minute sur le VHE de génotype 4, il était toujours infectieux) ; le VHC est totalement inactivé en 4 minutes à 65°C tandis que le VHE de génotype 3 est inactivé au bout de 3 minutes à

cette température et le génotype 4 entre 3 et 10 minutes [238,242]. Les concentrations initiales de virus sont différentes et les unités utilisées sont elles-mêmes différentes (UI et FFU), néanmoins les deux virus semblent avoir une résistance comparable à 60 et 65°C même si le VHC semble moins résistant à 56°C. De manière intéressante, Imagawa et son équipe ont chauffé du milieu de culture sans virus à différentes températures (65 à 80°C) et mesuré la température toutes les minutes pendant 5 minutes : la température augmente puis atteint un plateau au bout de 3 minutes [238].

Des travaux ont été menés sur la persistance du VHE avec des températures plus basses et plus proches de celles retrouvées de manière naturelle dans l'environnement. Des TFL ont pu être calculés d'après les travaux de Johne et son équipe : dans du milieu de culture cellulaire, les TFL étaient d'environ 3 jours à 22°C et environ 2 jours à 37°C [241]. Si nous comparons avec le VHC, le TFL du VHC dans du milieu de culture est d'environ 5 jours à 25°C \pm 2°C et d'environ 9 heures à 37°C [242]. Le VHE sous forme quasi-enveloppée serait donc moins résistant que le VHC à température ambiante mais plus résistant à 37°C ; ces résultats nécessitent une confirmation par d'autres études.

Le VHE semble aussi résistant que les phages ARN F-spécifique (VHE non enveloppé) et que le VHC (VHE quasi-enveloppé). D'autres études sont nécessaires, avec, dans la mesure du possible, une harmonisation des températures, des durées d'exposition, des types et formes de VHE, des matrices et des méthodes d'évaluation.

2. Résistance aux UV

Un travail a été effectué par Guerrero-Latorre et son équipe sur la résistance aux UV de VHE issu de culture (donc quasi-enveloppé). L'inactivation du virus était estimée par culture cellulaire et immunofluorescence. Une suspension de $5,93 \times 10^2$ FFU/ml a été irradiée avec des fluences de 10, 20, 40, 80, 100 et 140 mJ/cm² : une fluence de 10 mJ/cm² était suffisante pour inactiver le virus. Une seconde expérience a donc été réalisée avec des fluences plus faibles : une suspension de virus de $5,58 \times 10^3$ FFU/ml a été soumise à des fluences de 0, 2, 5, 7 et 10 mJ/cm². La construction d'une courbe de régression a permis de déterminer qu'une fluence de 23,19 mJ/cm² était nécessaire pour une inactivation de 4 log₁₀ (99,99%) [243]. Pour avoir une comparaison par rapport à d'autres virus entériques, nous pouvons

regarder une revue qui compare les valeurs de radiations UV nécessaires pour inactiver des poliovirus, VHA, coxsackievirus, adénovirus et bactériophages MS2, Q β , ARN F-spécifique et PhiX174 [244]. Dans cette revue, une constante d'inactivation est définie : le coefficient k. Ce coefficient est défini pour un microorganisme donné ; plus il est haut et plus le microorganisme est sensible aux UV. Les valeurs les plus basses ont été obtenues pour l'adénovirus et le phage MS2. Dans le travail de Guerrero-Latorre et son équipe, le coefficient k du phage MS2 est de 0,08 ce qui est en accord avec la revue de Hijnen et son équipe [243,244]. Nous avons pu calculer une valeur de 0,172 pour le VHE sous forme quasi-enveloppée : cette valeur est proche de celle du VHA, qui est le virus le moins résistant selon la revue de Hijnen et son équipe [244]. Il est à noter que les VHA et VHE ont des tailles de génome proches : 7500 et 7200 bases respectivement ; or des travaux effectués sur le poliovirus et le phage ARN F-spécifique ont montré que l'inactivation par les UV était corrélée à la taille du génome : plus le génome est long et plus il est sensible aux UV [245]. Il a également été montré que la dégradation du génome pourrait expliquer l'inactivation virale liée aux UV [245].

Une étude a été réalisée en 2018 dans du concentré plaquettaire afin de tester une méthode d'inactivation virale de virus non enveloppés. L'évaluation de l'activité virale a été réalisée par culture et le VHA et le calicivirus félin (*feline calicivirus*, FCV) ont été testés. Les UV utilisés étaient des UVC (longueur d'onde de 254 nm) et avaient une fluence totale de 200 mJ/cm². Le VHA, initialement au titre de $5,0 \pm 0,2 \log_{10}$ TCID₅₀/ml (*tissue culture infective dose*₅₀, dose nécessaire pour produire un effet cytopathique chez les cellules), perdait 3 log₁₀ d'infectiosité après exposition à 100 mJ/cm² et plus de 4,2 log₁₀ après exposition à 200 mJ/cm². Pour ce qui est du FCV, initialement au titre de $5,5 \pm 0,5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, une dose d'UVC de 200 mJ/cm² réduisait le titre de 3 log₁₀ [246]. Le FCV et le VHA sont des virus proches du VHE et ce traitement serait donc probablement efficace contre le VHE. Il est néanmoins à noter que ce traitement nécessite un émetteur d'UVC, car, bien qu'émis par le soleil, les UVC sont arrêtés par la couche d'ozone dans la haute atmosphère et ne sont donc pas retrouvés à la surface de la terre naturellement.

3. Résistance au chlore

Dans une étude rapportée par Cook et van der Poel, du VHE a été mis en contact avec de l'hypochlorite de soude puis mis en culture sur des cellules PLC/PRF/5 (hépatome humain) : il n'y avait pas d'effet cytopathique mais, l'ARN du VHE étant détecté, une réplication pouvait être supposée. Dans cette même étude, du VHE non traité par hypochlorite de sodium et mis en culture présentait un ARN VHE détectable jusqu'à 33 jours, tandis que dans le cas de VHE traité, l'ARN du VHE n'était détectable que pendant 7 jours : il semble donc y avoir une sensibilité du VHE au chlore [247]. Girones et son équipe ont comparé la sensibilité du VHE de génotype 1 au chlore à celle de l'adénovirus humain 2 [235]. Dans cette étude, du VHE de génotype 1 venant de selles et de culture a été traité avec de l'hypochlorite de sodium à la dose de 1000 ppm ; la décroissance a été mesurée par culture puis immunofluorescence (mesure de l'infectiosité) et par PCR en temps réel (mesure du génome viral présent). Une première phase était observée avec une diminution d'environ $2 \log_{10}$ d'infectiosité, suivie d'une phase de diminution de moins d' $1 \log_{10}$ et, au bout de 30 minutes, la présence d'ARN et de virus infectieux. L'adénovirus 2 était plus résistant au traitement par le chlore que le VHE : afin d'obtenir une diminution d' $1 \log_{10}$, la valeur de CT (concentration en chlore x temps d'exposition) nécessaire était de 0,15 mg/l x min pour le VHE quasi-enveloppé et de 0,12 mg/l x min pour le VHE non enveloppé contre 1,15 mg/l x min pour l'adénovirus 2. Les auteurs ont comparé l'activité du chlore sur le VHE dans de l'eau sans et avec adjonction d'1% d'eaux usées : les valeurs de CT nécessaires pour une réduction de l'infectiosité du VHE de $2 \log_{10}$ étaient 20 fois supérieures avec 1% d'eaux usées par rapport à sans adjonction d'eaux usées. Un travail sur la sensibilité du VHA au chlore a été réalisé par Sobsey et son équipe en 1988 [248]. De leurs données, nous pouvons calculer le CT nécessaire pour une diminution de $1 \log_{10}$ du VHA : 0,85 mg/l x min à 5°C et pH6 et 1 mg/l x min à 5°C pH8. Dans leur étude sur le VHE, Girones et son équipe ont travaillé à pH8 et 25-26°C ; cette différence de température peut rendre difficile la comparaison avec le VHA, néanmoins nous pouvons supposer que le VHE est plus sensible que le VHA au traitement par le chlore [235,248]. Il est cependant à noter que l'augmentation de la température tend à rendre les désinfectants plus actifs (ou peut les rendre plus volatils et donc moins actifs) [249]. La concentration de chlore à ajouter dans l'eau pour obtenir une désinfection est supérieure à ce qui est normalement requis pour inactiver les pathogènes, ceci étant lié au fait que le

désinfectant réagit non seulement avec les micro-organismes mais également avec d'autres substances présentes [249].

Pour ce qui est de l'application d'une désinfection par le chlore, il est à noter qu'un pH et une turbidité plus élevés de l'eau nécessitent des concentrations plus élevées de chlore [250]. Par ailleurs, selon l'utilisation de l'eau, un phénomène de recontamination est possible et nécessite que des concentrations de chlore suffisantes (on considère 0,2 mg/l) persistent jusqu'à ce que l'eau soit entièrement consommée ; or les UV et la température entraînent une dégradation plus rapide du chlore [250]. Par exemple, on considère qu'il faut une augmentation de 0,5 mg/l de la concentration initiale de chlore pour une augmentation de la température ambiante de 10°C [250].

4. *Autres méthodes de traitement du VHE*

D'autres méthodes de traitement ont été décrites, notamment pour les produits sanguins en vue d'une transfusion. Des systèmes utilisant une molécule ajoutée à la préparation puis une adjonction d'UV. Le système Intercept utilise une molécule, l'amotosalen, un composé de psoralène synthétique, qui s'intercale de manière réversible dans les régions hélicoïdales de l'ADN et de l'ARN. Lors d'une exposition aux UVA, cette molécule réticule les acides nucléiques, rendant toute répllication impossible [246,251]. Le système Mirasol utilise la riboflavine (ou vitamine B2) qui, lorsqu'elle est exposée aux UV, s'associe aux acides nucléiques et médie un transfert d'électrons oxygène indépendant [246]. Ce dernier système, testé sur des souches de VHE de génotypes 3 et 4, avec un système de culture cellulaires afin de tester l'infectiosité, entraîne une réduction de 3 log₁₀ sur une souche de génotype 3 et 2 log₁₀ sur une souche de génotype 4 [91].

Revue

La transmission du virus de l'hépatite E par l'eau : une question toujours en suspens dans les pays industrialisés

H. Fenaux, M. Chassaing (co-premier auteur),
S. Berger, C. Gantzer, I. Bertrand, E. Schvoerer

Revue publiée dans *Water Research*, 2019,
volume 151, pages 144-157

A partir de ces données bibliographiques, nous avons écrit une revue, dans laquelle nous discutons de la variabilité génétique du VHE et de sa circulation dans les pays industrialisés.

Variabilité du VHE

Le VHE est un virus variable. Plusieurs génotypes sont décrits, dont le spectre d'hôte diffère. Au sein des génotypes, plusieurs sous-génotypes ont également été décrits. Le virus possède un certain degré de polymorphisme, plus important chez les génotypes 3 et 4 que chez les génotypes 1 et 2. La population virale au sein d'un individu ou d'un environnement particulier est répartie en quasi-espèce, avec une coexistence de variants apparentés mais génétiquement distincts. Cette grande variabilité peut avoir des conséquences en termes d'antigénicité, d'hydrophobie, de comportement de la particule virale, d'échappement immunitaire ou encore de *fitness* viral. Au sein d'une quasi-espèce, il peut exister une « coopération » entre différents variants, dont certains peuvent, par exemple, présenter une facilité plus grande à coloniser les tissus, tandis que d'autres présenteront des capacités d'évasion immunitaire. Il a été montré que, chez des patients immunodéprimés, une complexité et une diversité élevées de la population virale étaient corrélées à un risque plus élevé de passage à la chronicité [87,149].

Le VHE peut exister sous forme non enveloppée ou sous forme quasi-enveloppée. Ceci peut également modifier son comportement dans l'environnement : l'hydrophobie n'est pas la même.

En conséquence, afin d'étudier la circulation du virus dans l'environnement hydrique et donc son comportement, la forme sous laquelle il est excrété dans l'eau est à prendre en compte : non enveloppée ou quasi-enveloppée, génotype (donc hôte d'origine et zone géographique), sous-génotype...

Circulation du VHE dans l'environnement

Le VHE a été mis en évidence dans divers prélèvements hydriques à travers le monde : eaux d'entrée et de sortie de station d'épuration, rivières... Il a par ailleurs été mis en évidence sur des fruits ou légumes destinés à la consommation.

Dans les pays pauvres, des personnes défèquent dans des arrière-cours et des champs puis la pluie lave ces zones contaminées et peut entraîner le virus vers des cours d'eau, dont l'eau peut ensuite être bue ou utilisée à visée domestique ou pour irriguer les cultures. Un phénomène similaire pourrait être observé dans les pays développés suite à la défécation d'animaux sauvages infectés ou suite à de violentes intempéries entraînant un débordement des stations d'épuration avec passage d'eaux contaminées dans l'environnement.

Survie du VHE dans l'environnement

Les capacités de persistance du virus dans l'environnement influencent les possibilités de transmission ainsi que les moyens devant être utilisés afin de décontaminer les produits destinés à la consommation.

La persistance ne peut pas être mesurée par des techniques de biologie moléculaire, dans la mesure où celles-ci détectent du génome viral sans faire la différence entre virus infectieux et virus inactivés. Des méthodes de culture cellulaire du VHE ont pu être mises au point récemment, bien que le VHE soit un virus difficilement cultivable. Des méthodes de biologie moléculaire sélectionnant spécifiquement les virus intègres ont été également mises au point : utilisation de RNase avant l'extraction ou utilisation d'agents intercalant tels que PMA ou EMA.

Ici aussi, les études concernant la survie du virus doivent prendre en compte la forme étudiée (non enveloppée ou quasi-enveloppée) ainsi que le génotype afin de pouvoir exploiter les résultats de façon pertinente.

La connaissance de la résistance du VHE à la chaleur est difficile du fait d'études utilisant des températures, durées, matrices et moyens de mesure non standardisés. Néanmoins, il semble que le VHE sous forme non-enveloppée présente à la chaleur une résistance similaire à celle du phage ARN F-spécifique, tandis que la forme quasi-enveloppée présente une résistance similaire à celle du VHC. L'étude de la résistance du VHE aux UV montre que la forme quasi-enveloppée du virus présente une résistance similaire à celle du VHA mais plus faible que celle du phage MS2. Des études seraient nécessaires pour tester la forme non enveloppée. Le VHE semble plus sensible aux traitements par les dérivés chlorés que d'autres virus tels que le VHA ou l'adénovirus humain 2.

Comportement du VHE dans l'environnement

Le comportement d'un virus dans un environnement donné dépend de sa taille, de sa charge et de son hydrophobie. Pour ce qui est du VHE, il présente une taille similaire à celle de nombreux autres virus entériques tels que le VHA ou le norovirus. Le point isoélectrique du VHE n'est pas connu mais des mesures montrent une protéine ORF2 présentant un point isoélectrique environ à 9 [252] et une protéine ORF3 présentant un point isoélectrique de 12,5 [253]. Le point isoélectrique du protéome d'une souche de VHE de génotype 1 a été mesuré à 7,64 [254]. Le génome du virus peut avoir une influence sur sa charge et la variabilité du virus peut également faire varier la charge. L'hydrophobie peut varier selon le génotype ou sous-génotype viral dont il est question et la forme sous laquelle se trouve le virus : la forme quasi-enveloppée étant associée à des lipides, elle présente une hydrophobie plus élevée.

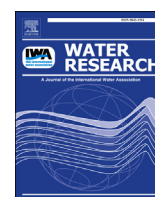
Développement de méthodes d'étude du VHE

Les méthodes de concentration et d'extraction sont difficiles à mettre en place pour le VHE, car elles doivent prendre en charge la taille, la charge et l'hydrophobie du virus qui sont, nous l'avons vu, des paramètres variables.

Le développement récent de méthodes d'étude en microbiologie et génétique peut aider à faire avancer la connaissance sur le VHE et son comportement dans l'environnement. Des méthodes de séquençage haut débit, permettent d'avoir une meilleure visibilité sur les variants minoritaires de VHE présents dans l'environnement. Nous disposons de logiciels permettant une prédiction de l'antigénicité d'une protéine donnée, ce qui permet de supposer l'impact entraîné par une substitution d'acide aminé donnée.

Conclusion

Il reste encore de nombreuses zones d'ombre sur la circulation du VHE dans l'environnement dans les pays industrialisés. Le virus semble ne pas présenter une résistance particulièrement élevée aux moyens habituels de traitement (température, UV, chlore) mais il s'agit d'un virus variable, ce qui rend son étude plus difficile. Des informations sont encore nécessaires afin de mieux prévoir le comportement du virus et aider à la mise en place de politiques de surveillance et de prévention.



Review

Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries[☆]H. Fenaux^{a, b, 1}, M. Chassaing^{b, 1}, S. Berger^a, C. Gantzer^b, I. Bertrand^b, E. Schvoerer^{a, b, *}^a Laboratoire de Virologie, CHRU de Nancy Brabois, F-54511 Vandoeuvre lès Nancy, France^b Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, LCPME UMR 7564 CNRS-UL, F-54600 Villers lès Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2018

Received in revised form

5 December 2018

Accepted 7 December 2018

Available online 18 December 2018

Keywords:

Hepatitis E virus (HEV)

Water

Occurrence

Variability

Transmission

Survival

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an enteric virus divided into eight genotypes. Genotype 1 (G1) and G2 are specific to humans; G3, G4 and G7 are zoonotic genotypes infecting humans and animals. Transmission to humans through water has been demonstrated for G1 and G2, mainly in developing countries, but is only suspected for the zoonotic genotypes. Thus, the water-related HEV hazard may be due to human and animal faeces. The high HEV genetic variability allows considering the presence in wastewater of not only different genotypes, but also quasispecies adding even greater diversity. Moreover, recent studies have demonstrated that HEV particles may be either quasi-enveloped or non-enveloped, potentially implying differential viral behaviours in the environment.

The presence of HEV has been demonstrated at the different stages of the water cycle all over the world, especially for HEV G3 in Europe and the USA. Concerning HEV survival in water, the virus does not have higher resistance to inactivating factors (heat, UV, chlorine, physical removal), compared to viral indicators (MS2 phage) or other highly resistant enteric viruses (Hepatitis A virus). But the studies did not take into account genetic (genogroups, quasispecies) or structural (quasi- or non-enveloped forms) HEV variability. Viral variability could indeed modify HEV persistence in water by influencing its interaction with the environment, its infectivity and its pathogenicity, and subsequently its transmission by water. The cell culture methods used to study HEV survival still have drawbacks (challenging virus cultivation, time consuming, lack of sensitivity). As explained in the present review, the issue of HEV transmission to humans through water is similar to that of other enteric viruses because of their similar or lower survival. HEV transmission to animals through water and how the virus variability affects its survival and transmission remain to be investigated.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

| | |
|---|-----|
| 1. Introduction | 145 |
| 2. Source of water pollution: host and viral particle variability | 145 |
| 3. Epidemiological proof of the water transmission of HEV | 147 |
| 4. Occurrence of HEV in the water cycle: from the source to the water use in the food chain | 148 |
| 5. HEV survival in water | 151 |
| 5.1. Method used to evaluate survival | 151 |
| 5.2. Thermal inactivation | 152 |

[☆] Honorine Fenaux, Manon Chassaing, Christophe Gantzer, Isabelle Bertrand and Evelyne Schvoerer wrote the manuscript. Sibel Berger contributed to the expert re-reading of the manuscript, as an engineer.

* Corresponding author. Laboratoire de Virologie, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre lès Nancy, France.

E-mail addresses: eschvoerer@gmail.com, evelyne.schvoerer@univ-lorraine.fr (E. Schvoerer).

¹ Honorine Fenaux and Manon Chassaing contributed equally to the manuscript.

| | |
|--|-----|
| 5.3. UV inactivation | 152 |
| 5.4. Chlorine inactivation | 153 |
| 6. Physical removal in the environment and water treatment | 153 |
| 7. How may we include the variability of HEV in future studies concerning water? | 154 |
| 8. Conclusion | 154 |
| Declaration of interest | 154 |
| Funding | 154 |
| Acknowledgements | 154 |
| References | 155 |

1. Introduction

HEV is an enteric virus that causes not only acute but also chronic hepatitis. It has been increasingly studied in the past decade and has been observed to also cause syndromes other than liver-related such as neurological or renal HEV-related diseases, underlying its highly variable pathogenesis (Pischke et al., 2017). This virus is widespread or endemic in large parts of the world. It has been largely demonstrated to be a waterborne virus in developing countries, and since 1997 it has also been demonstrated to be a zoonotic virus in developed countries (Meng et al., 1997; Pavio et al., 2015). This has led to numerous recent literature reviews focussing on the zoonotic origin of HEV (Pavio et al., 2015), its infection in humans and its treatments (Echevarría et al., 2013; Miyamura, 2011; Sridhar et al., 2015), its molecular epidemiology (Purdy and Khudyakov, 2011) and the water transmission of human-adapted HEV in developing countries (Khuroo et al., 2016). They all agree with the conclusion that a better understanding of the route of transmission is needed especially for the zoonotic HEV. However, the transmission paths are still unclear in developed countries where a waterborne transmission is still questioned. Indeed, some reports coming from these countries suggest shellfish-borne outbreaks (Said et al., 2009) or higher HEV seroprevalence in shellfish consumers or non-bottled water consumers (Mansuy et al., 2015, 2016). HEV is a variable virus, which makes it difficult to be studied as some different genotypes or forms might behave differently from one another especially through the water cycle. Indeed, the high HEV genetic variability can suggest a high potential for adaptation to various organs and tissues in humans and animals. This genetic feature implies distinct pathogenic mechanisms in different syndromes for the hosts and encourages us to consider the presence in wastewater of different HEV genotypes as well as complex viral quasispecies with various transmission routes favouring HEV circulation in the environment.

The unravelling of these transmission paths would help prevent HEV infection and develop sanitary policies in order to control infections. Our aim was to provide an overview of the transmission of HEV through water with particular attention to variability linked to the source of pollution, occurrence, survival in water and removal by water treatment.

2. Source of water pollution: host and viral particle variability

HEV is an enteric virus, which infects its hosts through the faecal-oral route; in this review, transmission through ingestion of contaminated meat will not be discussed. There is only one serotype belonging to the *Hepevirus* genus and the *Hepeviridae* family (Geng et al., 2011). It is usually a non-enveloped icosahedral capsid measuring between 27 and 34 nm, which contains a single-strand, positive-sense RNA virus of 7.2 kb in length. RNA is capped and

polyadenylated at the 5' and 3' ends, respectively. It has two short untranslated regions (UTR) at the 5' and 3' ends and three open reading frames (ORF) - ORF1, ORF2 and ORF3 (Graff et al., 2006). ORF1 encodes non-structural proteins such as methyltransferase, papain-like cysteine protease, helicase and RNA-dependent RNA polymerase (Okamoto, 2007). The ORF2 and ORF3 proteins are encoded by a same subgenomic mRNA, which produces the capsid protein and phosphoryl protein, respectively (Graff et al., 2006). The size of quasi-enveloped viruses is between 50 and 110 nm (Dalton and Izopet, 2018).

Among the eight HEV genotypes, five cause human infections. G1 and G2 infect only humans and are mainly reported in regions with low levels of resources and poor sanitation resulting in contamination of food and water supplies (Khuroo et al., 2016). They are mainly observed in Asia (Indian subcontinent, China, Bangladesh, Nepal, Pakistan and Afghanistan) and sub-Saharan Africa for G1, and Mexico and some African countries (Nigeria, Chad, Sudan and the Central African Republic) for G2 (Nelson et al., 2018). HEV G3 and G4 infect humans but also a wide range of mammals such as pigs, boars, deer and rabbits (Colson et al., 2010; Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Meng, 2013). G3 infections are qualified as “emerging” diseases in European countries, including France, but they are just currently better identified and can be observed in North and Latin America, South Africa, Asia, Australia and New Zealand. Nevertheless, the seroprevalence seems to be lower in Oceania compared to Europe. G4 can be found in China, northern Japan, India and sporadically in Europe (Dalton and Izopet, 2018; Hofmeister et al., 2018; Nelson et al., 2018). The zoonotic transmission of G3 and G4 has been largely demonstrated for pigs, wild boars and deer with sometimes no modification in the sequence between the animal and human strains, meaning that there is no adaptation necessary to infect humans or animals. A zoonotic transmission is suspected for rabbits (Abranavel et al., 2017; Izopet et al., 2012; Pavio et al., 2015). The common ancestor of mammalian HEV was shown to be between HEV-1/2 and HEV-3/4: it has been estimated that an ancestor strain gave rise on the one hand to human HEV and on the other hand to zoonotic HEV more than 500 years ago. Then, both genotypes split again (Purdy and Khudyakov, 2011). Finally, only one human case has been described with HEV G7 primarily infecting dromedaries and initially named DcHEV (dromedary camel HEV) (Woo et al., 2014). Therefore, depending on the geographical area, genotypes found in water may differ but overall a large number of hosts, not all of whom have been identified yet, may contaminate the water through their faeces.

HEV is a virus subject to a certain amount of genetic variability. Some authors took HEV sequences, some of which belonging to different genotypes, and measured distances between them: nucleotide similarity between genotypes is about 75% and within a genotype it is over 81% (Smith et al., 2013). Such genetic variability makes a single HEV genotype-based study insufficient for relevant conclusions to be drawn.

HEV infection of many host species could require the involvement of many viral structural sites to favour adaptation to highly heterogeneous biotic or abiotic environments. According to Purdy and Khudyakov (2010), HEV G3 and G4 would carry more polymorphic positions than G1 and G2. The high genetic diversity seen in G3 and G4 may reflect a strong adaptation to many hosts (Purdy and Khudyakov, 2010). Under different selective pressures, many positive selection (i.e. mutations leading to an amino acid substitution) sites have been located in the overlapping region of ORF2 and ORF3. The ORF1 and non-overlapping ORF2 have many negative selection (i.e. silent mutations) sites which are proportionally in greater numbers in G1 than in G3 and G4 (Purdy and Khudyakov, 2010). We have made phylogenetic trees with two of the ORF2 domains: Middle (M) and Protruding (P) in amino acids in G1 and G3 reference strains (Fig. 1). These two domains are involved in the viral immunogenicity and interactions between HEV and cellular membranes. The overall mean distance is greater for G3 than for G1 for both M and P domains. Moreover, this great difference between HEV genotype sequences can also lead to potential technical concern, failure of diagnostic tools (Reuter et al., 2009) and failure of methods used for environmental analysis. Indeed, the genetic variability can lead to physical variability: the virus surface properties might be modified by the amino acid sequence modifications. We have tested 25 amino acid sequences of ORF2 of different HEV subgenotypes belonging to G1, G2, G3 and G4 with the AnTheProt software. This software, developed by Parker et al. (1986), was principally used to analyse the viral antigenicity; it takes into consideration three parameters to determine the antigenicity of a position within a polypeptide: hydrophobicity, accessibility and flexibility of the amino acid, and the same parameters of the three amino acids before and after it (Parker et al., 1986). In this review, it was used to work on the hydrophobicity profile of the capsid protein which has 660 amino acids. Through comparison of the amino

acid sequences of the different genotypes and subgenotypes, different profiles were observed. Subgenotypes 3 showed a large number of differences in their hydrophobicity profiles between residues 68 and 100. The hydrophobicity profiles obtained for G3f and G3h were compared (Fig. 2) and significant differences could be observed. For subtypes of G4, differences in their hydrophobicity profiles were observed between residues 67 and 74 and residues 95 and 100 (data not shown).

HEV has a quasispecies distribution, with complex mixtures of genetically distinct but closely related viral populations (Lhomme et al., 2012). This means that HEV populations coexist at any time point and any change in the environment of the virus can modify the equilibrium and the quasispecies distribution. Such a phenomenon has been described for poliovirus (Vignuzzi et al., 2006) and hepatitis C virus (Farci et al., 1997). The variability of viruses with an RNA genome results first from errors occurring during genome replication steps with a lack of RNA-dependent RNA polymerase proofreading activity. There is about one mutation for a 10,000-nucleotide genome inducing a new virion sequence in each replication process, thus producing viral quasispecies (van Tong et al., 2016). These mutations can have a high functional impact on viral fitness. Second, selective pressures from host-related immunity, cellular tissues or interactions with external environmental surfaces could also have a role in HEV variability. As an example, poliovirus virulence is determined by quasispecies diversity (Vignuzzi et al., 2006). There will be a cooperative interaction within a viral population in which some variants may facilitate the colonization of tissues; others will have an impact on the immune system, while some may even facilitate circulation of the virus. The hypothesis of highly dominant variants within quasispecies combining strong pathogenesis, immune evasion and effective viral circulation in the outside environment can be stated. Moreover, the complexity of the viral quasispecies could allow the virus to

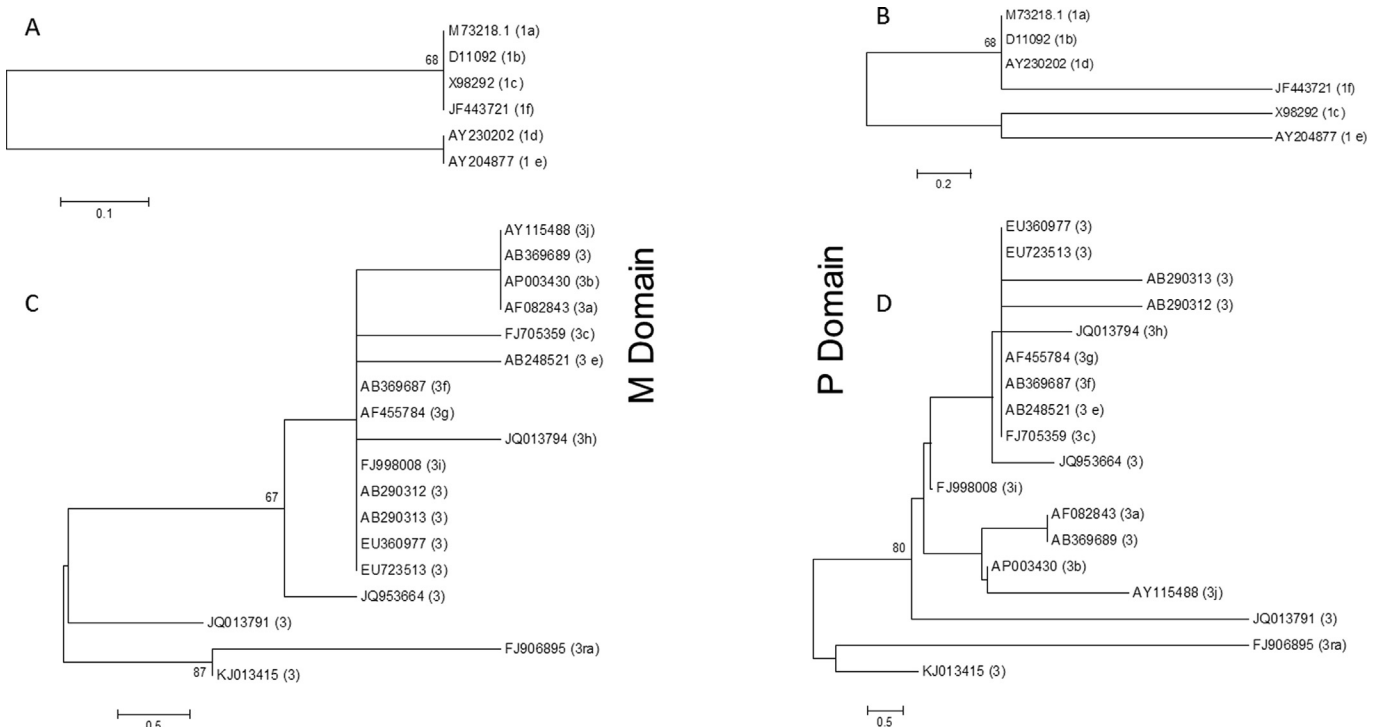


Fig. 1. A: phylogenetic tree of amino acids of the ORF2 M domain of G1 reference sequences (Smith et al., 2016a). B: phylogenetic tree of amino acids of the ORF2 P domain of G1 reference sequences (Smith et al., 2016a). C: phylogenetic tree of amino acids of the ORF2 M domain of G3 reference sequences (Smith et al., 2016a). D: phylogenetic tree of amino acids of the ORF2 P domain of G3 reference sequences (Smith et al., 2016a). Overall mean distance: 0.015 (G1) versus 0.004 (G3) for M domain and 0.026 (G1) versus 0.010 (G3) for P domain.

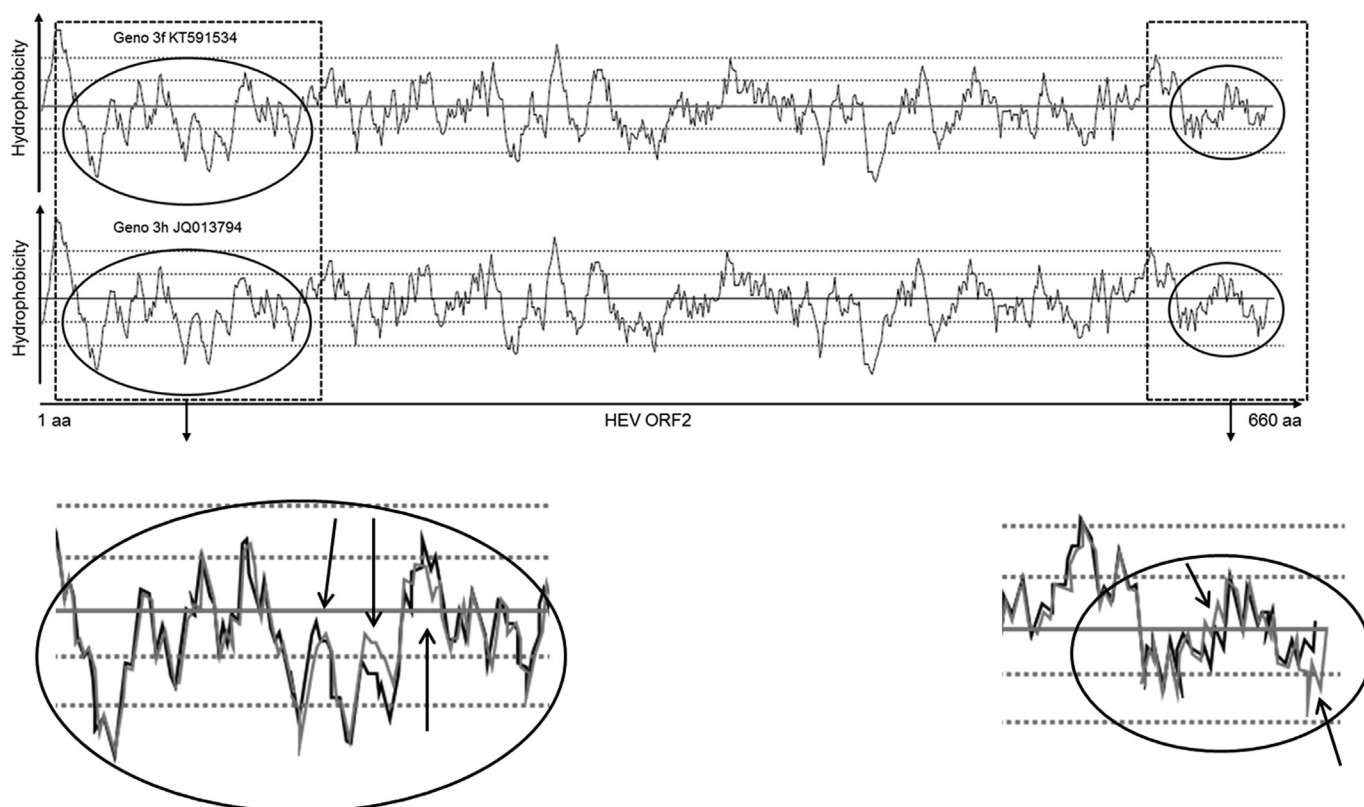


Fig. 2. AnTheProt hydrophobicity profiles for HEV genotypes 3f and 3h on HEV ORF2. We worked on 25 amino acid sequences of ORF2 of the different HEV genotypes. The results are given for subgenotypes 3f and 3h (ref 3f: KT591534; 3 h: JQ013794) (Smith et al., 2016a). Black circles highlight the variations in the upper part of the image. aa: amino acids. At the bottom: superposed profiles; subgenotype 3f is in black and subgenotype 3h is in grey. The black arrows show the differences. Most differences are seen at the N-terminal end and, to a lesser extent, C-terminal end of the protein.

combine complementary functions of different viral subpopulations.

For HEV in the clinical setting, a study from Lhomme [et al.] (2012) has been conducted to correlate viral genetic variability with the progression towards a chronic infection and/or cirrhosis. Interestingly, the greater the variability of the M and P domains, the greater is the likelihood of developing a chronic HEV infection (Lhomme et al., 2012). As a consequence, long-term HEV faecal excretion from patients suffering from chronic hepatitis will favour extensive viral spread in the outside environment.

Review of the current literature seems to indicate that the quasispecies heterogeneity could favour HEV persistence in an immunocompromised host and that higher variability between HEV populations enhances a virus's ability to infect varied hosts. We can hypothesize that these genetic characteristics can also have an impact on the transmission of the virus through water. To gain further insight into these questions, studies on HEV genetic variability and quasispecies in different types of samples are needed: hosts with chronic evolution versus hosts with virus clearance, different host species and different environmental samples (Bisseux et al., 2018).

HEV is more commonly defined as a non-enveloped virus. Nevertheless, when it leaves the hepatocytes, the virion has a membrane envelope, derived from the exosomes and composed of cholesterol, phospholipids, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, phosphoinositides and ceramides (Chapuy-Regaud et al., 2017). It is further exposed to intestinal detergents, which accounts for the destruction of the envelope (Yin et al., 2016a). Release from infected hepatocytes mostly consists of quasi-enveloped forms, whereas the non-enveloped form is more

frequent within the infected cells. The quasi-enveloped particles bind to cells less effectively and more slowly than do non-enveloped particles. This could explain why HEV from a patient's blood sample seems to be less infectious than that of faecal origin (Yin et al., 2016b). HEV cellular entry mechanisms remain poorly understood but it is known that non-enveloped HEV binds to heparan sulfate proteoglycans as a receptor on the hepatocyte surface. The quasi-enveloped HEV enters the cells through a number of different steps; it needs two GTPases, Rab5 and Rab7, an endosomal acidification in the hepatic cells and the lipid degradation activity in the lysosome (Yin et al., 2016b) (Fig. 3). Thus, non-enveloped HEV particles are excreted in the environment in the case of faecal pollution of animal or human origin, but quasi-enveloped HEV particles may also be released in the environment in the case of animal blood pollution from slaughterhouses (Fig. 4). To our knowledge, the environmental excretion of quasi-enveloped HEV particles, compared to non-enveloped particles which are supposed to be the most prevalent, has not been taken into account.

To sum up, the sources of water pollution are diverse, having human, livestock and/or wild animal origins, and so are the viral particle types with, from a physical point of view, quasi-enveloped versus non-enveloped HEV particles and, from a genetic point of view, four major genotypes (G1 to G4), subgenotypes and quasispecies.

3. Epidemiological proof of the water transmission of HEV

G1 and G2 have been largely demonstrated to be transmitted by water in developing countries (Amanya et al., 2017; Hakim et al., 2017; Haque et al., 2015; Maila et al., 2004; Singh et al., 2016). In

India, for example, highly polluted water caused waves of G1 outbreaks (1978–1984, 1993–1995, 2007–2008, 2012–2013). Such a wave outbreak pattern has been explained by successive infection/immunization and immunity loss cycles whose period length is estimated to be about 10 years. Outbreaks start when immunity decreases to 4% of total population and stop when it increases to 20% of total population. In such situations transmission of the zoonotic genotypes seems insignificant. The improvement of sanitation practices is clearly the solution for G1 control in developing countries (Khuroo et al., 2016). Interestingly, as observed in China, industrialization of a country decreases HEV risk related to G1, but increases that related to G3 and G4 (Sridhar et al., 2015).

While zoonotic transmission of G3 and G4 has been largely demonstrated mainly through food (Colson et al., 2010; Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Meng, 2013) and exposure to pigs (Bouwknegt et al., 2008; Drobeniuc et al., 2001; Pérez-Gracia et al., 2007) in developed countries, the roadmap to control autochthonous HEV is not so clear apart from better control of food products. The role of water in the transmission of zoonotic HEV has only been suspected (Sridhar et al., 2015). Detection of G3 in shellfish and seemingly shellfish-related outbreaks have recently raised the question (Sridhar et al., 2015). Sometimes no clear direct transmission from pigs to humans is observed; indirect contamination through the environment is then probable but difficult to prove (Purdy and Khudyakov, 2011).

Some studies conducted in developed countries seem to show higher HEV seroprevalence in people exposed to water or in shellfish consumers, which supports the idea of a hydric transmission of HEV G3 (Mansuy et al., 2015, 2016). As there is only one HEV serotype, it is not possible, in seroprevalence studies, to assess which genotype the individuals have been in contact with. However, when a study is conducted in a country where G3 is by far the most frequent HEV genotype, it can be assumed that it is this genotype that seropositive people have encountered. Thus, two studies about HEV seroprevalence in blood donors in France show

that it is higher in mussel consumers (Mansuy et al., 2015) and oyster consumers (Mansuy et al., 2016), compared to non-consumers. In one of these studies, drinking bottled water seems to be a protective factor (Mansuy et al., 2016). An outbreak on a cruise ship seemed to be linked with shellfish consumption; G3 was determined in three patients (Said et al., 2009). A study conducted in Cornwall showed a higher risk of hepatitis E when living near the coast, whereas there was no difference between cases and controls for people living near a pig holding (Hunter et al., 2016). A G4-related outbreak has been suspected to be waterborne in China (Chen et al., 2016).

To conclude, HEV G1 and G2 are known to be transmitted through water and G3 and G4 through a zoonotic path. However, a number of arguments suggest that the latter genotypes could also be transmitted through water.

4. Occurrence of HEV in the water cycle: from the source to the water use in the food chain

The first stage of the environmental cycle of HEV particles is their excretion (Fig. 3). Of course, non-enveloped particles excreted in the faeces of contaminated humans (wastewater treatment plants) and animals (slaughterhouses, farming, faeces of wild animals) may be considered as the main part of HEV particles released in the environment. However, quasi-enveloped particles coming from blood might also be excreted in the environment, especially in wastewater originating from slaughterhouses.

Detection of viral HEV genome by molecular tools (e.g. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction [RT-qPCR]) can be used to test for the occurrence and quantification of the total number of HEV particles (Baez et al., 2017; La Rosa et al., 2018). The advantages of this procedure include its fast running time, high sensitivity and specificity, and ease of use. The genome can be detected even if the capsid is no longer able to bind to its receptor, and free RNA molecules can be found in some environmental

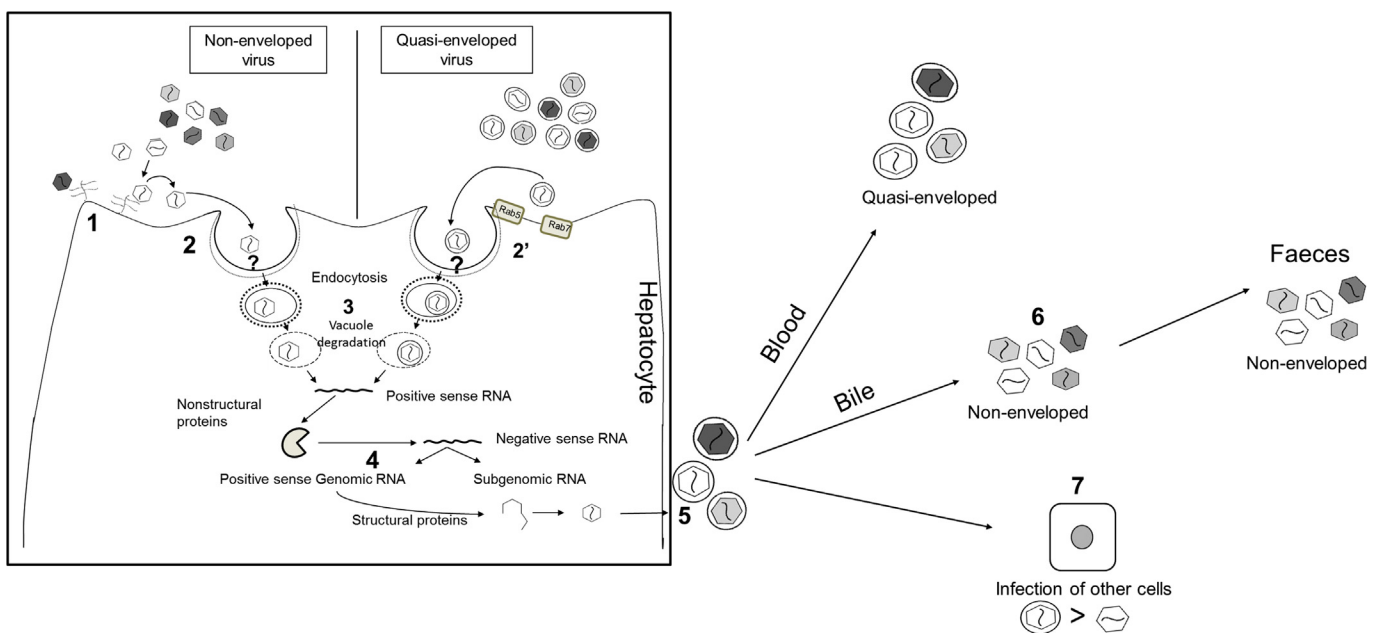


Fig. 3. HEV replication and its possible paths after cell egress. 1: Initial fixation to hepatocytes using heparan sulfate as a non-specific receptor of HEV. Specific receptor(s) is (are) still unknown. 2: Specific fixation to clathrin and dynamin-2. 2': For quasi-enveloped HEV, cell entry could require two GTPases (Rab5 and Rab7), an endosomal acidification and the lipid degradation activity in the lysosome. 3: Endocytosis. 4: HEV replication. 5: HEV leaves the cell in a quasi-enveloped form. 6: The virus quasi-envelope is destroyed in the bile after exposure to intestinal deoxycholic acid and proteases (Yin et al., 2016a) and non-enveloped HEV can be found in the faeces. 7: The quasi-enveloped HEV may be a key form in cell-to-cell infection.

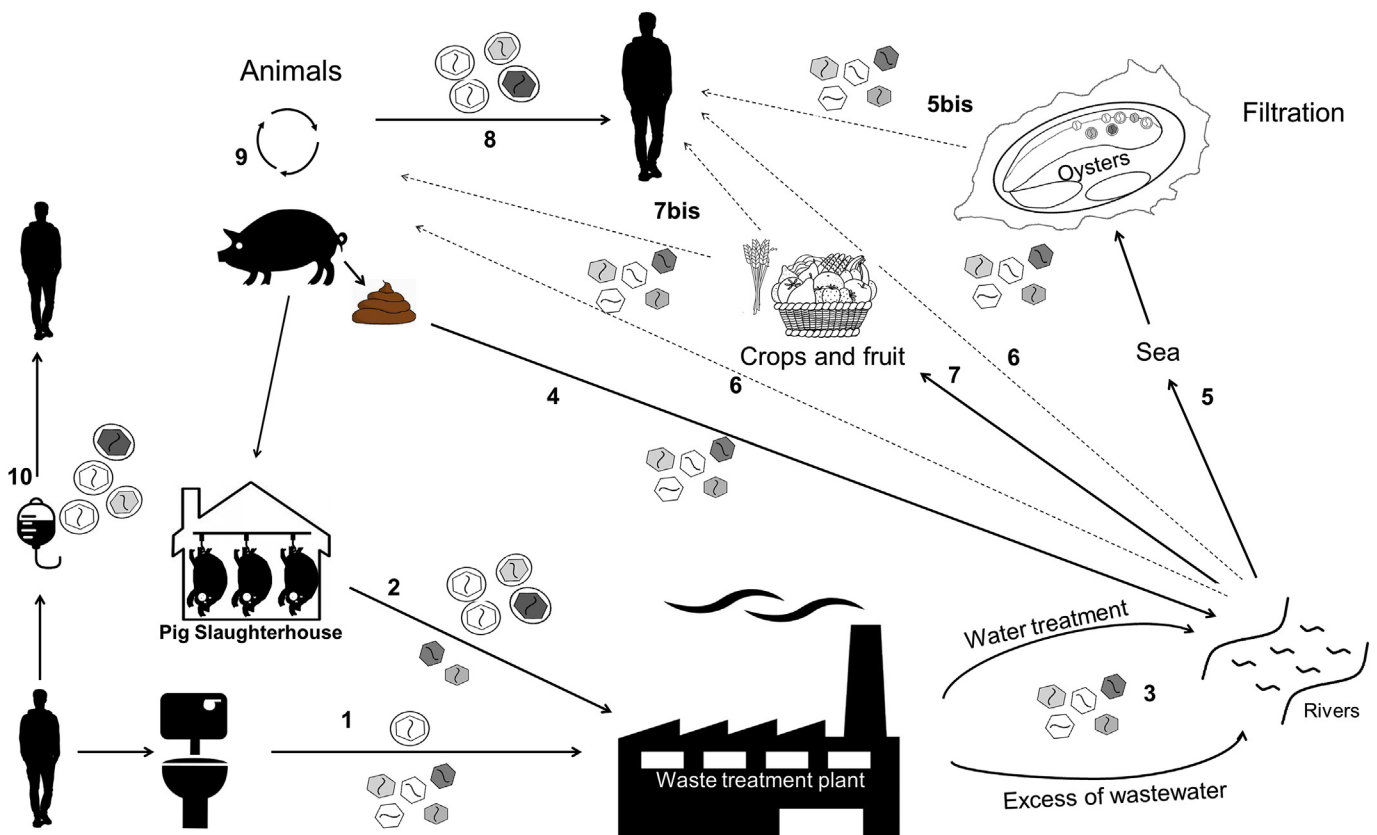


Fig. 4. HEV circulation in the environment and between its hosts. 1: Pollution of human origin that arrives in wastewater treatment plants is mainly composed of non-enveloped faecal HEV particles. 2: When infected pigs are slaughtered, pollution both composed of non- and quasi-enveloped HEV is introduced in wastewater treatment plants. 3: Discharge of treated wastewater, the quality of which can even be altered in case of malfunction (e.g., bypass of untreated water due to heavy rain). 4: Infected pig stool can contaminate environmental waters through manure runoff, HEV is then in a non-enveloped form. 5: Shellfish that grow in environmental waters can then be contaminated by HEV. 5bis: Humans could possibly get infected by consumption of contaminated shellfish. 6: Humans and animals could get infected through consumption of contaminated water. 7: Crops can be contaminated by irrigation. 7bis: Humans and animals that consume the crops could possibly get infected. 8: When eating meat of infected animals, humans can be theoretically contaminated by quasi-enveloped HEV. 9: Contamination occurs between animals. 10: Contamination can also take place between humans through blood transfusion by quasi-enveloped HEV.

samples (Cook et al., 2016). The detection of the viral RNA only means that the virus is present but not necessarily that it is infectious (Gassilloud et al., 2003). In addition, no difference can be made between quasi-enveloped and non-enveloped HEV. Nevertheless, the molecular approach is useful in occurrence and epidemiological studies. There are pan-genotypic quantitative real-time PCR methods that allow the determination of whether a sample contains HEV genome or not (Jothikumar et al., 2006). For positive samples, a PCR followed by sequencing can then be performed in order to determine the virus genotype (Erker et al., 1999; Inoue et al., 2006; Takahashi et al., 2002).

Numerous studies have described the presence of HEV genome in untreated sewage over the last 15 years, especially in Europe (Table 1). Occurrences were very variable; indeed, they ranged from 0% to 93% (UK) and even 100% (India). But this has to be interpreted with caution since there is substantial variation between studies in terms of the volumes of samples, the methods used and the period of sampling. In Europe, the most prevalent HEV genotype seems to be G3, but sometimes G1 may also be present in wastewater. In other industrialized countries outside Europe, a lower number of studies have been published but G3 also seems to be the most frequent. Unsurprisingly, G1 is the most frequent in Asia, but G4 has been recently detected in China. Fewer analyses have been performed on treated than on untreated sewage, again mostly in Europe (Table 2). The samples are mainly negative for HEV genome and the determined genotypes are rare. To date, there have been

several works on HEV detection and phylogeny but there is a lack of information on HEV viral loads before and after treatments applied in wastewater treatment plants (WWTPs). Nevertheless, a study performed in India showed a slow decrease in the prevalence of HEV from 15.2% ($n=46$) to 10.8% ($n=46$) during wastewater treatment consisting of primary screening, aeration, agitation, primary-secondary clarification, anaerobic digestion and chlorination (Vaidya et al., 2002). This shows at least that some HEV particles may cross the wastewater treatment plant, but quantitative molecular methods should be applied to raw and treated wastewater in order to better assess virus particle removal.

Unsurprisingly, the study of four articles showed that the highest values of prevalence of HEV in surface water are lower than those described in sewage and do not exceed 20%. Nevertheless, values ranging from 0.6% (1/154) in 1 L (Gentry-Shields et al., 2015) to 17% (2/12) in 230–260 L (Rutjes et al., 2009) are reported. Genome concentrations of up to 10^4 genome copies/L have been reported in lake and river water in Italy; these two sites either were located in an urbanized area or had a history of enteric viral contamination (D'Ugo et al., 2016). A study conducted in the USA showed that in surface waters the occurrence and concentration of HEV increased significantly after manure application; the genotype could not be determined because of the shortness of the sequence and its location in a highly-conserved region. The authors suggested that runoff and tile input are important mechanisms of HEV transport to surface waters and that subsurface drainage and

Table 1
Various studies conducted around the world concerning HEV prevalence in untreated sewage water. NA: not applicable, ND: not done, ng: not given, gc: genome copies, y: year, m: month.

| Location | Volume analysed | Sampling period | Occurrence | Positive/Total | Genotype (n) | Viral load (gc/L) | Reference |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|------------|----------------|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Europe | | | | | | | |
| France | | 1 m | 25% | 1/4 | 3 (1) | ND | Clemente-Casares et al. (2003) |
| France | 1 L | 3 m | 22.2% | 4/18 | 3f (4) | 1×10^3 – 6.3×10^5 | Miura et al. (2016) |
| Greece | | 2 m | 0% | 0/5 | NA | ND | Clemente-Casares et al. (2003) |
| Greece | 100 mL | 1 y 9 m | 0% | 0/48 | NA | NA | Kokkinos et al. (2011) |
| Italy | 10 mL | 1 y | 16% | 19/118 | 1 (18), 3 (1) | ND | La Rosa et al. (2010) |
| Italy | 500 mL | 1 y | 4.76% | 1/21 | 3 (1) | ND | Iaconelli et al. (2015) |
| Norway | 40 mL | 1 y | 8% | 4/50 | Probable 3 (2) | ND | Myrmmel et al. (2015) |
| Portugal | 60 mL | 2 m | 6.7% | 2/30 | 3 (2) | ND | Matos et al. (2016) |
| Spain | 40 mL | 7 y 2 m | 43.5% | 20/46 | 3 (6) | ND | Clemente-Casares et al. (2003) |
| Spain | 42 mL | 7 y 2 m | 31.8% | 29/91 | 1 (1), 3 (14) | 3.2×10^4 | Rodriguez-Manzano et al. (2010) |
| Spain | 50 mL | 1 y 6 m | 13.5% | 5/37 | ND | ND | Rusiñol et al. (2015) |
| Sweden | | 2 m | 0% | 0/4 | NA | ND | Clemente-Casares et al. (2003) |
| Sweden | 5 L | 1 m | 33.3% | 1/3 | ND | 4.5×10^4 | Wang et al. (2018) |
| Switzerland | 500 mL | 1 y | 32.3% | 40/124 | 1 (1) | 7.8×10^4 | Masclaux et al. (2013) |
| Switzerland | 90 mL | 1 y | 24.1% | 15/62 | | | Masclaux et al. (2013) |
| UK | 20 mL | 9 m | 93% | 14/15 | 3 (14) | ND | Smith et al. (2016b) |
| North America | | | | | | | |
| USA | 40 mL | 1 m | 20% | 1/5 | 3 (1) | ND | Clemente-Casares et al. (2003) |
| South America | | | | | | | |
| Argentina | 1500 mL | 4 y | 6.3% | 3/48 | 3 (3) | ND | Martínez Wassaf et al. (2014) |
| Columbia | 2 L | 6 m | 30% | 3/10 | 3 (3) | ND | Baez et al. (2017) |
| | 50–1500 mL | 3 m | 0% | 0/10 | NA | NA | Baez et al. (2017) |
| | | 17 m | 20% | 2/10 | NA | NA | Baez et al. (2017) |
| Africa – Middle East | | | | | | | |
| Egypt | 4 L | 1 y 2 m | 0% | 0/76 | NA | NA | Kamel et al. (2011) |
| Egypt | 5 L | 5 m | 23.1% | 3/13 | ND | 6.9×10^2 | El-Senousy and Abou-Elela, (2017) |
| Israel | 1 L | 2 y | 8.3% | 14/169 | 3 (5) | ND | Ram et al. (2016) |
| Tunisia | 80 mL | ng | 0% | 0/24 | NA | NA | Hmaied et al. (2015) |
| Asia | | | | | | | |
| India | 500 mL | 3 m | 100% | 9/9 | ND | ND | Jothikumar et al. (1993) |
| China | 10 mL | 3 m | 1.3% | 2/152 | 4 (2) | ND | Li et al. (2017) |
| India | 200 µL–10 mL | 1 y | 11% | 9/82 | 1a (10) | ND | Vaidya et al. (2002) |
| India | 32 mL | 2 y | 41% | 79/192 | 1 (6) | ND | Ippagunta et al. (2007) |
| Japan | 50 mL | 1 y 6 m | 1.6% | 1/62 | 3 (1) | ND | Ishida et al. (2012) |
| Japan | 50 mL | 11 m | 11% | 3/28 | ND | 1.7×10^5 – 1.8×10^6 | Kobayashi et al. (2017) |

Table 2
Various studies conducted around the world concerning HEV prevalence in treated sewage water. NA: not applicable, ND: not done y: year, m: month.

| Location | Volume analysed | Sample period | Occurrence | Positive/Total | Genotype (n) | Viral load | Reference |
|---------------|---------------------|---------------|------------|----------------|--------------|------------|-------------------------|
| Europe | | | | | | | |
| Italy | 500 mL | 1 y | 0% | 0/21 | NA | NA | Iaconelli et al. (2015) |
| Italy | 500 mL | 1 y | 0% | 0/21 | NA | NA | Iaconelli et al. (2017) |
| Norway | 40 mL | 1 y | 8% | 4/50 | 1 (1) 3 (1) | ND | Myrmmel et al. (2015) |
| Portugal | Not specified | 4 m | 0% | 0/60 | NA | NA | Matos et al. (2016) |
| Spain | 50 mL (pre-treated) | 1 y 6 m | 12.5% | 4/32 | ND | ND | Rusiñol et al. (2015) |
| Spain | 10 L | 1 y 6 m | 0% | 0/22 | NA | NA | Rusiñol et al. (2015) |
| Switzerland | 500 mL | 1 y | 0% | 0/25 | NA | NA | Masclaux et al. (2013) |
| Africa | | | | | | | |
| Egypt | 2 L | 1 y 2 m | 0% | 0/38 | NA | NA | Kamel et al. (2011) |
| Asia | | | | | | | |
| India | 10 mL–200 µL | 1 y | 10.88% | 5/46 | 1a | ND | Vaidya et al. (2002) |
| Japan | 200–500 mL | 1 y 6 m | 0% | 0/53 | NA | NA | Ishida et al. (2012) |

overland flow contribute to the transport of HEV to adjacent waters (Givens et al., 2016). In poor countries, humans defecate in backyards and open fields, the rain then washes away these faecally contaminated areas into other waterways, a phenomenon which can contaminate crops, waterways, groundwater and open waterways (Khuroo et al., 2016); the same phenomenon of HEV being transported by water could be hypothesized with G3 and G4 in

developed countries with animal faeces and manure or bypass of untreated water in a wastewater treatment plant. As a result, HEV has the potential to contaminate surface waters used for drinking water production and recreational purposes. Thus, surface waters could be a source of contamination for animals, shellfish and humans.

Bivalve molluscan shellfish (BMS) are known transmitters of

enteric viruses, in particular norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) (Bellou et al., 2013); an ISO method has been proposed for genome quantification of NoV and HAV in various foodstuffs including BMS (NF EN ISO 15216 2017). Studies have been led on different BMS in Europe and Asia with various results (Table 3), and again G3 is the most represented in Europe, whereas G3 and G4 are found in Asia. Elsewhere, as mentioned above, water can contaminate food products by irrigation of crops (Khuroo et al., 2016): studies led in Canada and various countries in Europe have found HEV on field-grown strawberries, vegetables, frozen raspberries and salad (Brassard et al., 2012; Kokkinos et al., 2012; Maunula et al., 2013; Terio et al., 2017).

To conclude on this part, it appears that HEV particles may be found at each stage of the water cycle even if their infectivity cannot be confirmed by molecular methods. They may be found in large numbers in rivers in some cases resulting in a direct contamination risk for animals or indirect risk for humans through irrigation of crops, contamination of resources for drinking water production and in BMS producing areas. To our knowledge, the minimal HEV infectious dose is still unknown but by analogy with NoV (Hall, 2012) and HAV (Sánchez, 2013), we can assume that 10 to 50 viral particles can be enough to make people ill and lead to an outbreak. To know if this HEV can really infect hosts and in what proportion, we need to assess its capacity to remain infectious in water, that is its survival.

5. HEV survival in water

Under natural conditions, temperature and sunlight (UV) are the two main factors that may inactivate HEV in water. During drinking

water treatment, the physical treatment allows the removal of the viral particle, whereas the disinfection process mainly based on chlorine impacts virus survival.

5.1. Method used to evaluate survival

The reference method to evaluate viral infectivity is *in vitro* cell culture or assays which can be performed *in vivo*. The use of the term “inactivation” for a virus means that the infectivity has been assayed by a cell culture method. Many enteric viruses can be cultivated on cells but some are difficult to cultivate, and HEV is one of them. That being said, some culture systems have been found. A G3 strain, JE03-1760F, and a G4 strain, HEV-JF5/15F, originating from human stool samples have been cultivated on PLC/PRF/5 cells (human hepatic carcinoma) and A549 cells (human lung cancer). The G4 strain originated from a patient with a fulminant hepatitis. This strain was propagated and passed more effectively than the G3 one (Tanaka et al., 2009). Moreover, HepG2 and Huh7 cells (human hepatic carcinoma) are not permissive for JE03-1760F and HEV-JF5/15F strains originating from the stool samples but can support propagation and passages of the cell culture-adapted JE03-1760F and HEV-JF5/15F strains (Okamoto, 2013). G1, G3 and G4 strains originating from blood samples can also be cultivated on PLC/PRF/5 and A549 cells (Okamoto, 2013). A G3 strain, Kernow-C1, isolated from a chronically infected patient's stool could effectively infect numerous cell lines from humans (hepatic carcinoma: HepG2/C3A and HUH7.5, hepatoma: PLC/PRF/5, lung carcinoma: A549 and colorectal adenocarcinoma: Caco-2), pigs (kidney: LLC-PK1, LLC-PK1A and SK-RST) and deer (liver: OHH1.Li). After being passed six times on HepG2/C3A cells, the Kernow-C1 strain was able to grow

Table 3

Various studies conducted around the world concerning HEV prevalence in bivalve molluscan shellfish. NA: not applicable, ND: not done; PDU: PCR detectable units, ng: not given, gc: genome copies, y: year, m: month.

| Location | Sample period | Animal | Occurrence | Positive/Total | Genotype (n) | Viral load | Reference |
|---------------------------------|---------------|-------------------------|----------------|----------------|--------------|---|-----------------------------|
| Europe | | | | | | | |
| Finland (imported from Denmark) | 8 m | Mussels | 6% | 3/51 | ND | 1.3×10^2 - 3.5×10^2 PDU/g | Diez-Valcarce et al. (2012) |
| France | 2 y | Cockles | 0% | 0/49 | NA | NA | Grodzki et al. (2014) |
| France | 2 y | Oysters | 0% | 0/66 | NA | NA | Grodzki et al. (2014) |
| France | 2 y | Clams | 0% | 0/65 | NA | NA | Grodzki et al. (2014) |
| France | 2 y 6 m | Mussels | 0% | 0/94 | NA | NA | Grodzki et al. (2014) |
| Italy | Punctual | Mussels | 8.1% | 3/37 | 1 | ND | Donia et al. (2012) |
| Italy | ng | Mussels | 2.7% | 8/298 | 3 (2) | 3×10^1 - 9×10^1 gc/g of digestive tissue | La Rosa et al. (2018) |
| Italy | ng | Razor clams | 4.9% | 2/41 | | | La Rosa et al. (2018) |
| Italy | ng | Mussels | 0% | 0/9 | NA | NA | La Rosa et al. (2012) |
| Italy | ng | Clams | 0% | 0/2 | NA | NA | La Rosa et al. (2012) |
| Italy | 2 y 7 m | Mussels | 0% | 0/50 | NA | NA | Iaconelli et al. (2015) |
| Italy | 2 y 7 m | Clams | 0% | 0/6 | NA | NA | Iaconelli et al. (2015) |
| Italy | 2 y | Mussels | 0% | 0/108 | NA | NA | Fusco et al. (2017) |
| Scotland | ng | Mussels | 85.4% | 41/48 | 3 (11) | 5.4×10^3 - 1.6×10^5 IU/mL | Crossan et al. (2012) |
| Scotland | ng | Mussels | 3.0% | 8/270 | 3 (3) | 62.4 IU/mL (1 sample) | O'Hara et al. (2018) |
| Scotland | ng | Oysters | 2.5% | 1/40 | ND | | O'Hara et al. (2018) |
| Spain | 8 m | Mussels | 0% | 0/51 | NA | NA | Diez-Valcarce et al. (2012) |
| Spain | 18 m | Mussels | 14.8% batches | 12 batches/81 | 3e (6) | 6.7×10^1 to 8.6×10^4 gc/g of digestive tissue | Mesquita et al. (2016) |
| Asia | | | | | | | |
| China | 1 y 10 m | <i>A. granosa</i> | 14.3%/kg | Ng | 4 (ng) | ND | Gao et al. (2015) |
| China | 1 y 10 m | <i>S. subcrenata</i> | 28.2%/kg | Ng | | ND | Gao et al. (2015) |
| China | 1 y 10 m | <i>R. philippinarum</i> | 11.5%/kg | Ng | | ND | Gao et al. (2015) |
| Japan | 4 m | Yamato-Shijimi | 6.25% packages | 2 packages/32 | 3 (ng) | ND | Li et al. (2007) |
| Korea | ng | Oysters | 8.7% | 14/161 | 3a (14) | ND | Song et al. (2010b) |
| Thailand | 2 y | Cockles | 0% | 0/69 | NA | NA | Namsai et al. (2011) |
| Thailand | 2 y | Oysters | 0% | 0/52 | NA | NA | Namsai et al. (2011) |
| Thailand | 2 y | Mussels | 0% | 0/92 | NA | NA | Namsai et al. (2011) |

more effectively in these cells (Shukla et al., 2011). Among these cell lines, LLC-PK1 seems to be the most permissible to Kernow C1 and Kernow C1/p6 infections (Shukla et al., 2011). Another strain has been described by other authors: LBPR-0379 strain, isolated from a chronically infected patient (G3), has a growth advantage in cell culture (HepG2/C3A cells) (Nguyen et al., 2012). Recently, a three-dimensional culture system has been developed for HEV; it seems to be a promising system that needs to be improved (Berto et al., 2013). However, the drawback of all these culture methods is that they are time consuming and difficult to apply. Another method has been developed by some authors in order to overcome the problems of culture and RT-PCR; it consists in a pre-treatment of the sample with an RNase, prior to RNA extraction. Free RNA (damaged viruses) will be destroyed by the RNase and only encapsidated RNA will be taken into account. This method has been used on HEV in order to study its resistance to some temperatures (Schielke et al., 2011).

Another approach has been developed: the use of intercalating dyes such as propidium monoazide (PMA) and ethidium monoazide (EMA). This strategy allows the assessment of capsid integrity. These molecules will enter the cell if the membrane integrity is disrupted, covalently bind to DNA and inhibit PCR (Girones et al., 2010). Some authors have tested this approach on bacteria and recently others have attempted to develop it on RNA viruses (Leifels et al., 2015; Parshionikar et al., 2010) with various results. This method is not relevant if the virus is inactivated with a preserved capsid and the secondary RNA structure seems to interfere with the binding of the intercalating agent (Parshionikar et al., 2010). The results can also vary according to which virus is studied and which region of its genome is targeted by PCR (Leifels et al., 2015).

In order to properly draw conclusions with cell culture work, it is useful to know if we are working with non-enveloped or quasi-enveloped HEV. It seems that when working with liver cells such as Huh-7, PLC/PRF/5 and HepG2 or lung cells such as A549, the produced virions are predominantly quasi-enveloped. If the virus is then treated with a bile salt (e.g. deoxycholic acid) and a protease (e.g. trypsin), it can lose its envelope (Okamoto, 2013; Takahashi et al., 2010; Yin et al., 2016b, 2016a).

5.2. Thermal inactivation

A review has summarized all tested methods of inactivation for HEV in food matrices (Cook and van der Poel, 2015). As a consequence, it focused on high temperatures used for food treatment or cooking which do not match environmental conditions. Nevertheless, some interesting data were described.

First, even if in the review no discussion was made about enveloped and non-enveloped virus we can extract some data concerning the survival of non-enveloped HEV, since stool-extracted strains were studied. Moreover, some of these data could be compared with those reported in a review focussing on the impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water (Bertrand et al., 2012). In the latter review, the authors determined the TFL value of each enteric virus, which was defined as the time needed (in days) to observe the first \log_{10} reduction. The TFL values of the different enteric viruses were compared as a function of the temperature range ($<50^\circ\text{C}$ or $\geq 50^\circ\text{C}$), of the matrix type (simple or complex) and the detection method (cell culture or PCR). The $\log_{10}\text{TFL}$ was then used. A few studies described in Cook's review allow us to calculate some TFL values. Thus, a one log reduction was observed for HEV G1 strain in stool suspension after exposure to 56°C for 15 min (Emerson et al., 2005). This means that the TFL value reached 0.01 day under these conditions, which is close to the TFL values observed for highly resistant enteric viruses such as PhiX174 phage and F-specific RNA

phages of genogroup I. This also suggests that HEV could be more resistant than HAV under these particular conditions, but there is a huge difference in the number of data between these two hepatitis viruses with 38 data for HAV (Bertrand et al., 2012) and only one for HEV. From another study (Yunoki et al., 2008), the TFL of HEV at 60°C could be estimated at 0.02 day in a 25% albumin solution and 0.007 day in phosphate-buffered saline. In both cases, the comparison with data from the review (Bertrand et al., 2012) suggests that HEV has a resistance close to that observed for F-specific RNA phages and higher than that observed for HAV. When HEV was subjected to dry heating, the TFL seemed to be of 0.4 day at 60°C and of 0.16 day at 80°C , which is much higher than under the previous heat conditions (Yunoki et al., 2008).

Johne et al. (2016) have evaluated the impact of high temperatures in the range of 60°C – 80°C on quasi-enveloped HEV in suspension in cell culture medium. The TFL value reached 2.3×10^{-4} day (20 s) at 70°C . These authors worked with quasi-enveloped HEV particles; we can thus attempt a comparison with an enveloped virus. We have chosen hepatitis C virus (HCV) which is a well-documented enveloped virus; like HEV, its genome consists of a positive polarity single strand RNA. HCV in cell culture medium at a concentration of 2.5×10^3 FFU (Focus Forming Unit) had a TFL of about 6×10^{-4} day (40 seconds) at 65°C (Song et al., 2010a). Thus, the resistance of quasi-enveloped HEV might be close to that observed for HCV at high temperatures. In the study by Schielke et al. (2011), the authors assayed the effect of short-term heating on RNase-protected HEV G3 particles. A reduction of 74% was observed after incubation at 56°C for 15 min and reduction rates above 99% (-2.16 to $-4.42 \log_{10}$) were observed after incubation at 56°C for 30 min or 60 min and at 60°C for 15 min, 30 min or 60 min. As these authors worked on a liver suspension, we can infer that they mostly worked on quasi-enveloped HEV; we can thus attempt a comparison with HCV as above. When in human serum, a $3.6 \log_{10}$ inactivation was observed at 56°C for 30 min (Song et al., 2010a). Caution is required when comparing these data since the assays were performed using a PCR-derived technique for the detection of RNase-protected HEV (Schielke et al., 2011) and by cell culture for HCV (Song et al., 2010a). Johne et al. (2016) and Schielke et al. (2011) also worked at low temperatures (i.e. $\leq 37^\circ\text{C}$) more frequently encountered under environmental conditions. TFL values could be calculated from the results of Johne et al. (2016). A TFL of about 3 days at 22°C and about 2 days at 37°C in cell culture medium could be determined. If, again, we compare that to HCV, the TFL is of about 5 days at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and about 9 h at 37°C (Song et al., 2010a). This would make quasi-enveloped HEV less resistant than HCV at room temperature and more resistant at 37°C , but these results need confirmation from other studies.

Second, the thermal resistance of HEV may depend on the virus strain as Emerson et al. (2005) suggested while working with two G1 strains and one G2 strain. Third, the culture-based detection method directly or indirectly provides highly variable results, and sometimes only qualitative results.

The resistance of HEV to heat might depend on the genotype and on the origin of the virus, which makes it either quasi-enveloped or non-enveloped. All in all, on average, HEV seems about as resistant as F-specific RNA phages for non-enveloped HEV or HCV for quasi-enveloped HEV. However, other studies would be needed with, as much as possible, harmonized temperatures, durations, virus forms, matrices and measurement methods.

5.3. UV inactivation

A recent study has compared the impact of UV radiation on HEV G3 and MS2 phage in terms of loss of infectivity and degradation of the genome (Guerrero-Latorre et al., 2016). The inactivation of HEV

was estimated by cell culture combined with immunofluorescence. A viral suspension of 5.93×10^2 FFU/mL was first irradiated with fluences of 10, 20, 40, 80, 100 and 140 mJ/cm². Since a fluence of only 10 mJ/cm² was sufficient to inactivate HEV, a second experiment was performed with a viral suspension of 5.58×10^3 FFU/mL by using fluences of 0, 2, 5, 7 and 10 mJ/cm². A regression curve was then constructed to predict fluences needed for viral inactivation; it allowed the authors to determine that a fluence of 23.19 mJ/cm² was needed for a 4 log₁₀ (99.99%) inactivation. The viral suspensions were coming from culture; it can thus be assumed that the inactivation of HEV by UV was determined for quasi-enveloped HEV. A review paper has compared the UV radiation values needed to inactivate enteric pathogenic viruses such as poliovirus (n = 6), HAV (n = 3), coxsackievirus (n = 2) and adenovirus (n = 7), and bacteriophages such as MS2 (n = 5) and Q β (n = 1) F-specific RNA phages, and PhiX174 (n = 4) phages (Hijnen et al., 2006). The inactivation rate constants named k-values were determined for each virus; the higher it is, the more sensitive to UV the microorganism is. The lowest k-values were obtained for adenovirus and MS2 phage. The k-value of MS2 phage reached 0.08 in the experiments performed by Guerrero Latorre et al. (2016) and was in accordance with the review by Hijnen et al. (2006). For quasi-enveloped HEV, a k-value of 0.153 could be calculated; it was close to that of HAV, which was the least resistant of the viruses compared in the review published by Hijnen et al. (2006). For experiments performed with poliovirus and F-specific RNA phages it has been shown that inactivation by UV is correlated with genome size; the longer the genome is, the more sensitive it is to UV (Simonet and Gantzer, 2006). We should notice that HAV and HEV have about the same genome length with 7.5 and 7.2×10^3 nucleotides, respectively. Moreover, Simonet and Gantzer (2006) have also shown that genome degradation could explain UV-induced viral inactivation.

To summarize, quasi-enveloped HEV virus has a resistance to UV similar to that of other enteric viruses such as HAV, but lower than that of MS2 phage. However, other experiments would be needed in order to test non-enveloped HEV, which would be more representative of particles that can be found in environmental waters; other studies on other genotypes also need to be conducted because, as with thermal inactivation, virus behaviour might vary from one genotype to another.

5.4. Chlorine inactivation

In a study reported by Cook and van der Poel (2015), HEV treated with sodium hypochlorite was inoculated into a culture of PLC/PRF/5 cells: no cytopathic effect was observed but replication could be inferred from detection of HEV RNA. However, HEV seems to be chlorine sensitive; indeed, in the same study it was reported that in cultures inoculated with untreated HEV RNA was detectable up to day 33, whereas it was detectable only for 7 days with treated HEV (results not shown). Another study, led by Girones et al. (2014), compared chlorine resistance of HEV G1 to that of Human Adenovirus 2 (HAdV2). In that study, HEV G1, originating both from culture and faeces, was treated with sodium hypochlorite at 1000 ppm; a first phase with an initial decline in infectious units of approximately 2 log was reported, followed by a phase of further decline of less than 1 log and a still detectable RNA and infectious viruses at 30 min. HAdV2 was more resistant to chlorination than HEV: CT (concentration \times time) values of 0.15 mg/L \times min for quasi-enveloped HEV and 0.12 mg/L \times min for non-enveloped HEV for 1-log reduction for HEV and 1.15 mg/L \times min for 1-log reduction for HAdV2. The authors then compared chlorine activity on HEV with and without sewage in the water: CT values needed for a 2-log reduction of HEV infectivity was 20 times higher with 1% sewage

in the water, compared to without sewage. We can attempt a comparison with HAV: Sobsey et al. (1988) have studied the resistance of HAV to chlorination. From their data, the CT value needed for 1-log reduction was estimated to be about 0.85 mg/L \times min at 5 °C and pH 6 and about 1 mg/mL \times min at 5 °C and pH 8. In their study on HEV, Girones et al. (2014) do not specify the pH and temperature conditions under which they performed their experiments so the comparison with HAV is not easy but if we suppose that the conditions were close to those of Sobsey et al., then we can conclude that HEV is more sensitive to chlorination than HAV.

HEV thus seems to be quite sensitive to chlorination, as it is more susceptible than HAdV2 and HAV. However, this needs to be confirmed by further studies carried out with more harmonized conditions (temperature, pH) and different types of HEV in different types of environment (e.g., “clean” water, sewage-containing water, etc.).

All in all, it seems that HEV does not exhibit a particularly high level of resistance to the main inactivating factors for viruses in water (i.e. heat, UV and chlorine) compared to classical models of enteric viruses, namely MS2 phage or F-specific RNA phages, or to other pathogenic enteric viruses such as HAV. The classical multi-barrier treatments to prevent enteric virus transmission to humans should thus be effective for HEV. The question is still under discussion for animals. In order to expand our knowledge of HEV resistance to treatments, a method to assess rapidly and with high sensitivity and specificity the quantity of infectious viruses would be needed and, as much as possible, standardized studies need to be conducted. Harmonizing temperature or chlorine concentration is difficult to achieve but some efforts can be made on the duration of study or on the UV wavelength and fluence.

6. Physical removal in the environment and water treatment

The behaviour of virus particles in the environment depends mainly on their size and on their surface properties, including their electrostatic charge and hydrophobicity.

The size of HEV is similar to that of most other pathogenic enteric viruses such as HAV (27–33 nm) or NoV (27 nm) and phages used as models such as F-specific RNA (20–30 nm) (Hartard et al., 2016; Kapikian et al., 1972; Kuzmanovic et al., 2003; Rumnieks and Tars, 2017; Yokosuka, 2000).

It is known that the virus charge depends on its isoelectric point (abbreviations: pI or IEP) and on the pH of the medium. A negative charge is observed if the pH is above the pI and, conversely, a positive charge is observed when the pH is below the pI (Gerba, 1984). To date, nothing is known about the pI of HEV, even less so about its charge under environmental conditions. Defining total charge is far from an easy task because viruses are soft particles for which the genome may have an impact on the surface charge (Dika et al., 2011; Langlet et al., 2008a). The variability of HEV may also impact its pI and charge. Indeed, as there are different genotypes and subgenotypes, a quasispecies distribution, quasi-enveloped and non-enveloped forms, the virus can be found under different forms within environment waters. This can have an impact on its hydrophobicity and charge, and thus on its behaviour. Charge greatly influences virus behaviour (Bhattacharjee et al., 2002); thus, high negative charge or low pI leads to low adhesion/aggregation capacity. In a review written in 2010, a summary of the isoelectric points of various viruses was constructed. From this summary it was concluded that the pI is essential but not sufficient to predict adhesion (Michen and Graule, 2010). In fact, hydrophobicity has also proved to be highly important in the adhesion/aggregation process and may be of great importance in water treatment processes for example (Boudaud et al., 2012). Hydrophobic interactions are short distance interactions which may take place when the

electrostatic charge of viral particles is low because of the virus type, the medium pH close to the pI or a high ionic strength leading to ions neutralizing the particle charge (Dika et al., 2015; Langlet et al., 2008b). Hydrophobicity of the different amino acids can also have an impact on surface adhesion, as shown for NoV (Samandoulgou et al., 2015). Changes in physico-chemical conditions, e.g. ionic strength or temperature, can affect the secondary or tertiary structure and change which amino acids are exposed on the surface, thus modifying hydrophobicity and adhesion to hydrophobic surfaces. As discussed before, HEV can exist under non-enveloped or quasi-enveloped forms; the presence of the quasi-envelope means that there are lipids, which should make the virus more hydrophobic, thus modifying its physico-chemical characteristics, and therefore its behaviour. Again, very little is known about HEV hydrophobicity. To begin addressing the question of the impact of hydrophobicity, we compared ORF2 sequences between the different HEV genotypes using the AnTheProt software. As already stated in the second paragraph and as shown in Fig. 2, subgenotypes 3 showed a large number of differences in their hydrophobicity profiles between residues 68 and 100. The hydrophobicity profiles obtained for G3f and G3h were compared, which showed major differences. For subgenotypes 4, differences in their hydrophobicity profiles were observed between residues 67 and 74, and residues 95 and 100 (data not shown).

To conclude on this part, HEV is about the same size as many pathogenic enteric viruses and bacteriophages, from which we could infer some behavioural data. However, its charge, hydrophobicity and adhesion are still unknown and, given its high variability (intergenotype, intragenotype, quasispecies and different forms), these criteria could vary, which could impact the virus behaviour and transmission.

7. How may we include the variability of HEV in future studies concerning water?

In the future, the investigation into HEV variability concerning water will be facilitated by a number of increasingly sensitive molecular methods, designed to analyse viral genomic plasticity. These methods could prove useful for the study of the sequences of different HEV isolates, coming from different types of samples, in order to better understand the virus circulation. Concentration and extraction methods are difficult to implement: charge, size and hydrophobicity of the virus are variable.

So far, it has been possible to use direct sequencing (Sanger sequencing) to sequence a variable part of the genome and then to study phylogenetic links based on the results, and to determine the genotype and sometimes the subgenotype (Xia et al., 2015). That method only shows the main HEV population, but allows for the direct comparison between the sequences of different samples.

When it comes to quasispecies study, cloning-sequencing or Ultra-Deep sequencing (UDS) can be used. Cloning-sequencing is considered to be a reference method in the exploration of viral quasispecies, but this method has drawbacks: it is time consuming, expensive and the number of clones that are studied limits its sensitivity (Ramírez et al., 2013). In the best-case scenario, about 100 clones can be sequenced, which poorly represents a population of millions (or even more) of viral particles. UDS method allows the production of millions of sequences within one run, and is less expensive than previous methods. Many different UDS techniques have been developed such as Illumina (sequencing using synthesis), Ion Torrent or pyrosequencing. Each one of them has its own advantages and drawbacks and the choice of technique used will depend on the local equipment, personal experience and the type of microorganism being studied (Quail et al., 2012).

The outputs from the Sanger sequencing and UDS should be

analysed by informatics tools. Analyses can be done on the resulting data, keeping in mind the pros and cons of each sequencing technique. These different techniques can be used together and compared. According to the data, comparisons can be made between the sequences of different samples and between the different subpopulations within one sample. The diversity and complexity can be calculated between different subpopulations (Lhomme et al., 2012).

Various protein properties such as the antigenicity profile can be predicted through use of the AnTheProt software as discussed above (Parker et al., 1986). This approach has also been used in some studies and helps the determination of whether or not an amino acid substitution has consequences on the function of the protein (Schvoerer et al., 2013). It can help the determination of viral behaviour and give information on the transmission (which can be completed by analysis of different sample types such as human or animal samples).

However, there is a need for a method that would allow the concentration of HEV. As many of the virus characteristics vary, it would be complicated to use a method based on viral size, charge or hydrophobicity. As long as many of HEV characteristics remain unknown or poorly known, methods to study the virus will be difficult to implement.

8. Conclusion

The transmission and persistence of HEV in the environment are still poorly understood. As explained in the present review, HEV seems to be quite resistant to high temperatures in its non-enveloped form and as resistant as HCV in its quasi-enveloped form. We point out that the few studies performed on UV treatment suggest that HEV has the same susceptibility as HAV, which is a UV-sensitive virus compared to MS2 phage, and that HEV is sensitive to chlorination. The classical treatments and surveillance methods to fight against enteric viruses should be effective against HEV.

We are dealing with a highly variable virus: there are different genotypes and subgenotypes, a quasispecies distribution and quasi-enveloped and non-enveloped forms. Different particles can thus be found in environmental waters depending on the geographic location or the origin and type of pollution. This can have an impact on the virus quantity, hydrophobicity, charge and infectivity, and therefore on its behaviour and resistance to treatments. Virus culture from water samples would be informative but currently seems rather ambitious. More information is also needed concerning HEV surface properties (isoelectric point, hydrophobicity) to better predict its behaviour in the environment and develop optimized concentration techniques in order to study it. This knowledge will help sanitary authorities to monitor the circulation of HEV and to develop measures to prevent human contamination.

Declaration of interest

None.

Funding

No sponsors were involved in the writing of this review; all authors' salaries were supported by either Lorraine University, France, or the University Hospital of Nancy, France.

Acknowledgements

We are indebted to Celine Merlin and Carina O'Brien for their re-reading of the manuscript.

References

- Abraham, F., Lhomme, S., El Costa, H., Schwartz, B., Peron, J.M., Kamar, N., Izopet, J., 2017. Rabbit hepatitis E virus infections in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1191–1193.
- Amanya, G., Kizito, S., Nabukenya, I., Kalyango, J., Atuheire, C., Nansumba, H., Abwoye, S.A., Opio, D.N., Kibuuka, E., Karamagi, C., 2017. Risk factors, person, place and time characteristics associated with Hepatitis E Virus outbreak in Napak District, Uganda. *BMC Infect. Dis.* 17, 451.
- Baez, P.A., Lopez, M.C., Duque-Jaramillo, A., Pelaez, D., Molina, F., Navas, M.-C., 2017. First evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PLoS One* 12, e0177525.
- Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. *Food Environ. Virol.* 5, 13–23.
- Berto, A., Van der Poel, W.H.M., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., La Ragione, R.M., Inglesse, N., Collins, J., Grierson, S., John, R., Rietz, J., et al., 2013. Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *J. Virol. Methods* 187, 327–332.
- Bertrand, I., Schijven, J.F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A.M., et al., 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1059–1074.
- Bhattacharjee, S., Ryan, J.N., Elimelech, M., 2002. Virus transport in physically and geochemically heterogeneous subsurface porous media. *J. Contam. Hydrol.* 57, 161–187.
- Bisseux, M., Colombet, J., Mirand, A., Roque-Afonso, A.-M., Abravanel, F., Izopet, J., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Debroas, D., Bailly, J.-L., et al., 2018. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 23.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Res.* 46, 2651–2664.
- Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M.M.P.T., Widdowson, M.A., Worm, H.C., Koopmans, M.P.G., Frankena, K., de Roda Husman, A.M., De Jong, M.C.M., Van Der Poel, W.H.M., 2008. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 136, 567–576.
- Brassard, J., Gagné, M.-J., Gagné, M., Côté, C., 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3763–3766.
- Chapuy-Regaud, S., Dubois, M., Plisson-Chastang, C., Bonnefois, T., Lhomme, S., Bertrand-Michel, J., You, B., Simoneau, S., Gleizes, P.-E., Flan, B., et al., 2017. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141, 70–79.
- Chen, Y.J., Cao, N.X., Xie, R.H., Ding, C.X., Chen, E.F., Zhu, H.P., Sun, J.M., Shang, X.P., Wang, X.X., Miao, Z.P., 2016. Epidemiological investigation of a tap water-mediated hepatitis E virus genotype 4 outbreak in Zhejiang Province, China. *Epidemiol. Infect.* 1–13.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 448–454.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R., 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202, 825–834.
- Cook, N., van der Poel, W.H.M., 2015. Survival and elimination of hepatitis E virus: a review. *Food Environ. Virol.* 7, 189–194.
- Cook, N., Knight, A., Richards, G.P., 2016. Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: a critical review. *J. Food Protect.* 79, 1273–1294.
- Crossan, C., Baker, P.J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H.R., Scobie, L., 2012. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Inf. Disp.* 18, 2085–2087.
- Dalton, H.R., Izopet, J., 2018. Transmission and epidemiology of hepatitis E virus genotype 3 and 4 infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*
- Diez-Valcarce, M., Kokkinos, P., Söderberg, K., Bouwknegt, M., Willems, K., de Roda-Husman, A.M., von Bonsdorff, C.-H., Bellou, M., Hernández, M., Maunula, L., et al., 2012. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ. Virol.* 4, 73–80.
- Dika, C., Duval, J.F.L., Ly-Chatain, H.M., Merlin, C., Gantzer, C., 2011. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4939–4948.
- Dika, C., Duval, J.F.L., Francius, G., Perrin, A., Gantzer, C., 2015. Isoelectric point is an inadequate descriptor of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages adhesion on abiotic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 446, 327–334.
- Donia, D., Dell'Amico, M.C., Petrinca, A.R., Martinucci, I., Mazzei, M., Tolari, F., Divizia, M., 2012. Presence of hepatitis E RNA in mussels used as bio-monitors of viral marine pollution. *J. Virol. Methods* 186, 198–202.
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Larovoi, P., Robertson, B.H., Margolis, H.S., 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184, 1594–1597.
- D'Ugo, E., Marcheggiani, S., Fioramonti, I., Giuseppetti, R., Spurio, R., Helmi, K., Guillebault, D., Medlin, L.K., Simeonovski, I., Boots, B., et al., 2016. Detection of human enteric viruses in freshwater from European countries. *Food Environ. Virol.* 8, 206–214.
- Echevarría, J.M., González, J.E., Lewis-Ximenez, L.L., Dos Santos, D.R.L., Munné, M.S., Pinto, M.A., Pujol, F.H., Rodríguez-Lay, L.A., 2013. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J. Med. Virol.* 85, 1037–1045.
- El-Senousy, W.M., Abou-Elela, S.I., 2017. Assessment and evaluation of an integrated hybrid anaerobic-aerobic sewage treatment system for the removal of enteric viruses. *Food Environ. Virol.* 9, 287–303.
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 192, 930–933.
- Erker, J.C., Desai, S.M., Mushahwar, I.K., 1999. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods* 81, 109–113.
- Farci, P., Bukh, J., Purcell, R.H., 1997. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin. Immunopathol.* 19, 5–26.
- Fusco, G., Di Bartolo, I., Cioffi, B., Ianiro, G., Palermo, P., Monini, M., Amoroso, M.G., 2017. Prevalence of foodborne viruses in mussels in southern Italy. *Food Environ. Virol.* 9, 187–194.
- Gao, S., Li, D., Zha, E., Zhou, T., Wang, S., Yue, X., 2015. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 12, 2026–2036.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3965–3969.
- Geng, Y., Zhao, C., Song, A., Wang, J., Zhang, X., Harrison, T.J., Zhou, Y., Wang, W., Wang, Y., 2011. The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 476–482.
- Gentry-Shields, J., Myers, K., Pisanic, N., Heaney, C., Stewart, J., 2015. Hepatitis E virus and coliphages in waters proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Sci. Total Environ.* 505, 487–493.
- Gerba, C.P., 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* 30, 133–168.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. de A., Hundesa, A., Carratalá, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44, 4325–4339.
- Girones, R., Carratalá, A., Calgua, B., Calvo, M., Rodríguez-Manzano, J., Emerson, S., 2014. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *J. Water Health* 12, 436–442.
- Givens, C.E., Kolpin, D.W., Borchardt, M.A., Duris, J.W., Moorman, T.B., Spencer, S.K., 2016. Detection of hepatitis E virus and other livestock-related pathogens in Iowa streams. *Sci. Total Environ.* 566–567, 1042–1051.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 80, 5919–5926.
- Grodzki, M., Schaeffer, J., Piquet, J.-C., Le Saux, J.-C., Chevê, J., Ollivier, J., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., 2014. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4269–4276.
- Guerrero-Latorre, L., Gonzales-Gustavson, E., Hundesa, A., Sommer, R., Rosina, G., 2016. UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219, 405–411.
- Hakim, M.S., Wang, W., Bramer, W.M., Geng, J., Huang, F., de Man, R.A., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2017. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 37, 19–31.
- Hall, A.J., 2012. Noroviruses: the perfect human pathogens? *J. Infect. Dis.* 205, 1622–1624.
- Haque, F., Banu, S.S., Ara, K., Chowdhury, I.A., Chowdhury, S.A., Kamili, S., Rahman, M., Luby, S.P., 2015. An outbreak of hepatitis E in an urban area of Bangladesh. *J. Viral Hepat.* 22, 948–956.
- Hartard, C., Banas, S., Loutreuil, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Relevance of F-specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5709–5719.
- Hijnen, W. a. M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 40, 3–22.
- Hmaied, F., Keskes, S., Jebri, S., Amri, I., Yahya, M., Loisy-Hamon, F., Lebeau, B., Hamdi, M., 2015. Removal of rotavirus and bacteriophages by membrane bioreactor technology from sewage. *Curr. Microbiol.* 71, 540–545.
- Hofmeister, M.G., Foster, M.A., Teshale, E.H., 2018. Epidemiology and transmission of hepatitis A virus and hepatitis E virus infections in the United States. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*
- Hunter, J.G., Madden, R.G., Stone, A.M., Osborne, N., Wheeler, B., Vine, L., Dickson, A., Barlow, M., Lewis, J., Bendall, R.P., et al., 2016. Coastal clustering of HEV; Cornwall, UK. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 323–327.
- Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Fratini, M., et al., 2015. Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in bivalve Molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* 7, 316–324.
- Iaconelli, M., Muscillo, M., Della Libera, S., Fratini, M., Meucci, L., De Gaglia, M., Giacosa, D., La Rosa, G., 2017. One-year surveillance of human enteric viruses in raw and treated wastewaters, downstream river waters, and drinking waters. *Food Environ. Virol.* 9, 79–88.

- Inoue, J., Takahashi, M., Yazaki, Y., Tsuda, F., Okamoto, H., 2006. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J. Virol. Methods* 137, 325–333.
- Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R., 2007. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J. Med. Virol.* 79, 1827–1831.
- Ishida, S., Yoshizumi, S., Ikeda, T., Miyoshi, M., Goto, A., Matsubayashi, K., Ikeda, H., 2012. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.* 157, 2363–2368.
- Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeau, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., Guérin, J.-L., 2012. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1274–1281.
- Johne, R., Trojnar, E., Filter, M., Hofmann, J., 2016. Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4225–4231.
- Jothikumar, N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S., Khanna, P., 1993. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2558–2562.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131, 65–71.
- Kamel, A.H., Ali, M.A., El-Nady, H.G., Deraz, A., Aho, S., Pothier, P., Belliot, G., 2011. Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 1182–1185.
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10, 1075–1081.
- Khuroo, M.S., Khuroo, M.S., Khuroo, N.S., 2016. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses* 8.
- Kobayashi, N., Oshiki, M., Ito, T., Segawa, T., Hatamoto, M., Kato, T., Yamaguchi, T., Kubota, K., Takahashi, M., Iguchi, A., et al., 2017. Removal of human pathogenic viruses in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor treating municipal wastewater and health risks associated with utilization of the effluent for agricultural irrigation. *Water Res.* 110, 389–398.
- Kokkinos, P.A., Ziros, P.G., Mpalasopoulou, A., Galanis, A., Vantarakis, A., 2011. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virol. J.* 8, 195.
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., et al., 2012. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ. Virol.* 4, 179–191.
- Kuzmanovic, D.A., Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C., Krueger, S., 2003. Bacteriophage MS2: molecular weight and spatial distribution of the protein and RNA components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Struct. Lond. Engl.* 11, 1339–1348, 1993.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Vennarucci, V.S., Muscillo, M., 2010. Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5870–5873.
- La Rosa, G., Fratini, M., Spuri Vennarucci, V., Guercio, A., Purpari, G., Muscillo, M., 2012. GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiol.* 35, 27–34.
- La Rosa, G., Proroga, Y.T.R., De Medici, D., Capuano, F., Iaconelli, M., Della Libera, S., Suffredini, E., 2018. First detection of hepatitis E virus in shellfish and in seawater from production areas in southern Italy. *Food Environ. Virol.* 10, 127–131.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., Duval, J.F.L., 2008a. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophys. J.* 94, 3293–3312.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2008b. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water Res.* 42, 2769–2777.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *Int. J. Hyg Environ. Health* 218, 686–693.
- Lhomme, S., Abravanel, F., Dubois, M., Sandres-Saune, K., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J., 2012. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J. Virol.* 86, 10006–10014.
- Li, T.-C., Miyamura, T., Takeda, N., 2007. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 170–172.
- Li, H., Li, W., She, R., Yu, L., Wu, Q., Yang, J., Hu, F., Soomro, M.H., Shi, R., Hao, W., et al., 2017. Hepatitis E virus genotype 4 sequences detected in sewage from treatment plants of China. *Food Environ. Virol.* 9, 230–233.
- Maila, H.T., Bowyer, S.M., Swanepoel, R., 2004. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J. Gen. Virol.* 85, 89–95.
- Mansuy, J.M., Saune, K., Rech, H., Abravanel, F., Mengelle, C., Lhomme, S., Destruel, F., Kamar, N., Izopet, J., 2015. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur. Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 20, 27–34.
- Mansuy, J.M., Gallian, P., Dimeglio, C., Saune, K., Arnaud, C., Pelletier, B., Morel, P., Legrand, D., Tiberghien, P., Izopet, J., 2016. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepato. Baltim. Md* 63, 1145–1154.
- Martínez Wassaf, M.G., Pisano, M.B., Barril, P.A., Elbarcha, O.C., Pinto, M.A., Mendes de Oliveira, J., DiGiusto, P., Nates, S.V., Ré, V.E., 2014. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: environmental and serological survey. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 61, 334–339.
- Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A., 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* 47, 5101–5109.
- Masuda, J.-I., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., Kohno, S., 2005. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki. *Japan. Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 31, 178–183.
- Matos, A., Mesquita, J., Gonçalves, D., Abreu Silva, J., Luxo, C., Nascimento, M., 2016. Hepatitis E virus subgenotypes 3i and 3f in wastewater of treatment plants of Portugal. *J. Clin. Virol.* 82, S71.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., Mishihiro, S., 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188, 944.
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., van der Poel, W.H.M., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K.A., et al., 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 177–185.
- Meng, X.-J., 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.* 33, 41–49.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9860–9865.
- Mesquita, J.R., Oliveira, D., Rivadulla, E., Abreu-Silva, J., Varela, M.F., Romalde, J.L., Nascimento, M.S.J., 2016. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol.* 58, 13–15.
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *J. Appl. Microbiol.* 109, 388–397.
- Miura, T., Lhomme, S., Le Saux, J.-C., Le Mehaute, P., Guillois, Y., Couturier, E., Izopet, J., Abravanel, F., Le Guyader, F.S., 2016. Detection of hepatitis E virus in sewage after an outbreak on a French island. *Food Environ. Virol.* 8, 194–199.
- Miyamura, T., 2011. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res.* 161, 40–46.
- Myrnel, M., Lange, H., Rimstad, E., 2015. A 1-year quantitative survey of noro-, adeno-, human boca-, and hepatitis E viruses in raw and secondarily treated sewage from two plants in Norway. *Food Environ. Virol.* 7, 213–223.
- Namsai, A., Louisirirothanakul, S., Wongchinda, N., Siripanyaphinyo, U., Virulhakul, P., Puthavathana, P., Myint, K.S., Gannarong, M., Ittpong, R., 2011. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. *Let. Appl. Microbiol.* 53, 608–613.
- Nelson, K.E., Labrique, A.B., Kmush, B.L., 2018. Epidemiology of genotype 1 and 2 hepatitis E virus infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. [NF EN ISO 15216](https://doi.org/10.1101/152166).
- Nguyen, H.T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R.E., Thompson, E., Bonkovsky, H.L., Emerson, S.U., 2012. A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J. Gen. Virol.* 93, 526–530.
- Okamoto, H., 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127, 216–228.
- Okamoto, H., 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *J. Gastroenterol.* 48, 147–158.
- O'Hara, Z., Crossan, C., Craft, J., Scobie, L., 2018. First report of the presence of hepatitis E virus in Scottish-harvested shellfish purchased at retail level. *Food Environ. Virol.*
- Parker, J.M., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425–5432.
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4318–4326.
- Pavio, N., Meng, X.-J., Doceul, V., 2015. Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr. Opin. Virol.* 10, 34–41.
- Pérez-Gracia, M.T., Mateos, M.L., Galiana, C., Fernández-Barredo, S., García, A., Gómez, M.T., Moreira, V., 2007. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 893–896.
- Pischke, S., Hartl, J., Pas, S.D., Lohse, A.W., Jacobs, B.C., Van der Eijk, A.A., 2017. Hepatitis E virus: infection beyond the liver? *J. Hepatol.* 66, 1082–1095.
- Purdy, M.A., Khudiyakov, Y.E., 2010. Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PLoS One* 5, e14376.
- Purdy, M.A., Khudiyakov, Y.E., 2011. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 161, 31–39.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swardlow, H.P., Gu, Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13, 341.
- Ram, D., Manor, Y., Gozlan, Y., Schwartz, E., Ben-Ari, Z., Mendelson, E., Mor, O., 2016. Hepatitis E virus genotype 3 in sewage and genotype 1 in acute hepatitis cases, Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 216–220.

- Ramírez, C., Gregori, J., Buti, M., Tabernero, D., Camós, S., Casillas, R., Quer, J., Esteban, R., Homs, M., Rodríguez-Frías, F., 2013. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antivir. Res.* 98, 273–283.
- Reuter, G., Fodor, D., Forgách, P., Kátai, A., Szucs, G., 2009. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 44, 277–281.
- Rodríguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R., Girones, R., 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health* 8, 346–354.
- Rumnieks, J., Tars, K., 2017. Crystal structure of the maturation protein from bacteriophage Q β . *J. Mol. Biol.* 429, 688–696.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras, M.J., Gelati, E., Rodó, X., Kay, D., et al., 2015. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: implications for water pollution management. *J. Environ. Manag.* 159, 58–67.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H.H.J.L., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., de Roda Husman, A.M., 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 381–387.
- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H.L., Walsh, A., Ramsay, M., Morgan, D., Hepatitis E Incident Investigation Team, 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1738–1744.
- Samandoulgou, I., Hammami, R., Morales Rayas, R., Fliss, I., Jean, J., 2015. Stability of secondary and tertiary structures of virus-like particles representing noroviruses: effects of pH, ionic strength, and temperature and implications for adhesion to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7680–7686.
- Sánchez, G., 2013. Hepatitis A Virus in Food - Detection and Inactivation Methods | Glòria Sánchez. Springer.
- Schielke, A., Filter, M., Appel, B., John, R., 2011. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol. J.* 8, 487.
- Schvoerer, E., Moenne-Loccoz, R., Murray, J.M., Velay, A., Turek, M., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Erba, A.-C., Habersetzer, F., Doffoël, M., et al., 2013. Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures are associated with treatment failure and modulation of viral entry and neutralization. *J. Infect. Dis.* 207, 1306–1315.
- Shukla, P., Nguyen, H.T., Torian, U., Engle, R.E., Faulk, K., Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2011. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2438–2443.
- Simonet, J., Gantzer, C., 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7671–7677.
- Singh, M.P., Majumdar, M., Goyal, K., Lakshmi, P.V.M., Bhatia, D., Ratho, R.K., 2016. Investigation of suspected viral hepatitis outbreaks in North West India. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 84, 309–314.
- Smith, D.B., Purdy, M.A., Simmonds, P., 2013. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J. Virol.* 87, 4161–4169.
- Smith, D.B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E.F., Ulrich, R.G., John, R., Koenig, M., Jameel, S., Harrison, T.J., Meng, X.-J., et al., 2016a. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 97, 537–542.
- Smith, D.B., Paddy, J.O., Simmonds, P., 2016b. The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK. *J. Med. Virol.* 88, 915–918.
- Sobsey, M.D., Fuji, T., Shields, P.A., 1988. Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Sci. Technol.* 20, 385–391.
- Song, H., Li, J., Shi, S., Yan, L., Zhuang, H., Li, K., 2010a. Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture. *Virol. J.* 7, 40.
- Song, Y.-J., Jeong, H.-J., Kim, Y.-J., Lee, S.-W., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S., Park, H.-M., Choi, I.-S., 2010b. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J. Med. Virol.* 82, 583–591.
- Sridhar, S., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., 2015. Hepatitis E: a disease of reemerging importance. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 114, 681–690.
- Takahashi, K., Kang, J.-H., Ohnishi, S., Hino, K., Mishiro, S., 2002. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J. Infect. Dis.* 185, 1342–1345.
- Takahashi, M., Tanaka, T., Takahashi, H., Hoshino, Y., Nagashima, S., Jirintai, null, Mizuo, H., Yazaki, Y., Takagi, T., Azuma, M., et al., 2010. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1112–1125.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Nagashima, S., Mizuo, H., Okamoto, H., 2009. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1906–1910.
- Terio, V., Bottaro, M., Pavoni, E., Losio, M.N., Serraino, A., Giacometti, F., Martella, V., Mottola, A., Di Pinto, A., Tantillo, G., 2017. Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 61–65.
- Vaidya, S.R., Chitambar, S.D., Arankalle, V.A., 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J. Hepatol.* 37, 131–136.
- van Tong, H., Hoan, N.X., Wang, B., Wedemeyer, H., Bock, C.-T., Velavan, T.P., 2016. Hepatitis E virus mutations: functional and clinical relevance. *EBioMedicine* 11, 31–42.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., Andino, R., 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348.
- Wang, H., Sikora, P., Rutgersson, C., Lindh, M., Brodin, T., Björlenius, B., Larsson, D.G.J., Norder, H., 2018. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int. J. Hyg Environ. Health* 221, 479–488.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tsang, A.K.L., Joseph, M., Wong, E.Y.M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., et al., 2014. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1044–1048.
- Xia, J., Zeng, H., Liu, L., Zhang, Y., Liu, P., Geng, J., Wang, L., Wang, L., Zhuang, H., 2015. Swine and rabbits are the main reservoirs of hepatitis E virus in China: detection of HEV RNA in feces of farmed and wild animals. *Arch. Virol.* 160, 2791–2798.
- Yin, X., Li, X., Feng, Z., 2016a. Role of envelopment in the HEV life cycle. *Viruses* 8.
- Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z., 2016b. Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses. *J. Virol.* 90, 4232–4242.
- Yokosuka, O., 2000. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (Suppl. 1), D91–D97.
- Yunoki, M., Yamamoto, S., Tanaka, H., Nishigaki, H., Tanaka, Y., Nishida, A., Adan-Kubo, J., Tsujikawa, M., Hattori, S., Urayama, T., et al., 2008. Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters. *Vox Sang.* 95, 94–100.

Matériels et méthodes

Plan expérimental

Nous avons effectué des prélèvements humains, d'animaux, d'eaux usées d'abattoir, d'eaux usées urbaines au niveau d'une station d'épuration (STEP) et de moules d'eau douce. Les prélèvements d'eaux environnementales ont subi une étape de prétraitement afin de concentrer les virus et d'éliminer le maximum d'inhibiteurs. Tous les prélèvements subissaient ensuite une étape d'extraction des acides nucléiques, de rt-qPCR sur un fragment du gène ORF3 afin de détecter les positifs et de les quantifier (figure 16). Sur les prélèvements positifs, étaient ensuite pratiqués une amplification, un séquençage direct quand cela était possible et pour certains, un séquençage haut débit (figure 16). A partir des séquences, une prédiction de l'antigénicité était effectuée à l'aide du logiciel AnTheProt.

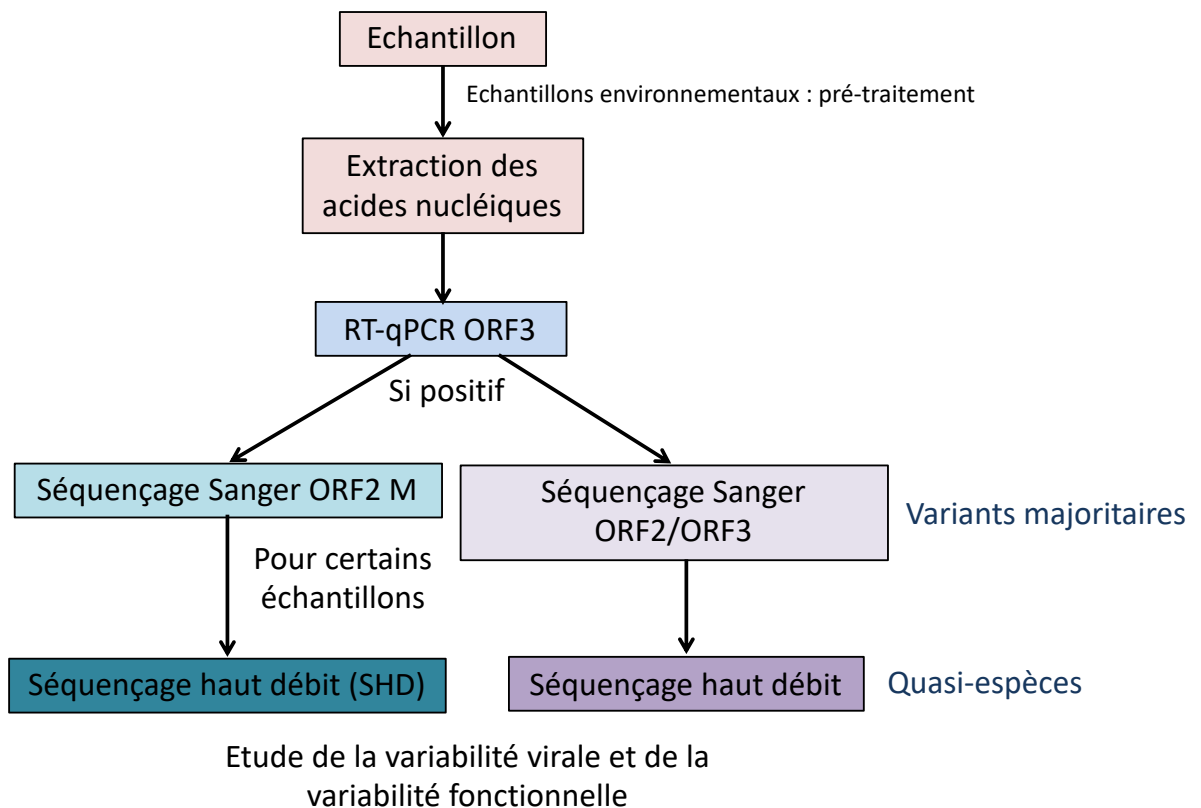


Figure 16 : Plan expérimental sur les prélèvements

I. Collection des prélèvements

A. Prélèvements humains

Tous les prélèvements humains provenaient de patients dont les prélèvements étaient pris en charge au laboratoire de virologie du centre hospitalier régional universitaire (CHRU) de Nancy ([figure 17](#)), à l'exception de cinq prélèvements provenant de Dijon. Ils étaient soit hospitalisés, soit vus en consultation, soit au CHRU soit dans un autre établissement de la région (Institut de Cancérologie de Lorraine ou centre hospitalier de Toul). Les prélèvements étaient des sangs et/ou des selles. Les patients inclus, dont au moins un prélèvement était positif, avaient tous plus de 18 ans et ne s'opposaient pas à la participation à cette étude, après information.

B. Prélèvements animaux

1. *Animaux sauvages*

Des prélèvements ont été effectués sur des sangliers et un chevreuil, tous dans la région Grand-Est. Nous avons prélevé 23 échantillons de foie et 19 de selles de sanglier et un échantillon de foie et un de selles du chevreuil.

2. *Animaux domestiques*

Des prélèvements de selles de cochons ont été effectués dans des élevages à 4 endroits. Les cochons étaient âgés de la naissance à l'âge adulte.

C. Prélèvements d'eaux usées d'abattoir

Des prélèvements ont été effectués à l'abattoir de Rambervillers, dans les Vosges ([figure 17](#)), les jours d'abattage porcin voire bovin. Il y avait en moyenne 40 porcs abattus par jour. Nous avons eu trois campagnes de prélèvements (2016, 2017, 2018). Onze prélèvements ont eu lieu en 2016, 9 en 2017 et 10 en 2018. Les cochons pesaient entre 95 et 150 kg et provenaient d'élevages de la région de type « plein air » ou « industriel ». Nous ne disposons pas d'information concernant la taille des élevages mais les fréquences d'abattage d'animaux provenant de ces élevages variaient entre un par mois et 40 à 50 par semaine. Les cochons avaient entre 7 et 10 mois à l'abattage.

D. Prélèvements d'eaux usées urbaines

Des prélèvements d'eaux usées urbaines ont été effectués sur la STEP de Maxéville (figure 17), qui draine les eaux du Grand Nancy (260 000 habitants). Trois campagnes de prélèvements ont été effectuées (2016, 2017, 2018). Nous avons effectué 9 prélèvements en 2016, 11 en 2017 et 10 en 2018.

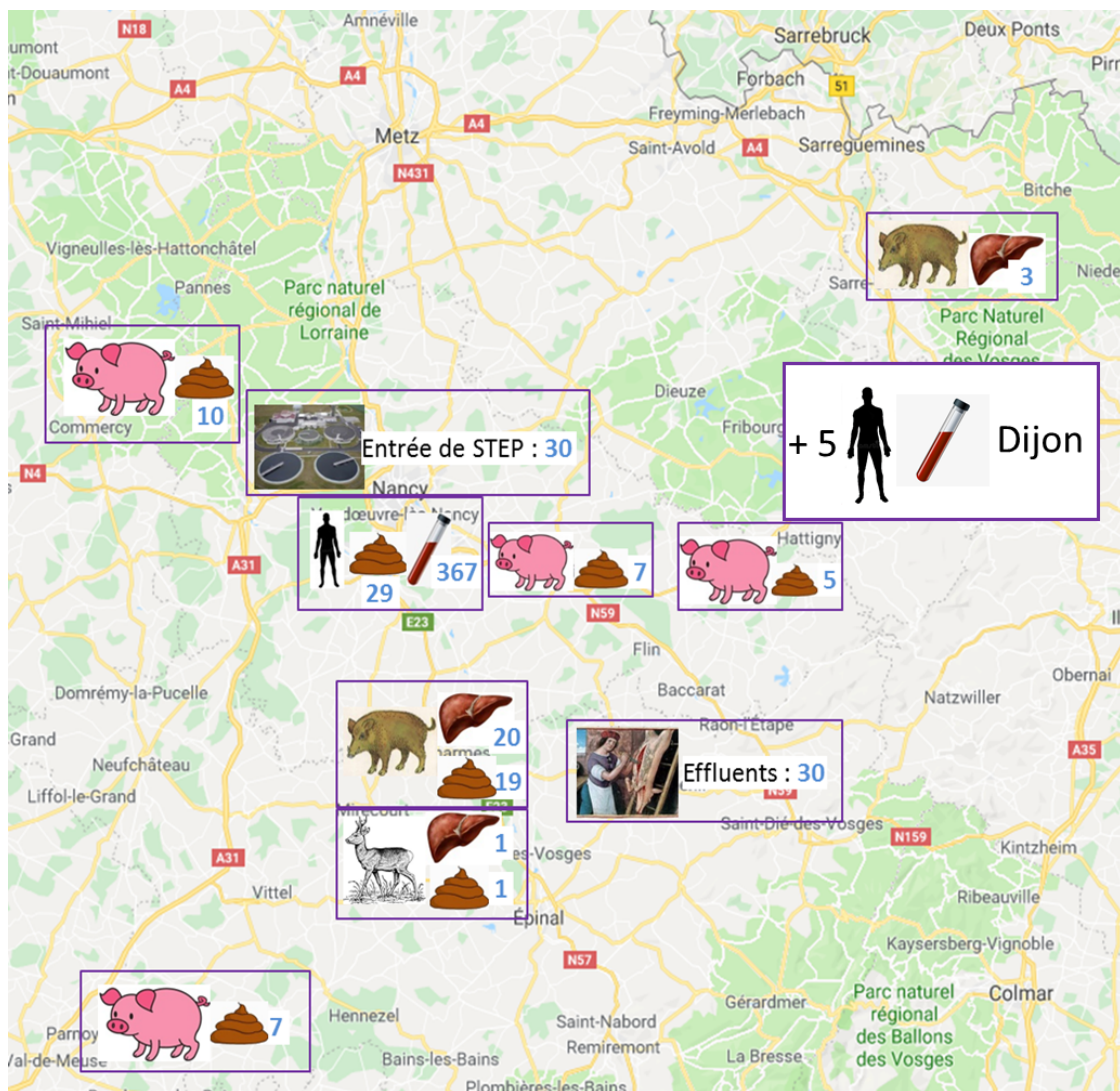


Figure 17 : Localisation géographique des différents prélèvements

E. Étude d'eaux de rivière via les dreissènes

Nous avons cherché à isoler des souches de VHE des eaux de rivière de la région Grand Est. Cependant, les virus éventuellement présents étant *a priori* très dilués, nous avons travaillé sur des mollusques qui sont mis dans ces rivières afin d'en surveiller la pollution microbiologique. Les mollusques filtrent l'eau et

concentrent les virus présents. Il s'agit de dreissènes (*Dreissena polymorpha* également appelées moules zébrées). Ces dreissènes ont été placées dans des cages dans des rivières sur 13 sites du Grand-Est (figure 18) puis récupérées après plusieurs mois et analysées.

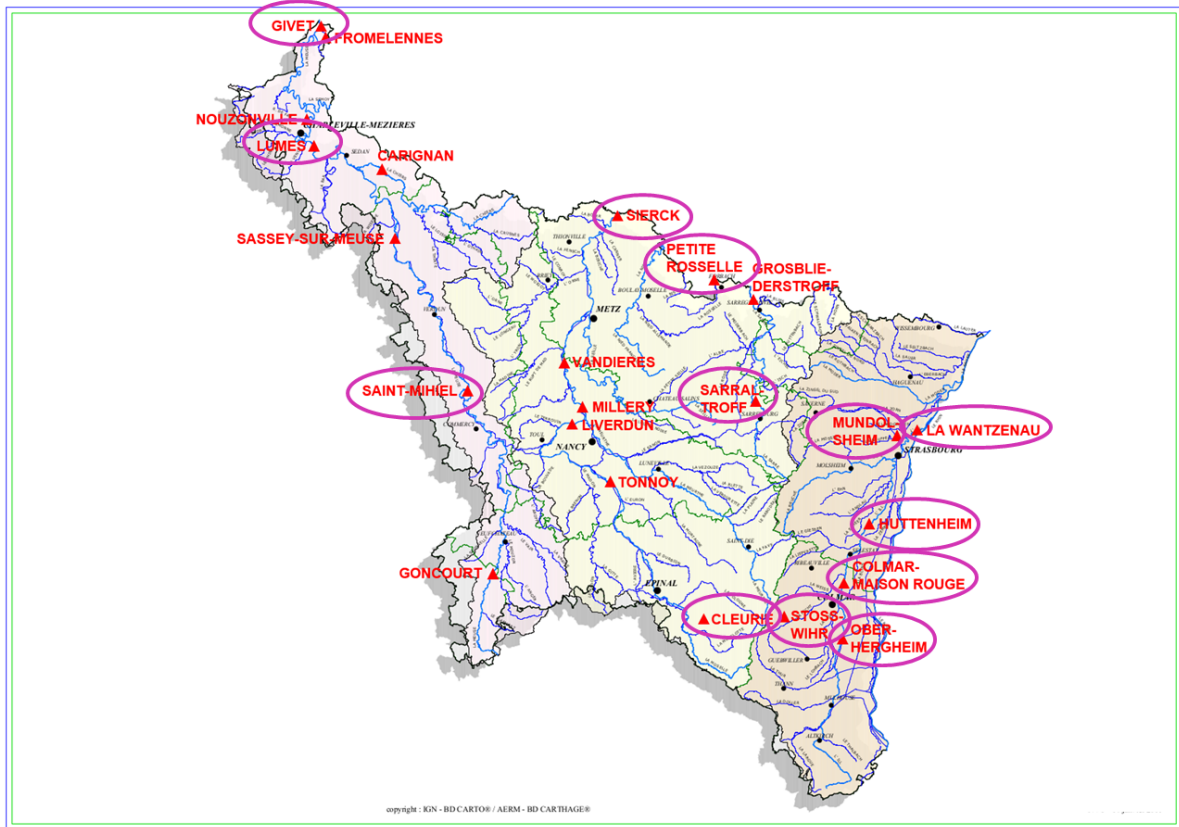


Figure 18 : Localisation géographique des différents sites d'incubation des dreissènes

Les noms entourés en rose correspondent à ces sites.

II. Prétraitement appliqué aux prélèvements avant extraction

Le but de cette étape est de concentrer les virus tout en minimisant la concentration d'inhibiteurs de PCR.

A. Prélèvements humains

Les prélèvements de sang étaient centrifugés et le sérum ou le plasma était directement utilisé pour réaliser l'extraction. Pour les prélèvements de selles destinés à être extraits sur EasyMag®, 200 mg étaient prélevés, mis en contact avec 400µl de tampon de lyse durant 15 minutes à température ambiante, puis une centrifugation était effectuée 2 minutes à 13000 tours par minute. Cent microlitres de surnageant étaient ensuite prélevés pour réaliser l'extraction. Pour les prélèvements de selles destinés à être extraits à l'aide du QIAamp Viral RNA mini kit, la selle était diluée au 1/10^e dans du sérum physiologique, puis centrifugée 20 minutes à 2000 g et le surnageant était filtré avec des filtres-seringues de 0,45 µm.

B. Prélèvements animaux

En ce qui concerne les prélèvements de foie, un morceau d'1 à 2 g (prélevé, si possible, à proximité d'un vaisseau sanguin) était digéré dans 200 µl de protéinase K (Qiagen, Courtaboeuf, France) pendant une heure, en vortexant toutes les 20 minutes. Cent-quarante microlitres du produit étaient ensuite utilisés pour l'extraction des acides nucléiques.

Pour les 22 premiers prélèvements de selles, l'équivalent de 0,5 à 1 ml était mis en suspension dans 4 à 4,5 ml de sérum physiologique. La suspension était vortexée, centrifugée, puis le surnageant était filtré sur des filtres-seringues de 0,45µm.

Pour les sept derniers prélèvements de selles, environ 4 g étaient prélevés, mis en contact avec 28 ml de PBS et le tout était broyé 3 minutes à l'aide du système Disperseur ULTRA-TURRAX® Tube Drive (Ika, Staufen, Allemagne). Une centrifugation de 500 g était effectuée pendant 5 minutes, 4 ml de surnageant étaient récupérés et mélangés à 5 ml de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique, (Acros Organics, Illkirch-Graffenstaden, France) dans un tube à graisse. Le tout était ensuite agité vigoureusement, puis centrifugé 2000 g 5 minutes. Le surnageant était

recupéré afin d'effectuer une deuxième fois ce traitement. Quatre millilitres de surnageant étaient récupérés et mis en contact avec 4 ml de tampon de lyse (Nuclisens[®], Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

Le mélange phénol – chloroforme – alcool isoamylique que nous utilisons a pour effet de séparer les graisses et matières organiques présentes dans le prélèvement de la phase aqueuse. La graisse présente dans le tube, mélangée à de la silice vient s'interposer entre les deux phases après centrifugation, la phase aqueuse étant au-dessus ; ceci permet d'enlever plus facilement des substances qui pourraient inhiber la réaction de PCR.

C. Prélèvements hydriques

Les échantillons de STEP prélevés en 2017 et 2018 (1 l par échantillon) et les échantillons d'abattoir prélevés en 2017 et 2018 (1 l par échantillon sauf pour l'un des échantillons de 2017, lequel contenait 500 ml) ont subi une première étape de concentration sur poudre de verre. Les échantillons ont été acidifiés à pH 3,5, afin de charger positivement les particules virales. Ils ont ensuite été mis en contact avec 20 g de poudre de verre (Grosseron, Couëron, France) (chargée négativement), sous agitation pendant 20 minutes. Après centrifugation (5 minutes à 3000 g) le surnageant était jeté et la poudre de verre était mise en contact pendant 30 minutes avec 60 ml d'un tampon d'extrait de bœuf-glycine (à pH 9,5). L'augmentation du pH avait pour but de rendre négative la charge des particules virales ; ceci et la présence d'un milieu riche en protéines (tampon d'extrait de bœuf-glycine) avait pour objectif d'éluer le virus dans le tampon. Après une autre centrifugation (10 minutes à 3000 g), le surnageant était récupéré et filtré avec un filtre-seringue de 5 µm puis de 1,2 µm.

Les échantillons de STEP prélevés en 2016 (150 ml par prélèvement), les eaux usées d'abattoir prélevés en 2016 (60 ml par échantillon) et les produits de la première étape de concentration ont été concentrés dans des filtres de type Centricon[®] Plus-70 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, United States). Le génome viral était récupéré par l'addition de 5,5 ml de tampon de lyse, issus des réactifs d'extraction magnétique NucliSens[®] (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), et 1,5 ml de PBS dans les colonnes Centricon[®]. L'échantillon était ensuite mis, avec 8

ml de phénol – chloroforme – alcool isoamylique dans des tubes à graisse, puis agité vigoureusement à la main et centrifugé à 2000g pendant 2 minutes. Cette étape utilisant le phénol – chloroforme – alcool isoamylique était répétée deux fois. Le surnageant (environ 8 ml) était utilisé pour l'extraction d'ARN.

D. Prélèvements de dreissènes

Les dreissènes ont été prélevées et directement congelées à -20°C. Le jour de l'analyse elles ont été mises en contact avec du PBS (10% de volume de moules et 90% de volume de PBS) et broyées à l'aide du système Disperseur ULTRA-TURRAX® Tube Drive (Ika, Staufen, Allemagne). Le broyat a été utilisé pour l'extraction des acides nucléiques.

III. Extraction des acides nucléiques

A. Prélèvements humains, animaux et de dreissènes

Huit prélèvements humains de Nancy positifs ont été extraits sur EasyMag® (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) : prélèvements des patients P1 à P5 et prélèvements sanguins de P15. Cette méthode utilise des billes de silice (figure 19). Les 14 autres, ainsi que les 22 premières selles de porc ont été extraits à l'aide du QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les instructions du fabricant (140 µl dans 60 µl). Cette méthode utilise des colonnes avec une membrane de silice qui, selon les caractéristiques physico-chimiques, peut retenir les acides nucléiques ou pas (figure 20). Les sept dernières selles de porc ont été extraites à l'aide du kit Nuclisens® MiniMag® (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Le volume d'élution était de 50 µl.

B. Prélèvements hydriques

Treize prélèvements hydriques ont été extraits sur EasyMag® (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) : les 7 premiers prélèvements de STEP de 2016 et les 6 premiers prélèvements d'abattoir de 2016. Les autres ont été extraits à l'aide du kit Nuclisens® MiniMag® (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Le volume d'élution était de 50 µl.

Principe de l'extraction

- A. Après la lyse des échantillons, tous les acides nucléiques sont capturés par les particules de silice magnétique.
- B. Le système d'aimantation de NucliSENS® easyMAG™ permet le lavage dynamique puis la fixation de la silice magnétique, pour purifier les acides nucléiques. L'étape de chauffage libère les acides nucléiques fixés sur la silice.
- C. Lors de l'étape finale, la silice magnétique est séparée de l'éluat par le système d'aimantation.

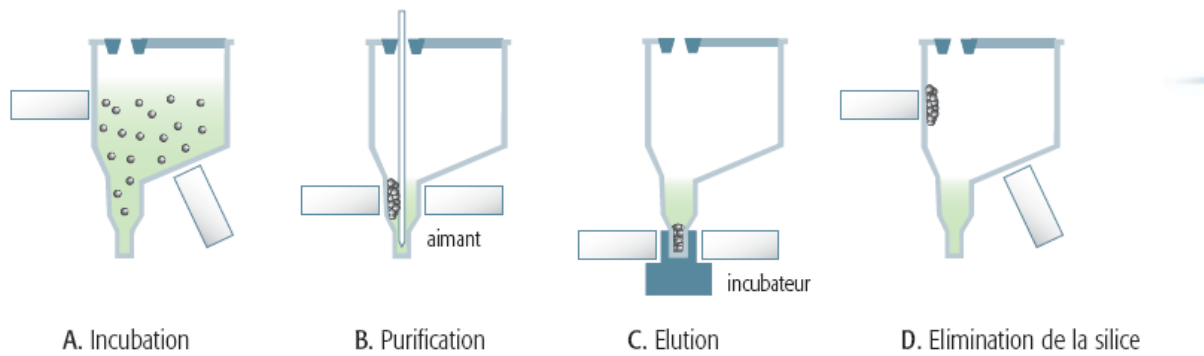


Figure 19 : Principe de l'extraction utilisant des billes de silice sur l'automate EasyMag

(d'après <http://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/nuclisensr-easymagr>).

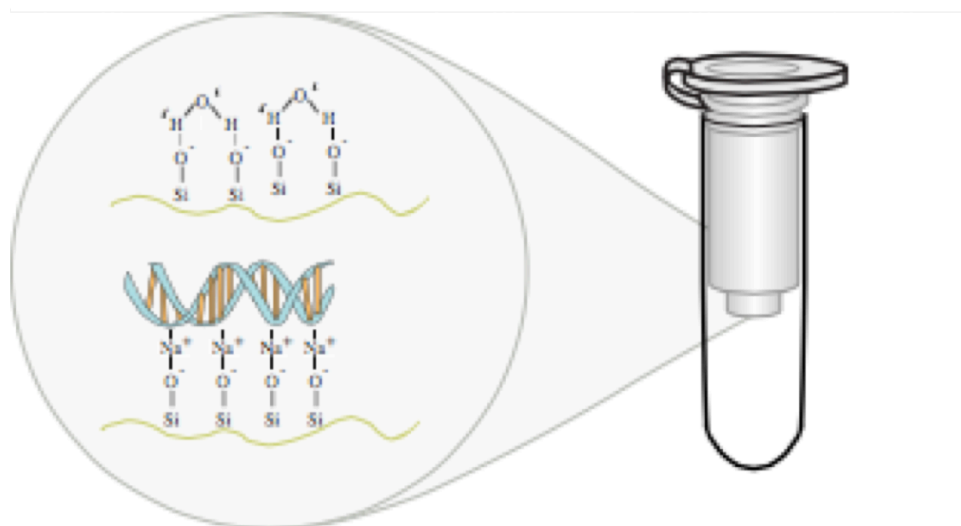


Figure 20 : Liaison de la membrane de silice à l'eau et à l'ADN

L'eau peut servir de tampon d'éluat. Liaison de la membrane à l'eau (en haut) et à l'ADN (en bas) [255]

Tous les extraits étaient aliquotés et conservés à -20°C pour de courtes durées, ou à -80°C pour des durées plus longues.

IV. Recherche qualitative et quantitative du génome du VHE

A. Méthode utilisée

Nous avons recherché le génome du VHE par une technique de rt-qPCR en temps réel. Les amorces et la sonde sont décrites dans le [tableau 5](#) et la [figure 21 \[256\]](#). Le fragment généré mesure 70 paires de bases (pdb), entre les nucléotides 5269 et 5338 (référence utilisée : AB369687, de sous-génotype 3f [7]). Le mélange réactionnel et le programme de PCR figurent dans les [tableaux 6 et 7](#). Le kit utilisé était le SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit w/ROX (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). La réaction a été effectuée sur un appareil Applied Biosystems® 7500 (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France).

Tableau 5 : Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la rt-qPCR VHE en temps réel

| Amorce/Sonde | Séquence (5'-3') |
|----------------------|---|
| Amorce sens ORF3 | GGTGGTTTCTGGGGTGAC |
| Amorce antisens ORF3 | AGGGGTTGGTTGGATGAA |
| Sonde ORF3 | (FAM) - TGATTCTCAGCCCTTCGC - (TAMRA) |

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la rt-qPCR VHE en temps réel

| Réactif | Quantité pour un puits |
|-------------------------------|------------------------|
| Eau | 5,2 µl |
| <i>Reaction Mix</i> | 12,5 µl |
| MgSO ₄ | 1,5 µl |
| Amorce ORF 3 sens (10 µM) | 0,5 µl |
| Amorce ORF 3 antisens (10 µM) | 0,5 µl |
| Sonde ORF3 (10 µM) | 0,4 µl |
| Enzyme | 0,9 µl |
| ARN | 3,5 µl |

Tableau 7 : Programme de rt-qPCR temps réel pour VHE et VHC

| Répétitions | Action | Programme rt-qPCR | |
|-------------|--|-------------------|-------------|
| | | Temps | Température |
| 50 cycles | Transcription inverse | 15 minutes | 50°C |
| | Inactivation de la transcriptase inverse | 1 minute | 95°C |
| | Dénaturation | 20 secondes | 95°C |
| | Hybridation, élongation | 40 secondes | 58°C |

B. Contrôle positif et gamme de quantification

Un prélèvement d'une patiente (P3) comportait une charge virale très élevée (mesurée à $3,2 \times 10^7$ copies/ml de plasma par le centre national de référence). Nous avons réalisé, par technique de clonage et transcription, une gamme de quantification à partir du sérum de cette patiente.

1. Clonage

Une rt-PCR en point final a été effectuée avec les amorces utilisées pour la rt-qPCR en temps réel. Le produit de PCR a été purifié et cloné à l'aide du kit TOPO-TA cloning kit® (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France), utilisant des bactéries TOP10 rendues compétentes chimiquement et le plasmide pCRTMII-TOPO® (figure 22). Les plasmides de 8 clones obtenus ont été purifiés à l'aide du kit PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit (InvitrogenTM, ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Les plasmides de 2 clones ont été coupés (pour linéarisation) chacun à l'aide d'une enzyme de restriction (EcoRV et BamHI, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) : le produit de purification est mis en contact avec 10 µl de tampon 10X, 10µl de l'enzyme et de l'eau (pour arriver à 100 µl au total). Après 1h30 d'incubation à 37°C, 4 µl d'enzyme sont éventuellement rajoutés avant une nouvelle incubation durant 3h-3h30. Une purification est ensuite effectuée à l'aide du kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Une transcription est effectuée à l'aide du kit MAXIscriptTM SP6/T7 Transcription Kit (InvitrogenTM, ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France), suivie de la destruction de l'ADN et de l'élimination des nucléotides non incorporés. La transcription est faite à partir du site SP6 pour le clone coupé avec EcoRV et à partir du site T7 pour le clone coupé avec BamHI. Les produits de transcription sont ensuite dosés à l'aide de l'automate

BioSpec-Nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japon) afin d'obtenir le nombre de copies d'ARN par microlitre.

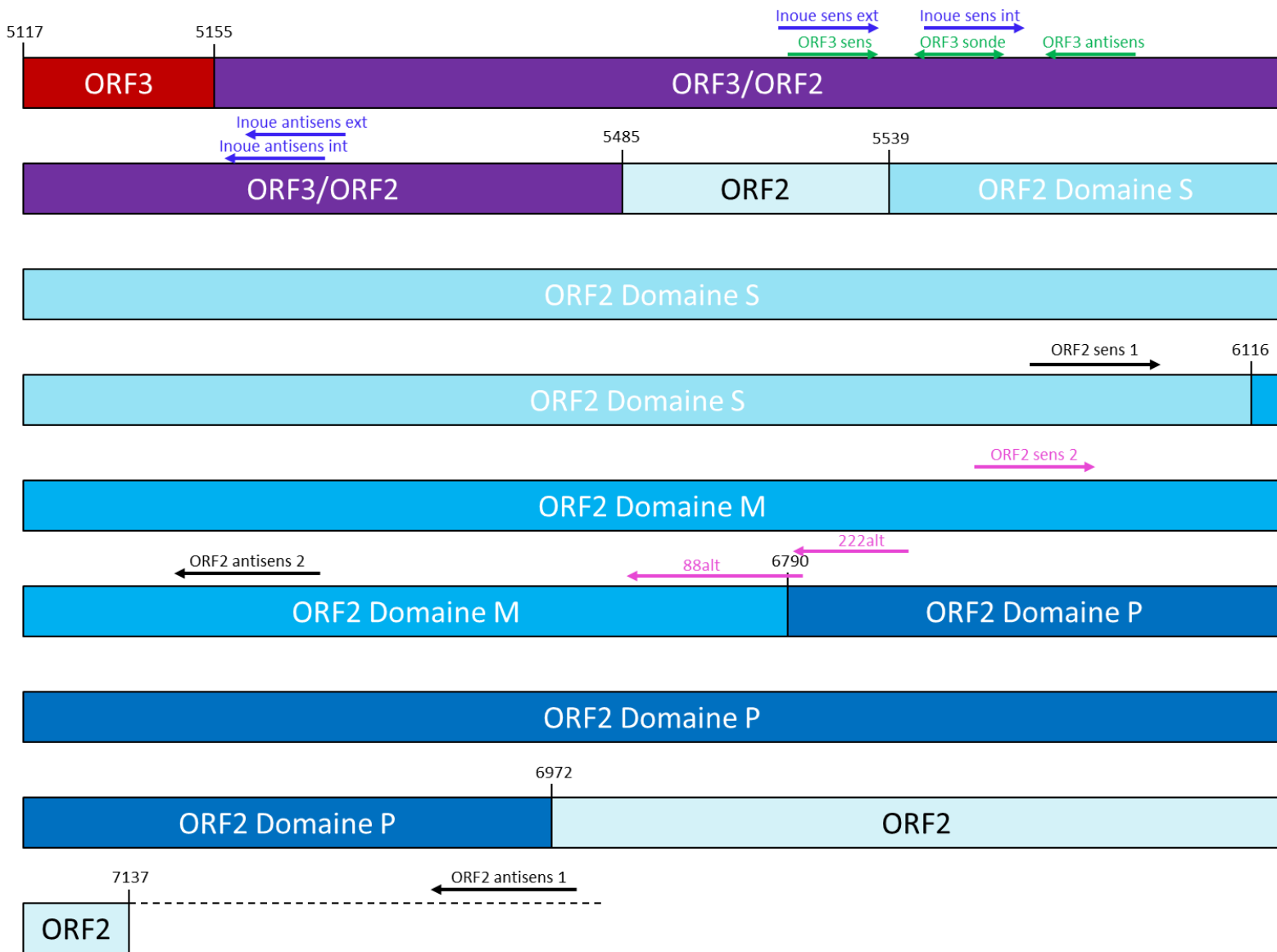
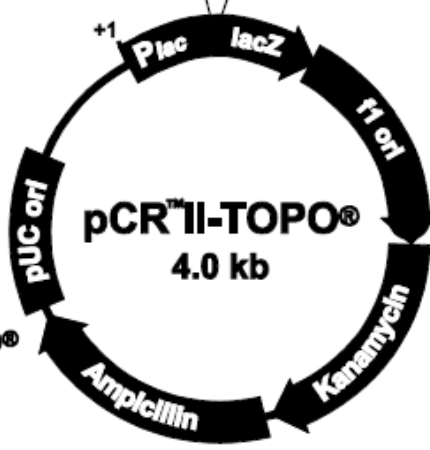
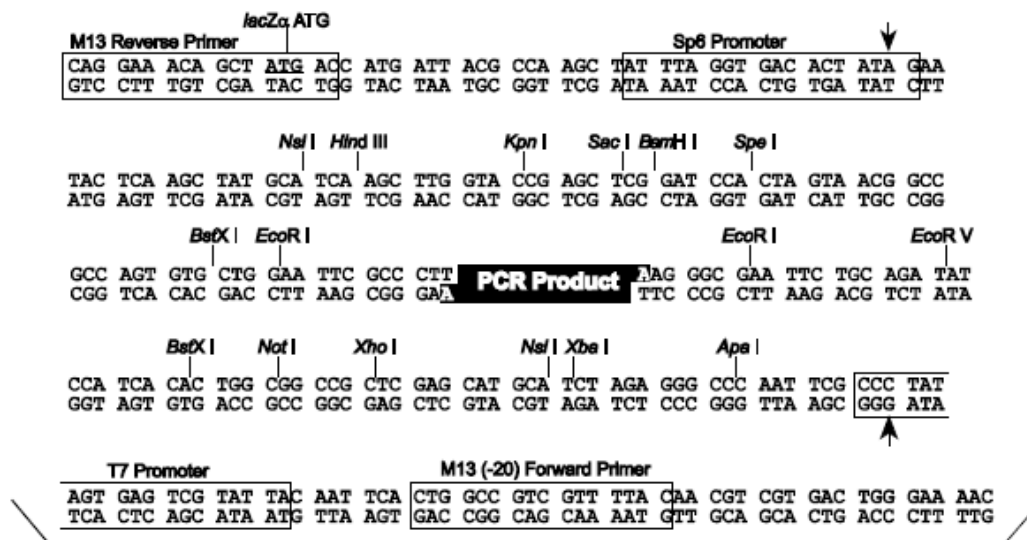


Figure 21 : Cartographie d'ORF2 et ORF3 avec représentation des amorces
Numéros en noir : nucléotides.

2. Mise au point et étalonnage de la gamme

A partir du produit de clonage – transcription, des dilutions sont effectuées de 10 en 10 afin d'obtenir des concentrations de même ordre de grandeur que nos prélèvements. Plusieurs points de l'un des clones (clone 1, EcoRV et SP6), dilués aux $1/10\ 000^e$, $1/100\ 000^e$, $1/1\ 000\ 000^e$ et $1/10\ 000\ 000^e$ servent à établir la gamme. Ultérieurement, seul le point au $1/100\ 000^e$ sera utilisé comme témoin positif et le reste de la gamme sera importé.



**Comments for pCR™II-TOPO®
3973 nucleotides**

- LacZα* gene: bases 1-589
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-383
- T7 promoter: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- f1 origin: bases 590-1027
- Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
- Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
- pUC origin: bases 3178-3851

Figure 22 : Cartographie du plasmide pCRTMII-TOPO®

(d'après le manuel d'utilisation du fournisseur du TOPO-TA cloning kit®).

Afin de pouvoir convertir le nombre de copies d'ARN en nombre d'unités internationales (UI), une rt-qPCR en temps réel d'un étalon international (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Allemagne) est également effectuée et comparée avec les résultats de la gamme. A chaque rt-qPCR en temps réel, une conversion en UI pourra être faite sans avoir à repasser à chaque fois l'étalon international.

C. Contrôle interne

Afin d'éliminer un faux négatif ou une sous quantification d'un échantillon par inhibition de la réaction de PCR, une amplification est réalisée avec un contrôle interne. Nous avons choisi le virus de l'hépatite C : il s'agit également d'un virus à ARN donc les étapes de transcription inverse et de PCR peuvent être contrôlées. La réaction de rt-qPCR VHC en temps réel était effectuée dans un puits différent de celle du VHE (les 2 sondes utilisent le même fluorophore FAM). Pour les échantillons humains (à risque de comporter du VHC), une rt-qPCR VHC en temps réel était effectuée sans ajout de contrôle dans le but de s'assurer de l'absence de VHC. Puis, pour tous les prélèvements, une rt-qPCR VHC était effectuée après l'ajout d'un ARN de VHC obtenu par clonage et transcription (selon la même méthode que pour l'obtention du contrôle positif VHE) à partir d'un mélange de plasmas de patients ayant des charges virales VHC élevées. Le clone 2 (BamHI et T7) au 1/10 000^e est utilisé. Dans un puits, l'ARN VHC est ajouté à de l'eau de qualité biologie moléculaire, afin d'avoir un témoin non inhibé. En fait, les points de sortie du contrôle interne sont très différents selon la matrice de départ et souvent plus précoces que le témoin VHC + eau biologie moléculaire : il est décidé de comparer le point de sortie du contrôle interne pour un échantillon à la moyenne des points de sortie du contrôle interne des autres échantillons ayant la même matrice afin de déterminer s'il existe ou non une inhibition de la réaction de rt-qPCR.

La séquences des amorces et de la sonde pour le VHC ont été décrites [257] et sont données dans le [tableau 8](#). Le mélange réactionnel est décrit dans le [tableau 9](#), le programme de rt-qPCR VHC en temps est le même que pour le VHE ([tableau 7](#)).

Tableau 8 : Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la rt-qPCR VHE en temps réel

BHQ : *black hole quencher*.

| Amorce/Sonde | Séquence (5'-3') |
|-----------------------|--|
| Amorce BK1 (sens) | CGGGAGAGCCATAGTGGT |
| Amorce BK2 (antisens) | CAAGCACCCCTATCAGGCA |
| Sonde BK3 | (FAM) - CAAGGCCTTTTCGCGACCCAA - (BHQ1) |

Tableau 9 : Mélange réactionnel pour la rt-qPCR VHC en temps réel

| Réactif | Quantité pour un puits |
|---------------------|------------------------|
| Eau | 1,2 µl |
| <i>Reaction Mix</i> | 12,5 µl |
| MgSO4 | 1,5 µl |
| Amorce BK1 (10 µM) | 0,5 µl |
| Amorce BK2 (10 µM) | 0,5 µl |
| Sonde BK3 (10 µM) | 0,4 µl |
| Enzyme | 0,9 µl |
| Clone VHC (ou eau) | 4 µl |
| ARN | 3,5 µl |

Pour la rt-qPCR en temps réel des dreissènes, un contrôle interne a été utilisé suivant la méthode ENTEROVIRUS R-gene (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) ; il s'agit d'un ADN bactérien. Cette méthode recherche de manière couplée la présence du contrôle interne et d'entérovirus ; ainsi elle nous a également permis de rechercher la présence d'entérovirus dans les dreissènes. Le mélange réactionnel par puits recommandé par le fabricant comporte 15 µl de réactifs et 10 µl d'extrait. En plus des 15 µl de réactifs, nous avons mis 7 µl de l'extrait à tester et 3 µl de contrôle. Cette méthode a également été utilisée sur les premiers prélèvements humains et environnementaux, avant la mise au point de la méthode utilisant le VHC.

Lorsque l'inhibition était supérieure à 90%, la PCR était effectuée sur l'extrait dilué au 1/10^e voire au 1/100^e.

D. Rendement de prétraitement et d'extraction

Afin d'avoir une idée du rendement de l'extraction, nous avons, pour certains prélèvements hydriques environnementaux de la campagne 2018, ajouté du FCV dans le prélèvement avant le début du prétraitement ou bien juste avant l'étape dans les Centricon® Plus-70, après réajustement du pH à 7. Les prélèvements ont ensuite été extraits en parallèle du FCV non mis dans les échantillons et le rendement a été calculé en appliquant la formule contenue dans la norme NF EN ISO 15216 : Récupération du virus témoin d'extraction = $10^{(\Delta Cq/m)} \times 100\%$, où ΔCq est la valeur de Cq de l'ARN VHE – la valeur de Cq de l'ARN FCV et m est la pente de la courbe étalon de l'ARN FCV [81].

V. Amplification génique des échantillons en vue du séquençage

A. PCR d'amplification

Des rt-PCR en point final ont été réalisées. La faible sensibilité des techniques a nécessité l'utilisation de PCR nichées ou semi-nichées. Plusieurs systèmes d'amorces ont été utilisés (figure 23).

- Le séquençage du domaine M d'ORF2 a utilisé une PCR semi-nichée avec une amorce sens décrite dans la littérature [87] et deux amorces antisens également décrites [258]. Les séquences des amorces figurent dans le tableau 10. L'amplicon mesure 216 pdb, compris entre les nucléotides 1152 et 1367 d'ORF2.
- Le séquençage de la zone de chevauchement ORF3/ORF2 a été réalisé à l'aide d'un système d'amorces décrit et connu pour sa sensibilité [259]. Les séquences des amorces figurent dans le tableau 10. Ce système de PCR génère un amplicon de 137 pdb, compris entre les nucléotides 174 et 310 d'ORF3 et 136 et 272 d'ORF2.

Tableau 10 : Séquence des amorces pour la rt-PCR VHE en point final

RT : transcription inverse, i : inosine triphosphate.

| Système | Amorce | Séquence (5'-3') | Utilisation |
|-----------|------------------------|-------------------------------------|----------------|
| ORF2 M | HEV Sens 2 (sens) | GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG | RT, PCR 1 et 2 |
| | HEV 222alt (antisens) | GARAAiGGRCGiGAIgGRCiGG | RT et PCR 1 |
| | HEV 88alt (antisens) | GGAGAAGGAGTTGGTCGRTCYTGYTCRTGYTGRTT | PCR 2 |
| ORF3/ORF2 | HEV Inoue Sens ext | GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC | RT et PCR 1 |
| | HEV Inoue Antisens ext | CTGGGMYTGGTCDGCGCCAAG | RT et PCR 1 |
| | HEV Inoue Sens int | GYTGATTCTCAGCCCTTCGC | PCR 2 |
| | HEV Inoue Antisens int | GMYTGGTCDGCGCCAAGHGGA | PCR 2 |

La transcription inverse et la première PCR étaient réalisées avec la trousse *Titan one tube rt-PCR kit* (Sigma-Aldrich®, Saint Quentin Fallavier, France) ou la trousse *Access RT-PCR System* (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les mélanges réactionnels et programmes figurent dans les tableaux 11 et 12. La deuxième PCR était réalisée avec la trousse *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix*

(ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Les mélanges réactionnels et programmes de PCR figurent dans les [tableaux 13 et 14](#).

Tableau 11 : Mélanges réactionnels de la rt-PCR VHE en point final

A : Trousse *Titan one tube rt-PCR kit*. L'ARN est mis dans le mix 1 puis le mix 2 est ajouté dans le tube. B : *Access RT-PCR System*. dNTP : désoxyribonucléotides, DTT : dithiothréitol, *RNase out* : enzyme détruisant les RNases, RT : transcriptase inverse, Pol : polymérase.

| A | Réactif | Quantité pour un puits |
|-------|-------------------------|------------------------|
| Mix 1 | Eau | 4,625 µl |
| | dNTP | 1 µl |
| | DTT | 0,625 µl |
| | <i>RNase out</i> | 0,25 µl |
| | Amorce sens (10 µM) | 0,5 µl |
| | Amorce antisens (10 µM) | 0,5 µl |
| | ARN | 5 µl |
| Mix 2 | Eau | 9,75 µl |
| | 5X RT Tampon | 2,5 µl |
| | Enzyme mix | 0,25 µl |

| B | Réactif | Quantité pour un puits |
|---|-------------------------|------------------------|
| | Eau | 8,5 µl |
| | Tampon | 5 µl |
| | dNTP | 0,5 µl |
| | Amorce sens (10 µM) | 2 µl |
| | Amorce antisens (10 µM) | 2 µl |
| | MgSO ₄ | 1 µl |
| | RT | 0,5 µl |
| | Pol | 0,5 µl |
| | ARN | 5 µl |

Tableau 12 : Programme de rt-PCR en point final pour VHE

A : Trousse *Titan one tube rt-PCR kit* (couple d'amorces d'ORF2 domaine M). B : Trousse *Access RT-PCR System* (couple d'amorces d'ORF3/ORF2).

| A Répétitions | Programme rt-PCR | |
|---------------|------------------|-------------|
| | Temps | Température |
| 50 cycles | 30 minutes | 50°C |
| | 5 minutes | 94°C |
| | 30 secondes | 94°C |
| | 30 secondes | 53°C |
| | 1 minute | 68°C |

| B Répétitions | Programme rt-PCR | |
|---------------|------------------|-------------|
| | Temps | Température |
| 35 cycles | 45 minutes | 45°C |
| | 2 minutes | 94°C |
| | 30 secondes | 94°C |
| | 1 minute | 58°C |
| | 2 minutes | 68°C |

Tableau 13 : Mélange réactionnel de la PCR2 VHE en point final

DMSO : diméthylsulfoxyde, ADNc : ADN complémentaire.

| Réactifs | Quantité pour un puits |
|-------------------------|------------------------|
| Eau | 0,4 µl |
| DMSO | 0,6 µl |
| Amorce sens (10 µM) | 0,75 µl |
| Amorce antisens (10 µM) | 0,75 µl |
| <i>Master Mix</i> | 12,5 µl |
| ADNc | 10 µl |

Tableau 14 : programmes de PCR2 en point final pour VHE

| Répétitions | Programme PCR | |
|--|---------------|-----------------------------------|
| | Temps | Température |
| | 5 minutes | 98°C |
| 15 cycles (ORF2 M) 30 cycles (ORF3/ORF2) | 30 secondes | 98°C |
| | 20 secondes | 53°C (ORF2 M) 58°C (ORF3/ORF2) |
| | 30 secondes | 72°C |
| | 7 minutes | 72°C |

B. Vérification de l'amplification

Après l'étape de PCR, les produits subissaient une électrophorèse afin de vérifier l'amplification. Ceci était réalisé sur des gels d'agarose 1,5% (agarose Gigaphor, Eurobio, Courtaboeuf, France et Tris-Borate-EDTA, Euromedex, Souffelweyersheim, France), auxquels avait été ajouté un agent intercalant (GelRed™ Nucleic Acid, Interchim, San Diego, Californie, Etats-Unis). Chaque produit d'amplification était déposé dans un puits avec un alourdisseur colorant en bleu (*Blue/Orange Loading Dye, 6X*, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Un marqueur de taille était déposé dans un des puits (100 PB DNA ladder, Fisher, Illkirch-Graffenstaden, France). La migration était réalisée en 30 minutes à 100 V. La révélation était faite sous lumière ultraviolette, la taille des bandes étant repérée grâce au marqueur de taille et à un témoin positif (patiente P3).

C. Purification des amplicons

Les produits d'amplification qui présentaient une bande de la taille attendue étaient ensuite purifiés (enlèvement des amorces, enzymes, nucléotides libres, solution tampon...). Si la bande était isolée, le kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France) était utilisé ; l'élution était réalisée dans un volume de 30 µl. Si la bande de taille attendue étaient entourée d'autres bandes, une purification sur gel était effectuée : après migration sur un gel d'agarose 1,5% de tout le produit d'amplification, la partie du gel comportant la bande à étudier était découpée sous lumière ultraviolette puis une purification était réalisée à l'aide du kit

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) ; l'élution était réalisée dans un volume de 30 µl.

Après purification sur gel, une migration de contrôle était effectuée sur un gel d'1,5% d'agarose, 15 minutes à 100 V.

Les produits de purification étaient conservés à -20°C.

VI. Séquençage direct

A. Réaction de séquence

La réaction de séquence a été effectuée avec le kit *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Le mélange réactionnel et le programme sont présentés dans les [tableaux 15 et 16](#). Cette réaction consiste à effectuer une PCR avec une seule amorce et, en plus des nucléotides « standard », des didésoxynucléotides marqués par un fluorophore (différent selon la nature de la base) et terminateurs de chaîne, qui seront intégrés par la Taq polymérase de façon aléatoire. Cela génère des fragments de longueur différente, tous terminés par un didésoxynucléotide marqué ([figure 23](#)).

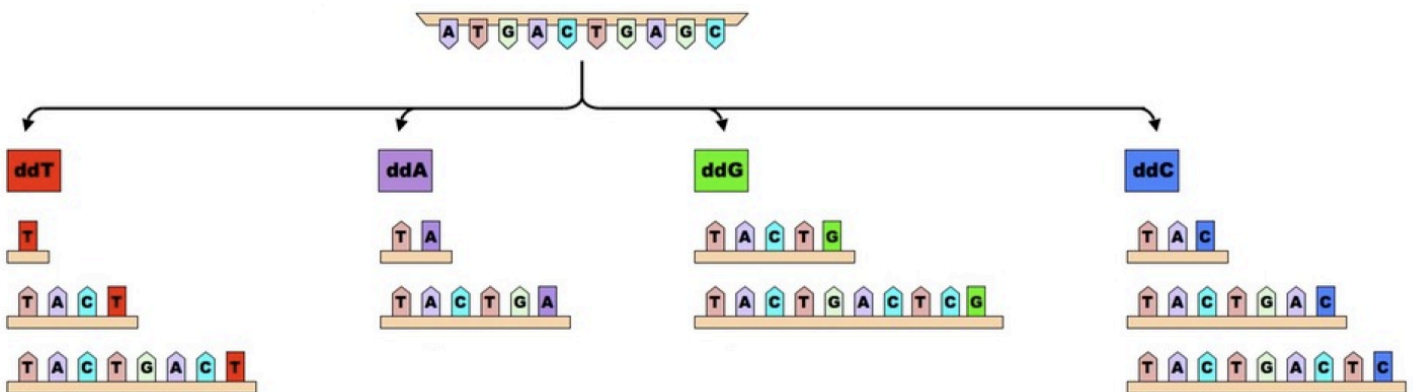


Figure 23 : Principe de la réaction de séquence

(d'après <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-3-heredity/molecular-biology-technique/sequencing.html>).

Les amorces utilisées étaient Inoue sens int et Inoue antisens int pour ORF3/ORF2 et Sens 2 pour le domaine M d'ORF2 ([tableau 10](#)).

La quantité de produit de purification mise dans le mélange réactionnel variait en fonction de la concentration d'ADN (estimée par l'aspect de la bande sur le gel d'électrophorèse ou par dosage sur l'automate BioSpec-Nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japon)).

Tableau 15 : Mélange réactionnel de la réaction de séquence

QSP : quantité suffisante pour.

| Réactif | Quantité pour un puits |
|---|------------------------|
| Eau | QSP 15 µl |
| <i>BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix</i> | 2 µl |
| <i>5x Sequencing Buffer</i> | 1 µl |
| Amorce (1µM) | 3,2µl |
| Produit de purification | Selon concentration |

Tableau 16 : Programme de la réaction de séquence

| Répétitions | Programme PCR | |
|-------------|---------------|-------------|
| | Temps | Température |
| 25 cycles | 10 secondes | 96°C |
| | 5 secondes | 50°C |
| | 4 minutes | 60°C |

B. Purification

Les produits de réaction de séquence étaient ensuite purifiés à l'aide du kit *DyeEx 2.0 Spin Kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France).

C. Séquençage

Le séquençage était réalisé sur un automate *Applied Biosystems 3130* (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Le principe consiste à faire migrer les produits le long de capillaires, selon leur taille (variant d'un nucléotide) et chaque brin passe devant un lecteur de fluorescence, ce qui permet de voir le type de didésoxynucléotide intégré sur les brins de chaque longueur et d'obtenir ainsi la séquence.

D. Analyse

Les séquences ainsi obtenues étaient analysées à l'aide du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) 6 et comparées entre elles ainsi qu'à une séquence de référence de sous-génotype 3f (AB369687 [7]). Le sous-génotype 3f est le plus fréquemment rencontré chez l'humain en France [260]. Afin d'éviter des artefacts liés à la présence d'ambiguïtés dans les amorces, seule la portion des séquences située entre les amorces a été prise en compte. Les arbres phylogéniques ont été réalisés à l'aide de ce même logiciel en utilisant la méthode du *neighbor-joining* avec un *bootstrap* de 500 répliquions et la méthode Kimura-2 pour la matrice de distance.

La présence d'acides aminés spécifiques a été recherchée sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3, dans les cadres de lecture ORF2 et ORF3. A l'aide du logiciel VESPA HCV (<https://hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>), une séquence de synthèse a été construite pour chaque type de prélèvement. Ces séquences ont été comparées entre elles afin de déterminer le pourcentage d'homologie existant entre les séquences de VHE venant des différents types de prélèvement.

VII. Séquençage haut débit (*Ultra Deep Sequencing*, UDS)

Ce séquençage sera réalisé avec la technique Illumina[®] MiSeq (Illumina[®], San Diego, Californie, États-Unis).

A. Échantillons analysés

Nous avons analysé les échantillons disponibles pour lesquels nous avons un résultat en séquençage direct. A noter que pour le prélèvement de dreissènes de Petite-Rosselle, ainsi que pour un des prélèvements de STEP pour lesquels nous avons une bande sur le gel post-amplification et dont le séquençage direct ne donnait pas du VHE, nous avons choisi de passer en UDS afin de détecter un éventuel mélange de souches gênant le séquençage direct.

B. Préparation de la « librairie »

1. Accroche des TAG

La deuxième PCR est réalisée avec des amorces TAGuées. Ceci a pour but de rajouter des extensions aux amplicons d'ADN qui serviront d'adaptateurs. Les séquences sont : 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[amorce spécifique] en sens et 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[amorce spécifique] en antisens.

Une migration par électrophorèse sur gel d'agarose est effectuée afin de vérifier la présence et la taille des amplicons. Une purification est ensuite effectuée.

2. Dosage au Picogreen et dilution

Les produits de purification sont dosés à l'aide d'un kit Picogreen (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Après préparation d'une plaque, celle-ci est lue grâce à un lecteur Victor3 et au logiciel Wallac 1420 Workstation (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Le résultat de ce dosage permet de calculer une dilution des échantillons à effectuer afin d'arriver à une concentration comprise entre 1 et 2 ng/ μ l (ou inférieure à 1 ng/ μ l pour les échantillons pour lesquels le dosage montre une telle concentration).

3. Indexage des fragments

Le séquençage étant réalisé sur un mélange de tous les amplicons, il faut au préalable « marquer » chaque amplicon. L'indexage consiste à ajouter un fragment d'ADN à chaque extrémité de chaque amplicon. La séquence de ce fragment est connue et est différente entre les extrémités 5' et 3' de chaque amplicon. Une combinaison de fragments 5' et 3' particulière est utilisée pour chaque échantillon (Illumina®, San Diego, Californie, États-Unis), ce qui fait que nous pourrions faire la différence entre les amplicons de différents échantillons.

Les produits sont ensuite purifiés à l'aide d'un système utilisant des billes magnétiques, selon le protocole Nextera XT DNA Library Prep Kit d'Illumina (Illumina®, San Diego, Californie, États-Unis).

4. Vérification des produits

Un nouveau dosage est réalisé à l'aide du kit Picogreen. Les produits passent ensuite par une étape d'électrophorèse capillaire (facultative), afin de vérifier la longueur des fragments, à l'aide du système Agilent et de l'automate Agilent 2100 Bioanalyser (Santa Clara, Californie, États-Unis).

C. Création du mélange et séquençage

Tous les produits sont dilués dans du tampon Tris à pH 8,5, visant une concentration finale de 1 nM. Un mélange est réalisé avec 5 µl de chaque échantillon. Ce mélange subit ensuite une dénaturation par l'ajout de soude 0,2 N et chauffage à 96°C pendant 2 minutes. Un refroidissement est ensuite effectué dans de la glace. Un contrôle interne (PhiX Control Kit v3) est ajouté au mélange dans les mêmes concentrations. La solution est ensuite diluée pour atteindre une concentration de 4 pM puis chargée sur la puce de séquençage haut débit puis dans le séquenceur MiSeq (Illumina®, San Diego, États-Unis). Une séquence de référence est chargée dans le logiciel du séquenceur.

D. Analyse des séquences

Les séquences obtenues étaient d'abord analysées à l'aide du logiciel Geneious (Biomatters LTD, Nouvelle-Zélande). Au cours de cette première étape, les séquences aberrantes et de mauvaise longueur étaient éliminées. A l'aide du logiciel Excel (Microsoft, États-Unis), les séquences identiques étaient ensuite regroupées, ce groupe constituant un variant, et le nombre de séquences dans chaque variant était compté de façon à pouvoir calculer la proportion de chaque variant dans la population totale.

Les variants représentant plus de 0,5% de la population totale ou les 5 variants les plus représentés ont été analysés de manière plus poussée. Un alignement était réalisé à l'aide du logiciel MEGA6 avec une séquence de référence de sous-génotype 3f (AB369687 [7]). Afin d'éviter des artefacts liés à la présence d'ambiguïtés dans les amorces, seule la portion des séquences située entre les amorces a été prise en compte.

1. *Distance génétique intra échantillon*

La distance génétique moyenne entre séquences d'un même échantillon a été calculée à l'aide du logiciel MEGA6. Cette distance est évaluée par le nombre de différences nucléotidiques entre variants d'une même quasi-espèce virale. Seules 500 séquences pouvaient être gérées facilement par le logiciel MEGA : chaque variant était représenté de façon proportionnelle dans ces 500 séquences. Cette étude a été réalisée sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3.

2. *Répartition des variants au sein des échantillons*

La proportion relative des variants a été comparée entre les différents échantillons. Cela permet d'appréhender la présence d'un variant très majoritaire ou d'une association de variants diversement représentés. Cette étude a été réalisée sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3.

3. *Fréquence des différentes mutations et substitutions*

Nous avons analysé les séquences nucléotidiques et les séquences en acides aminés – dans chacun des deux cadres de lecture pour ce qui est de la zone de chevauchement ORF2/ORF3. Pour chaque mutation en nucléotides et chaque substitution en acides aminés, la fréquence dans la population totale de l'échantillon était calculée.

4. *Analyse phylogénique*

Des arbres phylogéniques ont été construits à l'aide du logiciel MEGA6 en utilisant la matrice de distance *Neighbour-joining* et la technique des *bootstraps* (n=500, modèle Kimura-2). Des séquences de référence de différents génotypes et sous-génotypes ont été incluses dans ces arbres [7].

5. *Prédiction de l'antigénicité et de l'hydrophobie*

L'antigénicité et l'hydrophobie prédites des variants majoritaires était calculée à l'aide du logiciel AnTheProt [261,262] et une comparaison était effectuée avec une séquence de référence (AB369687, sous-génotype 3f [7]). Le logiciel AnTheProt permet d'estimer l'antigénicité et l'hydrophobie d'un polypeptide. Pour estimer l'antigénicité, il prend en compte pour chaque acide aminé l'accessibilité, la flexibilité et l'hydrophobie dudit acide aminé, des trois acides aminés qui le précèdent et des

trois acides aminés qui le suivent. Un score est ensuite assigné à l'acide aminé et ce processus est répété pour chaque acide aminé de la chaîne. Dans notre étude, cette analyse était utilisée pour donner une première idée de l'impact des modifications d'acides aminés sur l'antigénicité des protéines.

Résultats – présentation générale

Au cours de cette étude, nous avons étudié la circulation du VHE dans l'environnement dans le nord-est de la France. Nous avons, dans un premier temps, déterminé la présence du VHE dans les différents échantillons et quantifié la charge virale par des méthodes de biologie moléculaire. Par la suite, nous avons étudié les séquences génétiques du VHE présent dans les différents prélèvements en termes de variabilité et de complexité ainsi que pour la recherche de signatures moléculaires, pouvant être corrélées au pouvoir pathogène viral ou à un type de prélèvement donné. Enfin, nous avons effectué des prédictions antigéniques et d'hydrophobie sur les séquences présentant des substitutions d'acides aminés particulières par approche bio-informatique : l'hypothèse de travail était que ces substitutions pourraient modifier les propriétés d'adhésion du virus et d'interaction avec son environnement proche, cellulaire chez les hôtes infectés, vivant ou inerte dans l'environnement extérieur.

I. Détermination de la charge virale en VHE

A. Rendement

Comme indiqué dans la partie « matériels et méthodes », l'analyse du rendement du prétraitement était effectuée à l'aide de l'ajout de FCV à l'état infectieux dans certains prélèvements avant le prétraitement. La comparaison entre la quantité de génome ajoutée dans l'échantillon avec celle effectivement retrouvée après RT-qPCR dans l'échantillon après le prétraitement nous permet d'estimer le rendement de l'étape de prétraitement.

Les données ont permis de calculer le rendement pour 3 prélèvements d'abattoir et 6 prélèvements de STEP. Nous supposons que les rendements sont en moyenne similaires pour les autres prélèvements du même type. La moyenne du rendement se situait à 1% avec un écart type de 1,7 pour les prélèvements d'abattoir et à 0,9% avec un écart type de 2,2 pour les prélèvements de STEP. Deux prélèvements d'abattoir présentaient un rendement inférieur à 1%, ce chiffre étant de 5 pour les prélèvements de STEP.

La norme NF EN ISO 15216 considère qu'un rendement est acceptable et donc que l'on peut travailler sur le prélèvement à partir de 1% [81].

B. Inhibition

Pour les échantillons humains, certains échantillons de selles présentaient une inhibition en rt-qPCR temps réel diagnostique et ont été directement travaillés dilués au 1/10^e ; l'inhibition n'excédait alors pas 90%. Pour les autres échantillons humains, l'inhibition ne dépassait pas 90% à l'exception du sérum de la patiente 11, qui présentait une inhibition supérieure à 99% et a donc été quantifié dilué au 1/100^e.

En ce qui concerne les échantillons environnementaux, la norme (qui traite de l'étude du virus de l'hépatite A et des norovirus dans l'environnement) précise qu'une inhibition allant jusqu'à 75% est considérée comme acceptable ; les prélèvements présentant une inhibition supérieure à 75% doivent être passés dilués au 1/10^e voire plus [81]. Pour les dreissènes, l'inhibition ne dépassait pas 65%. Pour les prélèvements de STEP, d'abattoir, de selles de cochon et de sanglier, l'inhibition allait jusqu'à plus de 99% et certains extraits ont donc dû être repassés dilués.

C. VHE

1. Échantillons humains

Nous avons travaillé sur 401 échantillons humains, dont 372 échantillons sanguins et 29 de selles. Cela correspondait à 324 patients. Quarante-deux échantillons sanguins (11%) et 14 de selles (48%) étaient positifs pour l'ARN du VHE.

Nous avons étudié au cours de ce travail des échantillons de 19 patients positifs. Les caractéristiques cliniques de ces patients sont résumées dans le [tableau 17](#). Douze de ces 19 patients étaient des femmes, la moyenne d'âge était de 54 ans, et les patients avaient tous entre 31 et 86 ans. Trois patients présentaient une hépatite sévère, avec un TP entre 47 et 49%. Neuf patients étaient immunodéprimés : quatre étaient sous chimiothérapie anti-cancéreuse, deux avaient une cirrhose et trois étaient transplantés d'organe solide. Quinze des 19 patients ont présenté des signes cliniques (les quatre autres patients ont été diagnostiqués suite à la mise en évidence d'une cytolyse hépatique biologique) : asthénie, fièvre, douleurs abdominales, nausées, vomissements, ictère... Les trois patients souffrant

d'hépatite sévère ont présenté des signes cliniques. La sérologie IgM a été réalisée chez 18 de nos 19 patients ; elle était positive chez tous les patients à l'exception de la patiente 15 (patiente immunodéprimée, traitée par chimiothérapie pour un lymphome de haut grade) et de la patiente H5297 (patiente immunodéprimée suite à une transplantation rénale).

Les charges virales de ces 19 patients étaient comprises entre $6,7 \times 10^3$ et $2,1 \times 10^8$ UI/ml (moyenne : $1,6 \times 10^7$ UI/ml) pour les échantillons sanguins et entre $2,1 \times 10^4$ et $7,7 \times 10^7$ UI/ml (moyenne : $3,8 \times 10^8$ UI/ml) dans les selles (figure 24).

2. *Échantillons animaux*

Nous avons travaillé sur 29 échantillons de selles de cochons de ferme. Tous étaient négatifs.

Nous avons travaillé sur 23 échantillons de foie et 19 échantillons de selles prélevés sur des sangliers dans notre région. Deux échantillons de foie (8,7%) et l'échantillon de selles de l'un de ces deux sangliers (5,3%) étaient positifs. Ces deux sangliers étaient issus de la même battue. Les échantillons du chevreuil étaient négatifs.

Les charges virales étaient de $7,5 \times 10^6$ et $1,0 \times 10^7$ UI/g dans les prélèvements de foie et la charge virale du prélèvement de selles était de $2,0 \times 10^7$ UI/g (figure 24).

3. *Prélèvements d'eaux usées d'abattoir*

Nous avons travaillé sur 30 prélèvements d'eaux usées d'un abattoir porcin dans les Vosges. Dix-huit étaient positifs (60%). Les charges virales étaient comprises entre $1,3 \times 10^{-1}$ et $6,4 \times 10^3$ UI/ml (moyenne : $3,8 \times 10^2$ UI/ml) (figure 24).

4. *Prélèvements d'eaux usées urbaines*

Nous avons travaillé sur 30 prélèvements d'eaux usées urbaines à l'entrée d'une STEP drainant le « grand Nancy ». Six prélèvements étaient positifs (20%). Les charges virales étaient comprises entre $2,7 \times 10^{-1}$ et $1,4 \times 10^1$ UI/ml (moyenne : 5,7 UI/ml) (figure 24).

5. Prélèvements de dreissènes

Treize sites ont été échantillonnés sur la région. Les emplacements ont été choisis selon une étude toxicologique effectuée par l'agence de l'eau, visant à évaluer les dreissènes en tant que marqueurs de pollution chimique [263]. Une étude réalisée par notre équipe a recherché la présence de phages (sans les typer) dans ces prélèvements de dreissènes, afin d'appréhender la pollution fécale des sites (figure 25). Nous avons également récupéré les données sur le type de milieu, et donc le type de pollution. Sur les 13 sites échantillonnés, seul le site de Petite-Rosselle était possiblement positif en VHE : nous avons obtenu un signal faiblement positif en rt-qPCR en temps réel, une bande en rt-PCR point final mais le séquençage direct a échoué. Lors de la ré-amplification en vue du séquençage haut débit, la rt-PCR a fonctionné une seule fois sur les deux tentatives. Nous avons extrait les acides nucléiques d'un autre aliquot du même broyat de dreissènes : la rt-qPCR en temps réel et la rt-PCR en point final n'ont donné aucun signal ; un séquençage direct tenté sur le produit de rt-PCR en point final n'a pas donné de signal exploitable.

Tableau 17 : Caractéristiques des patients

NA: non applicable, NR: non réalisé, N: normal, XN: X multiples de la limite supérieure de la normale, ALAT: alanine aminotransférase, TP : taux de prothrombine, UI : unités internationales.

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
|---|---|---|---|--|---|---|
| Date de naissance (jj/mm/aaaa) | 12/07/1943 | 16/05/1954 | 19/07/1983 | 07/05/1979 | 15/10/1935 | 29/08/1970 |
| Age lors du prélèvement | 71 | 61 | 32 | 34 | 80 | 46 |
| Sexe | F | M | F | F | M | M |
| Date du prélèvement (jj/mm/aaaa) | 02/06/2015 (sang) | 03/01/2016 (sang) | 17/09/2015 (sang) | 27/02/2015 (sang) | 02/03/2015 (selles) | 06/04/2017 (sang) |
| Sérologie VHE IgG | Positive | Positive | Négative | Positive | NA | NR |
| IgM | Positive | Positive | Positive | Positive | NA | Positive |
| Concentration en ARN (UI/ml ou UI/g) | 7,3x10 ⁵ | 3,5x10 ⁵ | 4,4x10 ⁷ | 2,0x10 ⁵ | 7,7x10 ⁷ | 3,1x10 ⁵ |
| ALAT | 14N | 15N | 5,2N (74N 4 jours plus tard) | 61N | 36N | 4,05N |
| TP (%) | 100 | 63 | 49 | 91 | 94 | 73 |
| Contexte | Découverte d'une cytolyse hépatique biologique. Asthénie, symptômes digestifs | Cirrhose (hépatite C guérie) Hépatite aiguë | Traitée par chimiothérapie pour un cancer du sein Fièvre, nausées, myalgies Hépatite aiguë, avec TP abaissé (49%) | Traitée par chimiothérapie pour un cancer du sein Découverte d'une cytolyse hépatique biologique Fièvre (39°C), asthénie, myalgies, diarrhée, vomissements, toux | Ictère Diarrhée Anorexie et perte de poids (12kg en quelques mois) Apyrexie | Découverte d'une cytolyse hépatique biologique Asthénie |
| Hépatite E aiguë/chronique | Stabilisation clinique | Aiguë | Aiguë | Aiguë | Stabilisation clinique | Stabilisation clinique |
| Suivi | Suivi pour une maladie de Crohn | Suivi pour un diabète et une cirrhose post hépatite C | Suivi pour un cancer du sein | Suivi pour un cancer du sein | Non suivi | Non suivi |

Tableau 17 (suite) : Caractéristiques des patients. NA: non applicable, NR: non réalisé, N: normal, XN: X multiples de la limite supérieure de la normale, ALAT: alanine aminotransférase, TP : taux de prothrombine, UI : unités internationales.

| | P7 | | P8 | | P9 | | P10 | | P11 | | P12 | | P13 | |
|---|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|---|--|
| Date de naissance (jj/mm/aaaa) | 24/01/1951 | | 17/07/1977 | | 07/08/1967 | | 21/04/1968 | | 24/06/1931 | | 08/04/1965 | | 04/08/1972 | |
| Age lors du prélèvement | 66 | | 40 | | 50 | | 49 | | 86 | | 52 | | 46 | |
| Sexe | M | | F | | F | | F | | F | | F | | M | |
| Date du prélèvement (jj/mm/aaaa) | 28/06/2017 (sang) | | 04/07/2017 (selles) | | 29/08/2017 (sang) | | 20/02/2018 (sang) | | 25/03/2018 (sang) | | 27/05/2018 (sang) | | 11/12/2017 (sang) | |
| Sérologie VHE IgG | NR | | NA | | NR | | NR | | NR | | NR | | NR | |
| IgM | Positive | | NA | | Positive | | Positive | | Positive | | Positive | | NR | |
| Concentration en ARN (UI/ml ou UI/g) | 6,7x10 ³ | | 2,1x10 ⁴ | | 7,2x10 ³ | | 3,3x10 ⁶ | | 5,7x10 ⁵ | | 1,2x10 ⁶ | | 9,9x10 ³ | |
| ALAT | 51,5N | | 13,7N | | 7,6N | | 17,3N | | 63,7N | | 16,7N (42,4N 5 jours plus tard) | | 6,7N | |
| TP (%) | 47 | | 63 | | 95 | | 48 | | 89 | | 58 (Apixaban) | | 94 | |
| Contexte | Fièvre Toux Asthénie Découverte d'une cirrhose (cause inconnue) avec ascite Découverte d'une cytolyse hépatique biologique | | Syndrome grippal Anorexie Urines foncées | | Traitée par chimiothérapie pour un cancer gastrique Fièvre, douleur de l'hypocondre droit, Cytolyse hépatique Évolution vers une encéphalopathie hépatique | | Ictère, douleur abdominale, symptômes digestifs, asthénie, urines foncées | | Asthénie, ictère, urines foncées Anémie syndrome inflammatoire | | Transplantée de foie (maladie de Rendu-Osler) Découverte d'une cytolyse hépatique biologique | | Douleurs épigastriques, prurit, ictère | |
| Hépatite E aiguë/chronique | NA | | Aiguë | | NA | | Stabilisation clinique | | Stabilisation clinique | | Aiguë | | (Suivi en cours) | |
| Suivi | Décédé le 10/07/2017 dans un contexte d'insuffisance rénale aiguë (cause indéterminée) | | Suivie pour des tumeurs bénignes du foie | | Décédée le 24/02/2018, probablement à cause de l'hépatite E | | Non suivie | | Non suivie | | Suivie dans le cadre de la transplantation hépatique | | Suivi pour hépatite E durant plusieurs mois | |

Tableau 17 (suite) : Caractéristiques des patients. NA: non applicable, NR: non réalisé, N: normal, XN: X multiples de la limite supérieure de la normale, ALAT: alanine aminotransférase, TP : taux de prothrombine, UI : unités internationales.

| | P14 | | P15 | | | P16 | H4785 | H4661 | H5297 |
|---|---|---------------------|---|---------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------------|---|---|
| Date de naissance (jj/mm/aaaa) | 29/04/1955 | | 18/07/1987 | | | 16/01/1947 | Non renseigné | Non renseigné | Non renseigné |
| Age lors du prélèvement | 63 | | 31 | | | 71 | 66 | 31 | 44 |
| Sexe | M | | F | | | F | M | F | F |
| Date du prélèvement (jj/mm/aaaa) | 22/11/2018 (sang) | 10/12/2018 (selles) | 29/11/2018 (sang) | 28/12/2018 (sang) | 10/01/2019 (selles) | 05/05/2018 (sang) | 27/07/2017 (sang) | 07/06/2017 (sang) | 26/04/2018 (sang) |
| Sérologie VHE IgG | NR | NA | NR | NR | NA | NR | NR | NR | NR |
| IgM | Positive | NA | NR | Négative | NA | Positive | Positive | Positive | Négative |
| Concentration en ARN (UI/ml ou UI/g) | 2,1x10 ⁸ | 1,7x10 ⁹ | 4,6x10 ⁷ | 9,8x10 ⁵ | 2,3x10 ⁴ | 1,7x10 ⁴ | NR | NR | NR |
| ALAT | 2,3N le 26/11/2018 | NR | 6,6N | 49,7N | 3,6N | 4,7N | 5,8N | 43,8N | N |
| TP (%) | 100 | NR | 100 | 100 | NR | 88 le 06/05/2018 | 100 | 100 | 100 |
| Contexte | Deux fois transplanté rénal (néphropathie diabétique et vasculaire) Cirrhose de cause inconnue (syndrome métabolique dû à l'obésité ?) Découverte d'une cytolyse hépatique biologique plusieurs mois avant le diagnostic de VHE | | Traitement par chimiothérapie pour lymphome de haut grade Découverte d'une cytolyse hépatique biologique Ictère, prurit | | | Douleurs abdominales | Hépatomégalie, cytolyse hépatique | Asthénie, ictère, nausées, douleurs abdominales, urines foncées, cytolyse hépatique | Transplantée rénale en 2013 Présence d'une cytolyse hépatique à la découverte |
| Hépatite E aiguë/chronique | Chronique ARN du VHE toujours positif dans le sang en juin 2019 | | Aiguë mais traitement par ribavirine (nécessité de poursuite de la chimiothérapie dans les plus brefs délais) | | | Stabilisation clinique | Aiguë | Aiguë | Chronique |
| Suivi | Suivi pour cirrhose et hépatite E | | Suivie pour le lymphome | | | Non suivi | Suivi à Dijon | Suivie à Dijon | Suivie à Dijon |

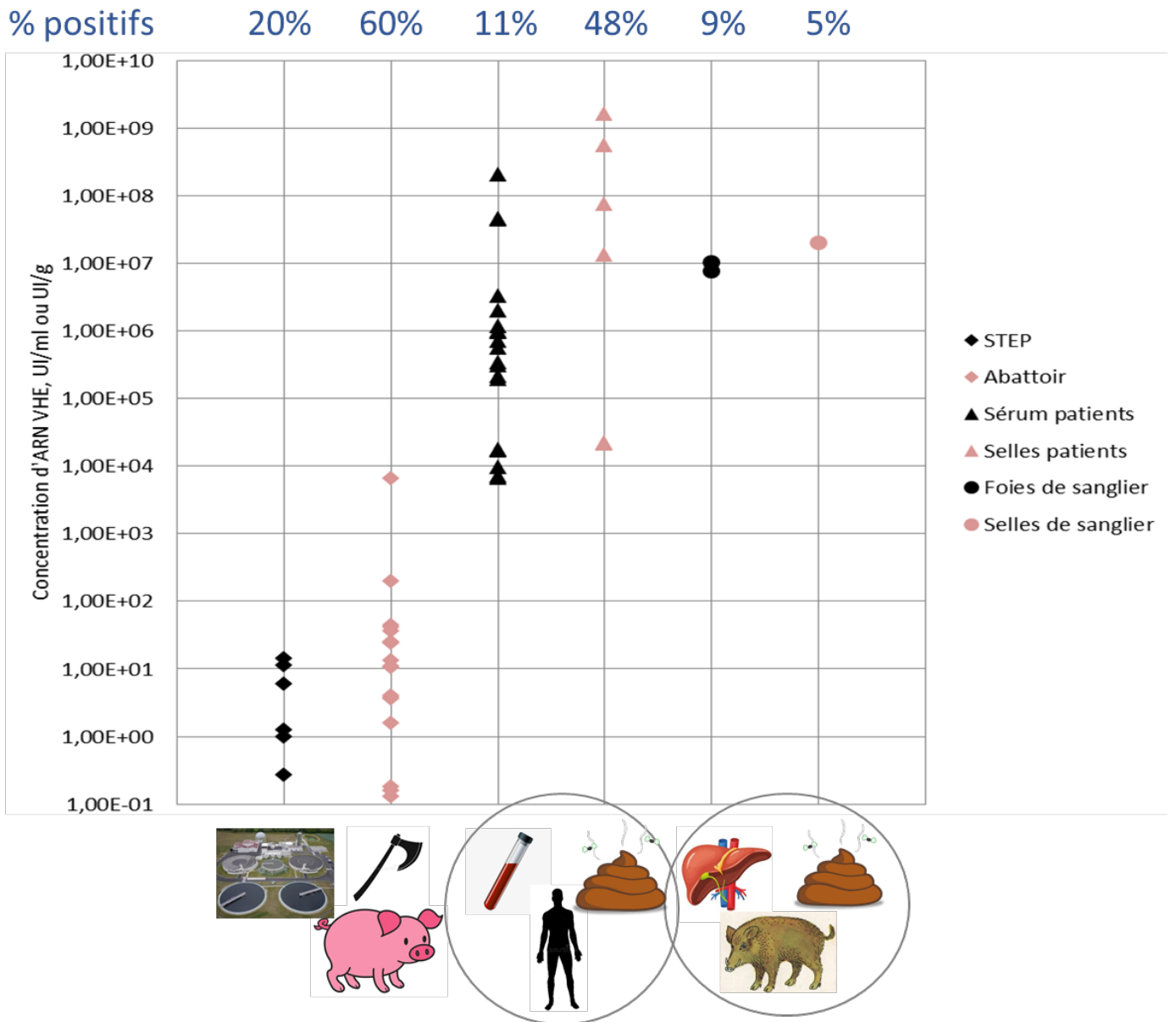


Figure 24 : Pourcentage de positifs et quantification du VHE

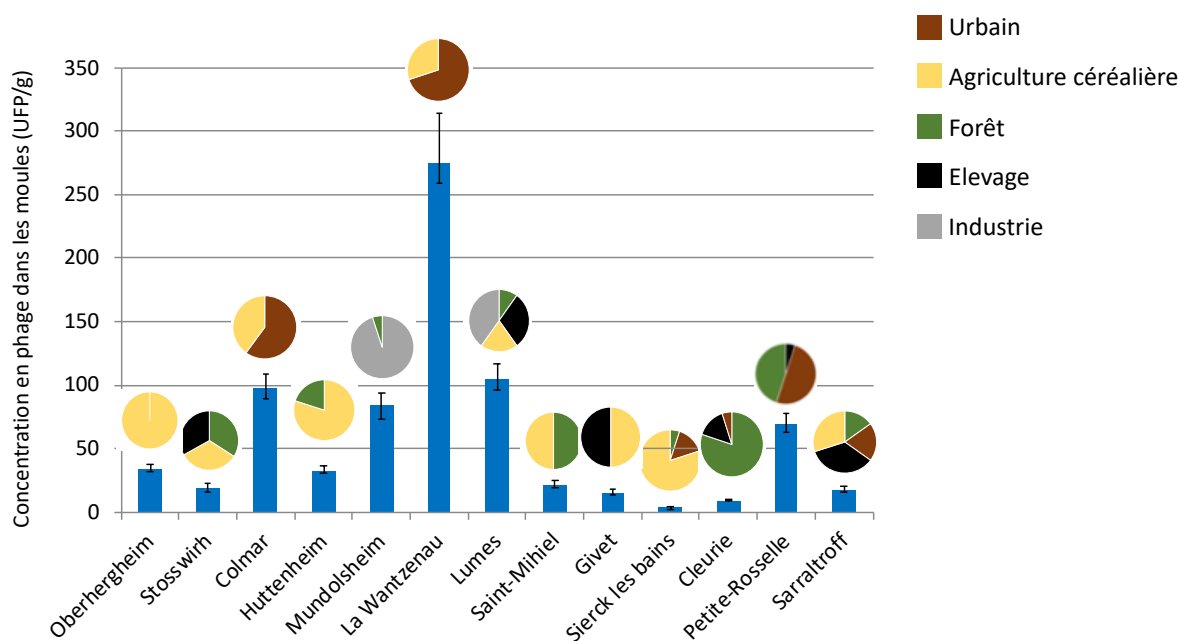


Figure 25 : quantification des bactériophages dans les dreissènes, et représentation du type de milieu dans lequel se situe le site

II. Répartition intra-échantillon

Le séquençage haut débit, en explorant de nombreux variants au sein de chaque échantillon permet d’appréhender la répartition intra-échantillon des différents variants, en plus de comparer les différentes quasi-espèces virales entre différents échantillons. Cette analyse a été effectuée sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3.

A. Nombre d’échantillons analysés

En UDS, sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3, nous avons pu obtenir des résultats pour 25 prélèvements de 19 patients (19 prélèvements sanguins et 6 de selles), 3 prélèvements d’animaux sauvages (le foie et la selle d’un sanglier et le foie d’un autre sanglier de la même battue), 6 prélèvements d’eaux usées d’abattoir porcin, 2 prélèvements d’entrée de station d’épuration, soit 36 prélèvements en tout.

B. Nombre de reads

Nous avons obtenu un nombre variable de *reads* dans les différents échantillons analysés par UDS. Pour les prélèvements de patients, le nombre moyen de *reads* était de 13530 pour les échantillons sanguins et 19798 pour les selles. Pour les prélèvements d'animaux, la moyenne était de 13433 *reads*. Pour les prélèvements d'abattoir, la moyenne était de 20897 *reads*. Les prélèvements de STEP comportaient 11402 *reads* en moyenne. Ces résultats étaient satisfaisants, dans la mesure où ces nombres de *reads* nous permettaient d'obtenir un nombre important d'informations.

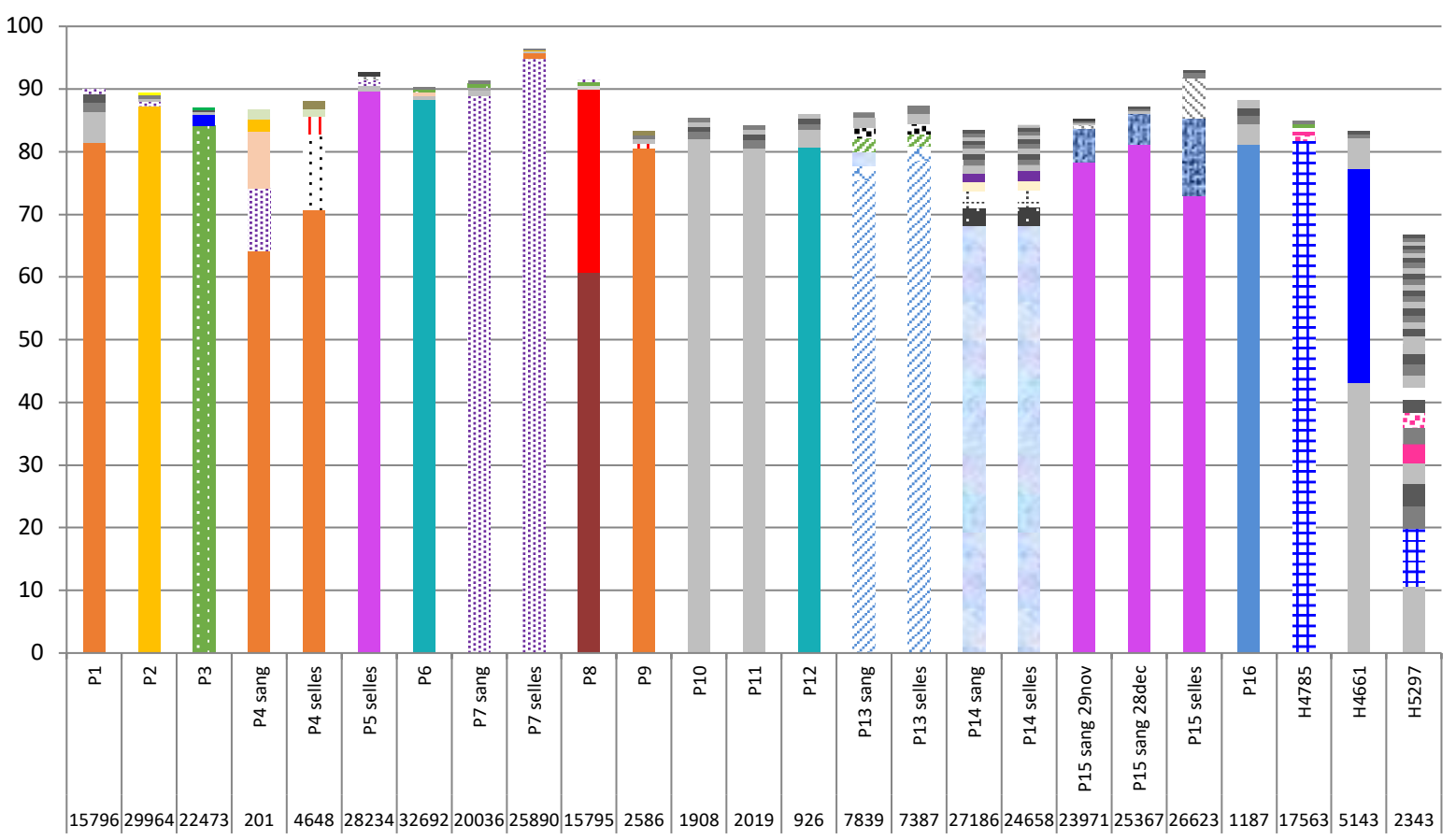
C. Distances génétiques intra-échantillon

Pour les patients, ces distances évaluées par le nombre de différences nucléotidiques entre variants d'une même quasi-espèce virale et mesurées par le logiciel MEGA6, étaient comprises entre 0,003 et 0,032 sauf pour une patiente de Dijon pour laquelle la distance était plus importante, à 0,063 (il s'agit d'une patiente infectée chroniquement par le VHE). Pour les animaux, les distances étaient comprises entre 0,002 et 0,009. Pour les prélèvements d'abattoir, les distances étaient comprises entre 0,002 et 0,019. Pour les prélèvements de STEP, les distances étaient de 0,057 et 0,084, soit des distances plus importantes que dans les autres types de prélèvements.

D. Répartition des variants viraux du VHE au sein des échantillons

Les résultats de cette analyse sont représentés sur les [figures 26 et 27](#). La majorité des prélèvements humains et animaux présentent un variant très majoritaire représentant au moins 75% de la quasi-espèce et des variants minoritaires. Pour les prélèvements des patientes 4 et 8, le deuxième variant est relativement important et représente jusqu'à 30% de la quasi-espèce. Pour le patient 14, le variant majoritaire ne représente que 68% de la quasi-espèce et les premiers variants minoritaires représentent chacun plus de 1% de la quasi-espèce. Deux prélèvements issus de patients de Dijon présentent un profil particulier : la patiente H4661 présente deux variants majoritaires (à noter que cette répartition est retrouvée en nucléotides et en acides aminés dans le cadre de lecture ORF3, mais pas dans le cadre de lecture ORF2 ([figure 28](#))) tandis que la patiente H5297 présente une coexistence de nombreux variants (il est à noter que cette patiente est infectée chroniquement par le

VHE). Les prélèvements de STEP présentent une répartition avec non pas un variant majoritaire mais plutôt une coexistence de nombreux variants.



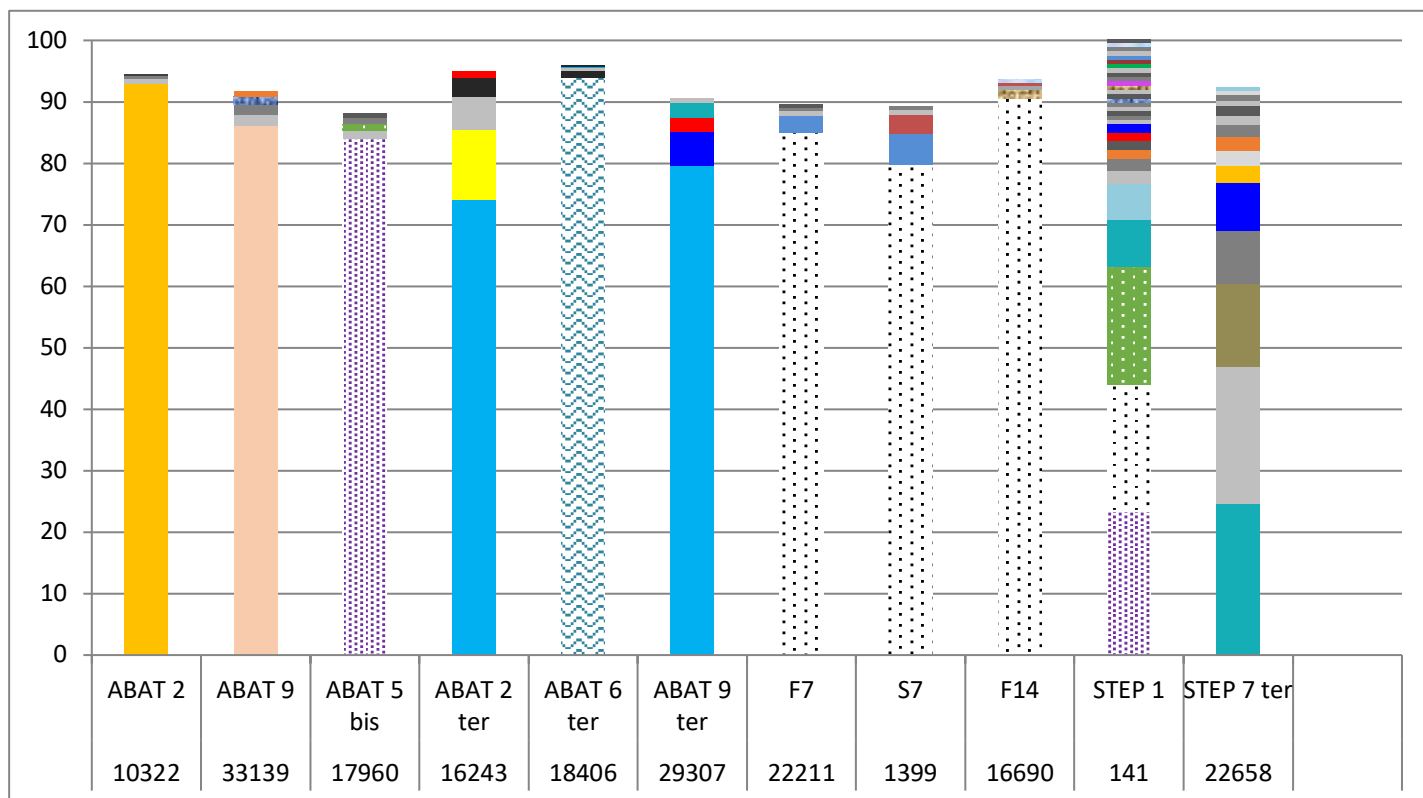
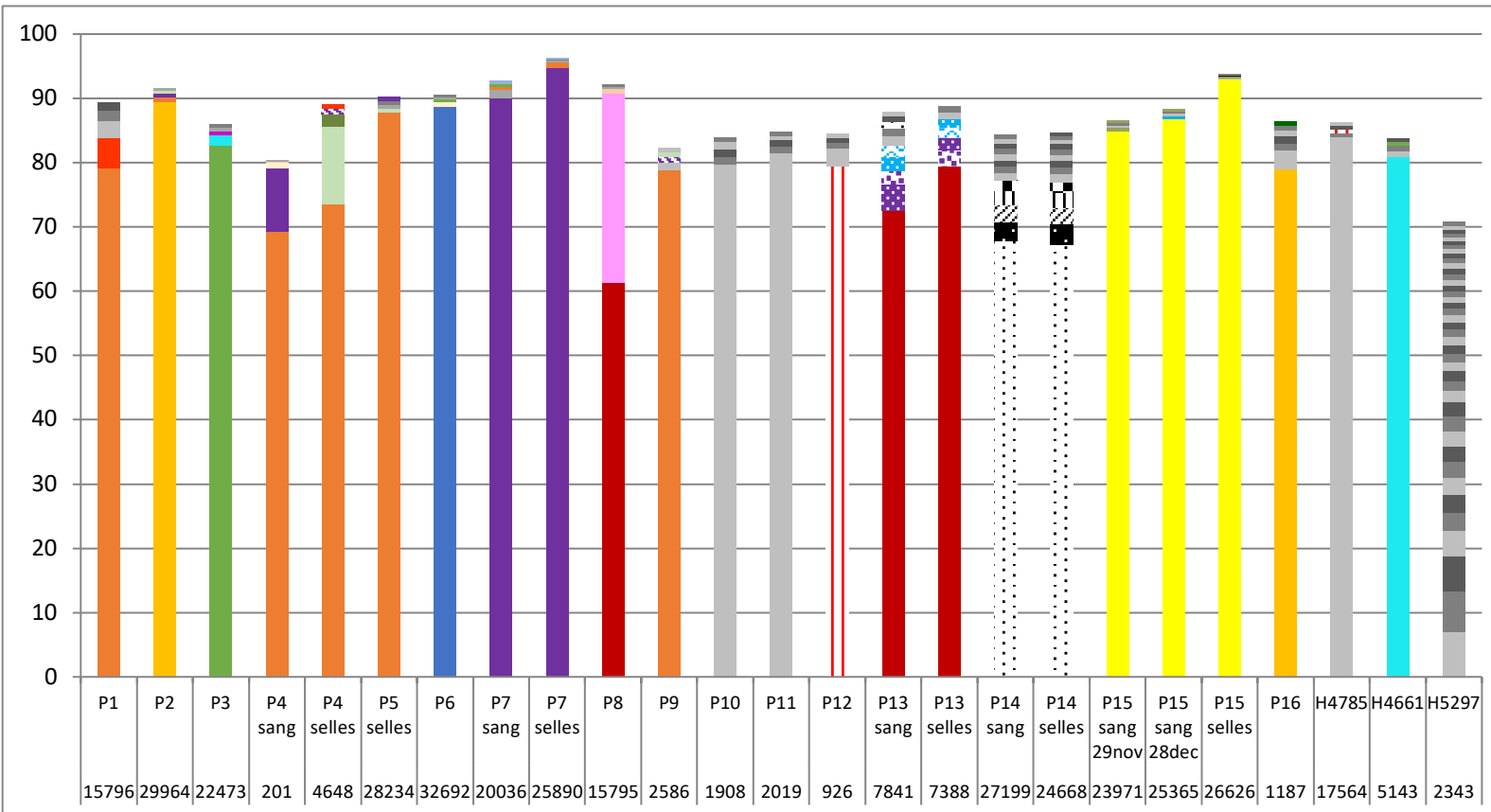


Figure 26 : Représentation de la proportion des différents variants au sein de chaque prélèvement en acides aminés dans le cadre ORF3

Chaque couleur ou motif coloré représente une séquence particulière, sauf le gris qui représente des séquences uniques ou très minoritaires. Les nombres correspondent au nombre de *reads* du prélèvement. ABAT : prélèvement d'eaux usées d'abattoir, F7 : foie du sanglier 7, S7 : selles du sanglier 7, F14 : foie du sanglier 14, STEP : prélèvement d'eaux usées urbaines, P1 à P16 et H4785, H4661 et H5297 : patients.



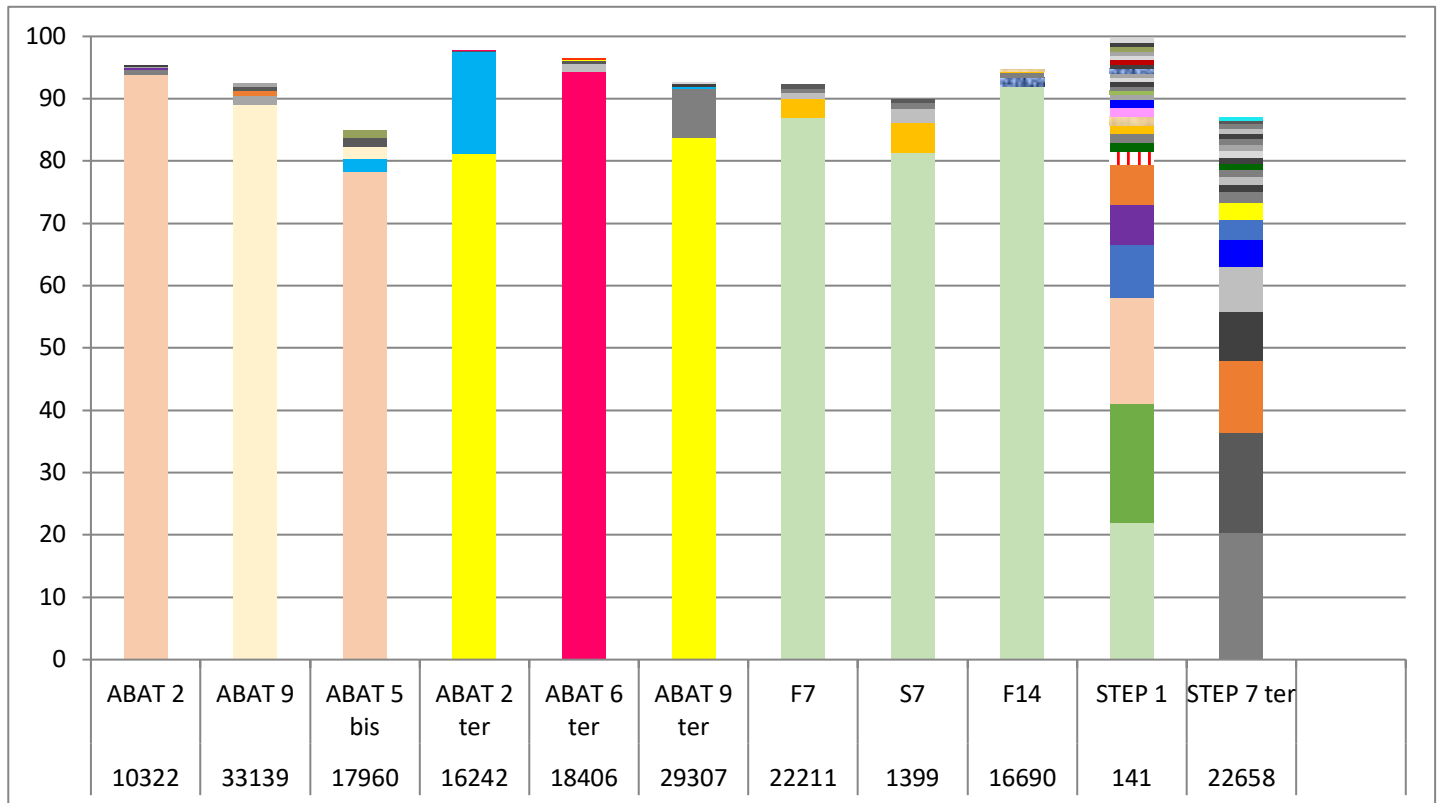


Figure 27 : Représentation de la proportion des différents variants au sein de chaque prélèvement en acides aminés dans le cadre ORF2

Chaque couleur ou motif coloré représente une séquence particulière, sauf le gris qui représente des séquences uniques ou très minoritaires. Les nombres correspondent au nombre de *reads* du prélèvement. ABAT : prélèvement d'eaux usées d'abattoir, F7 : foie du sanglier 7, S7 : selles du sanglier 7, F14 : foie du sanglier 14, STEP : prélèvement d'eaux usées urbaines, P1 à P16 et H4785, H4661 et H5297 : patients.

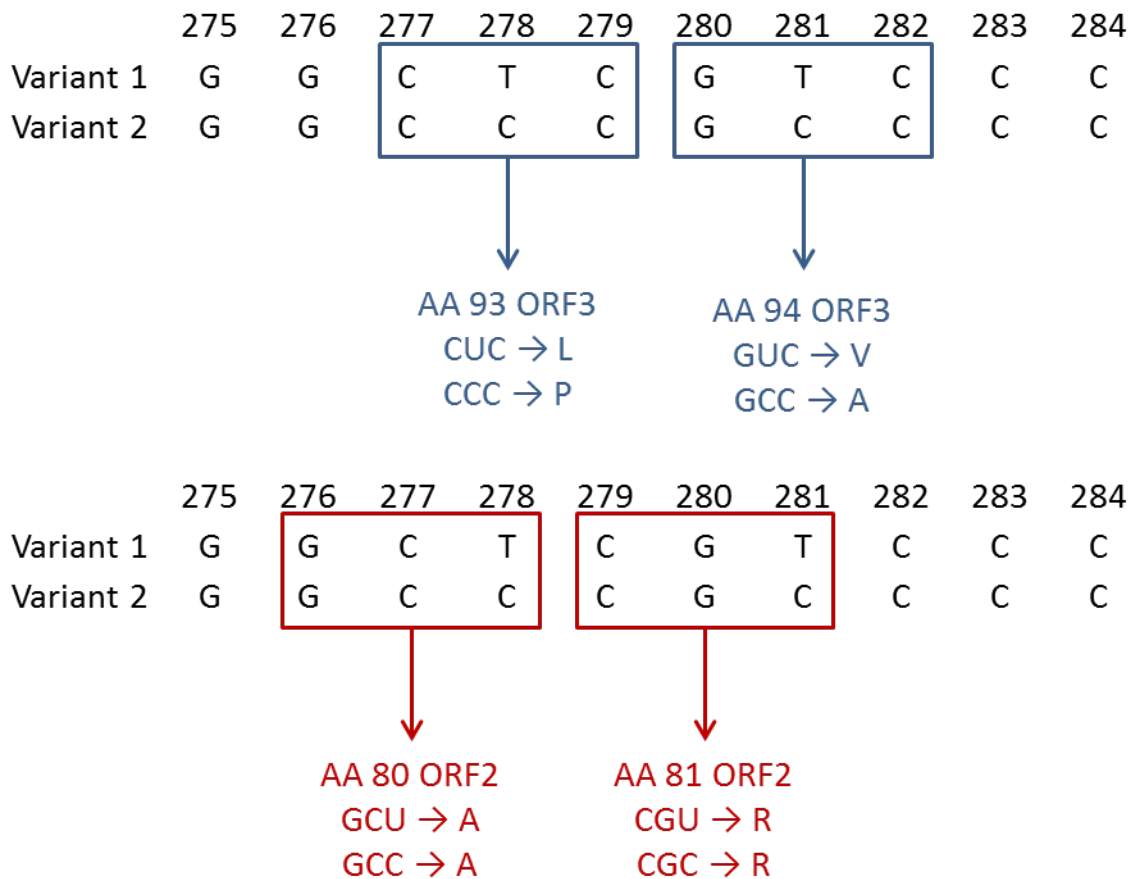


Figure 28 : Présence de deux variants majoritaires en nucléotides et en acides aminés dans le cadre ORF3 mais pas dans le cadre ORF2 chez la patiente H4661
 Les nucléotides sont numérotés à partir du début d'ORF3.

III. Séquençage – étude du domaine M d'ORF2 du VHE

A. Échantillons séquencés

Pour le séquençage du domaine M d'ORF2, nous avons pu séquencer 6 prélèvements : 5 prélèvements humains (4 sanguins et un fécal) et un prélèvement hépatique de sanglier.

B. Étude des variants du VHE obtenus en séquençage haut débit

Dans chaque prélèvement, le variant majoritaire était identique à la séquence de référence et représentait au minimum 64% de la quasi-espèce. Les séquences des principaux variants sont représentées sur la [figure 29](#).

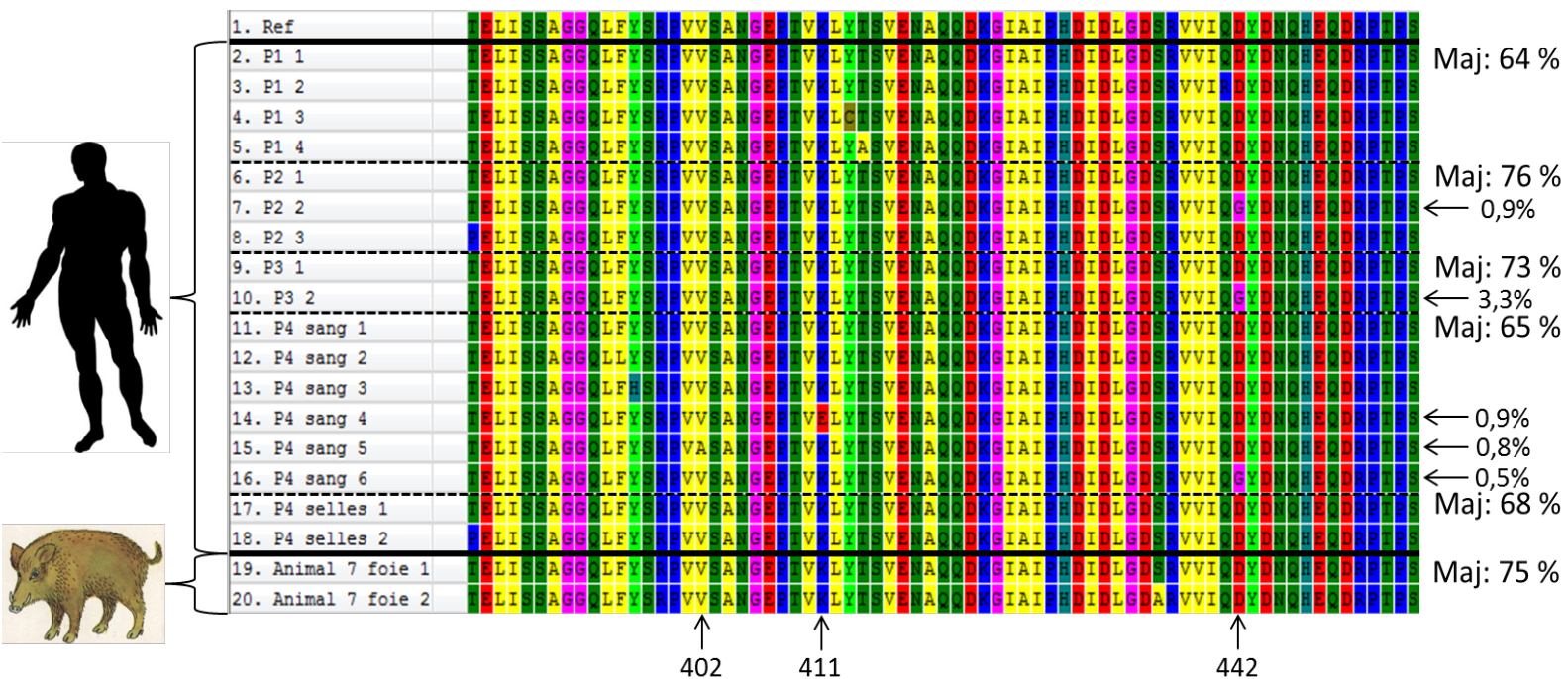


Figure 29 : Séquences obtenues en séquençage haut débit sur la région ORF2 M en acides aminés

Le pourcentage de représentation du variant majoritaire dans la quasi-espèce est indiqué pour chaque prélèvement. V : Valine, A : Alanine, K : Lysine, E : Acide glutamique, D : Acide aspartique, G : Glycine.

Dans les variants minoritaires, plusieurs substitutions d'acides aminés peuvent être observées. Dans des variants minoritaires des prélèvements des patients 2, 3 et 4, en position 442, l'acide aspartique est remplacé par une glycine (figure 29). Dans un variant minoritaire du sang de la patiente 4, la lysine en position 411 est remplacée par un acide glutamique. Dans un autre variant du même prélèvement, en position 402, la valine est remplacée par une alanine.

C. Antigénicité et hydrophobie prédites par bio-informatique

Des prédictions antigéniques ont été réalisées à l'aide du logiciel AnTheProt (figure 30). D'après les calculs de ce logiciel, la substitution D442G entraîne une baisse de l'antigénicité de 29%, la substitution K411E entraîne une baisse de l'antigénicité de 17% et la substitution V402 entraîne une augmentation de l'antigénicité de 21%.

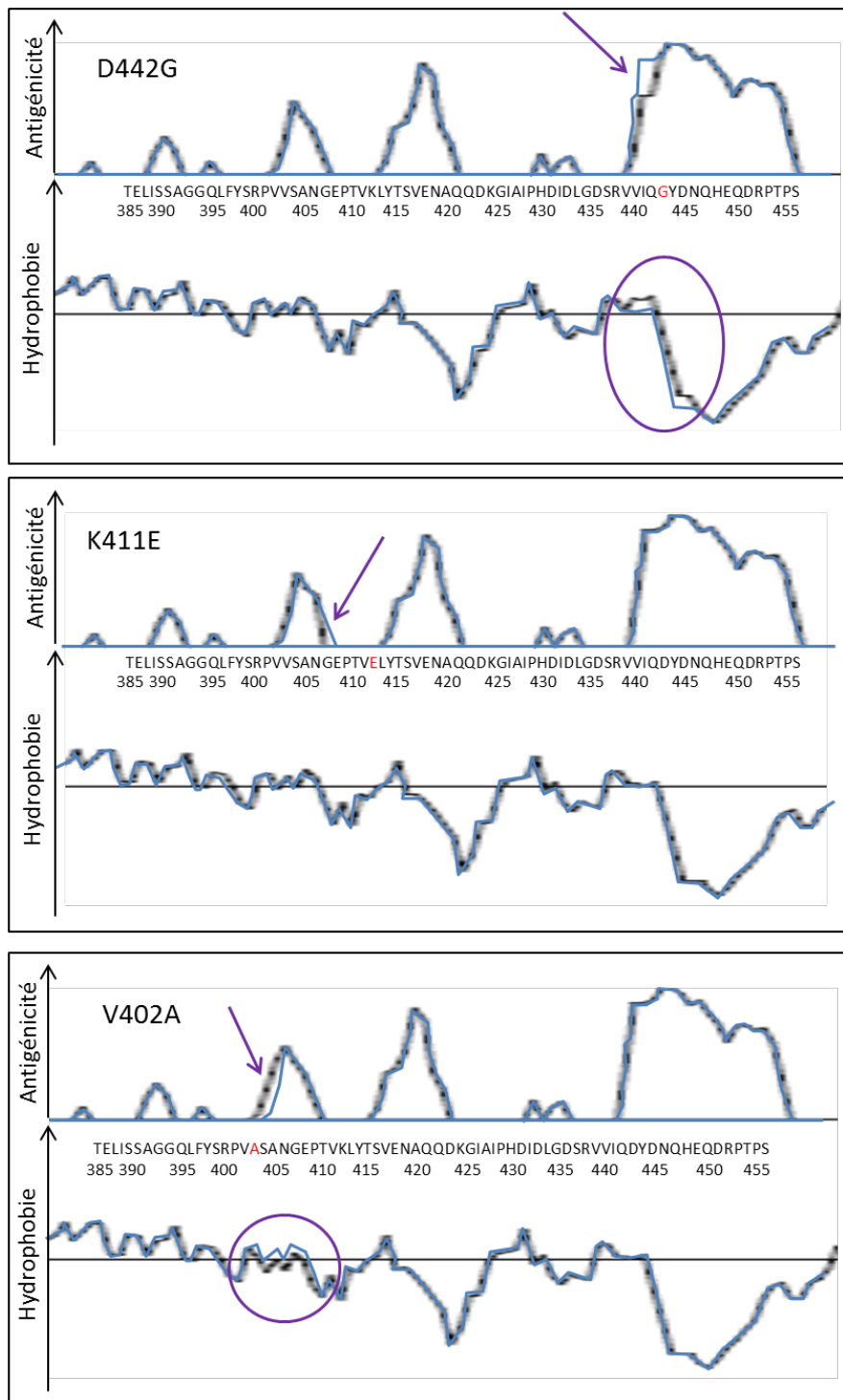


Figure 30 : Représentation de l'antigénicité et de l'hydrophobie prédites de substitutions d'acides aminés dans le domaine M d'ORF2

Le tracé bleu représente la séquence AB369687 ; le tracé noir représente les séquences avec les substitutions D442G (haut), K411E (milieu) et V402A (bas). Les numéros des acides aminés sont indiqués. Les acides aminés en rouge correspondent aux substitutions.

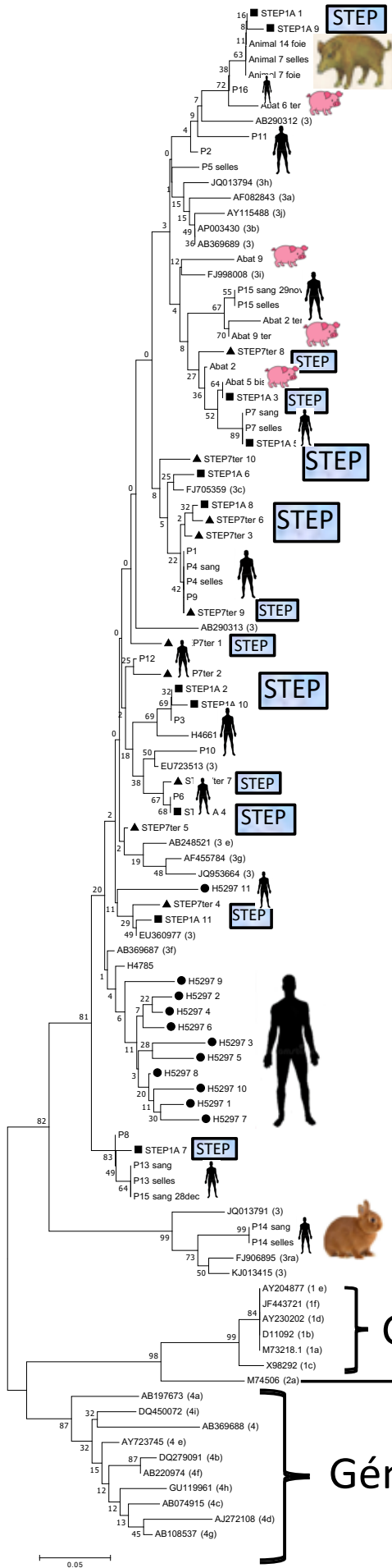
IV. Séquençage – étude de la zone de chevauchement ORF2/ORF3

A. Échantillons séquencés

En utilisant le système d'amorces décrit par Inoue [259], nous avons pu séquencer 36 prélèvements : 25 prélèvements humains (19 sanguins et 6 fécaux), 3 prélèvements de sangliers (2 hépatiques et un fécal), 6 prélèvements d'eaux usées d'abattoir, 2 prélèvements de STEP.

B. Génotype

Une analyse phylogénique a été réalisée en utilisant des séquences de référence des génotypes 1 à 4 d'après l'étude de l'équipe de Smith [7], et se basant sur les séquences nucléotidiques. Elle montre que les séquences issues des prélèvements de notre étude sont rattachées aux séquences de référence de génotype 3 (figure 31).



Génotype 3

Figure 31 : Comparaison des séquences nucléotidiques avec des séquences de référence des génotypes 1 à 4 du VHE
 Pour les prélèvements de STEP et du patient H5297 (infection chronique connue) les variants représentant au moins 1% de la quasi-espèce ont été représentés (H5297 ●, STEP1A ■, STEP 7ter ▲). Pour les autres prélèvements, seul le variant majoritaire ou la séquence obtenue en séquençage direct a été représentée.

Génotype 1

Génotype 2

Génotype 4

C. Recherche de « signatures » en acides aminés

La comparaison des séquences – obtenues par séquençage direct – en acides aminés dans les deux cadres de lecture, ORF2 et ORF3, a permis de noter la présence d'acides aminés retrouvés de manière plus fréquente dans certains types de prélèvements par rapport à certains autres et pouvant ainsi être rattachés à un type de prélèvement plutôt qu'à un autre. Ceci est représenté sur les figures 32 et 33. Nous n'avons pas pu obtenir de séquence par séquençage direct pour le patient 16 (nous n'avons donc pu obtenir de séquence que pour 24 prélèvements humains).

Sur le cadre de lecture ORF3 (figure 32), à la position 81, une cystéine est présente dans les prélèvements de sangliers, ainsi que dans 25% des variants d'un des prélèvements de STEP et pas dans les autres séquences majoritaires : 12 des 24 prélèvements humains présentent une arginine et les 12 autres une histidine et tous les prélèvements d'origine porcine présentent une arginine. Un des patients humains (P14) (sang et selles) présentait une séquence proche de celles d'isolats de VHE provenant de lapins. Nous avons pu, avec les prélèvements de ce patient ainsi que des séquences de référence de lapins, identifier une probable combinaison de « signatures » : sur le cadre ORF3, il s'agit de la présence d'une proline en position 87, d'une asparagine en position 88, d'une proline en position 89 et d'une glycine en position 90 ; cette signature est en général associée à une leucine en position 77, une histidine en position 81 et une isoleucine en position 82 (figure 32).

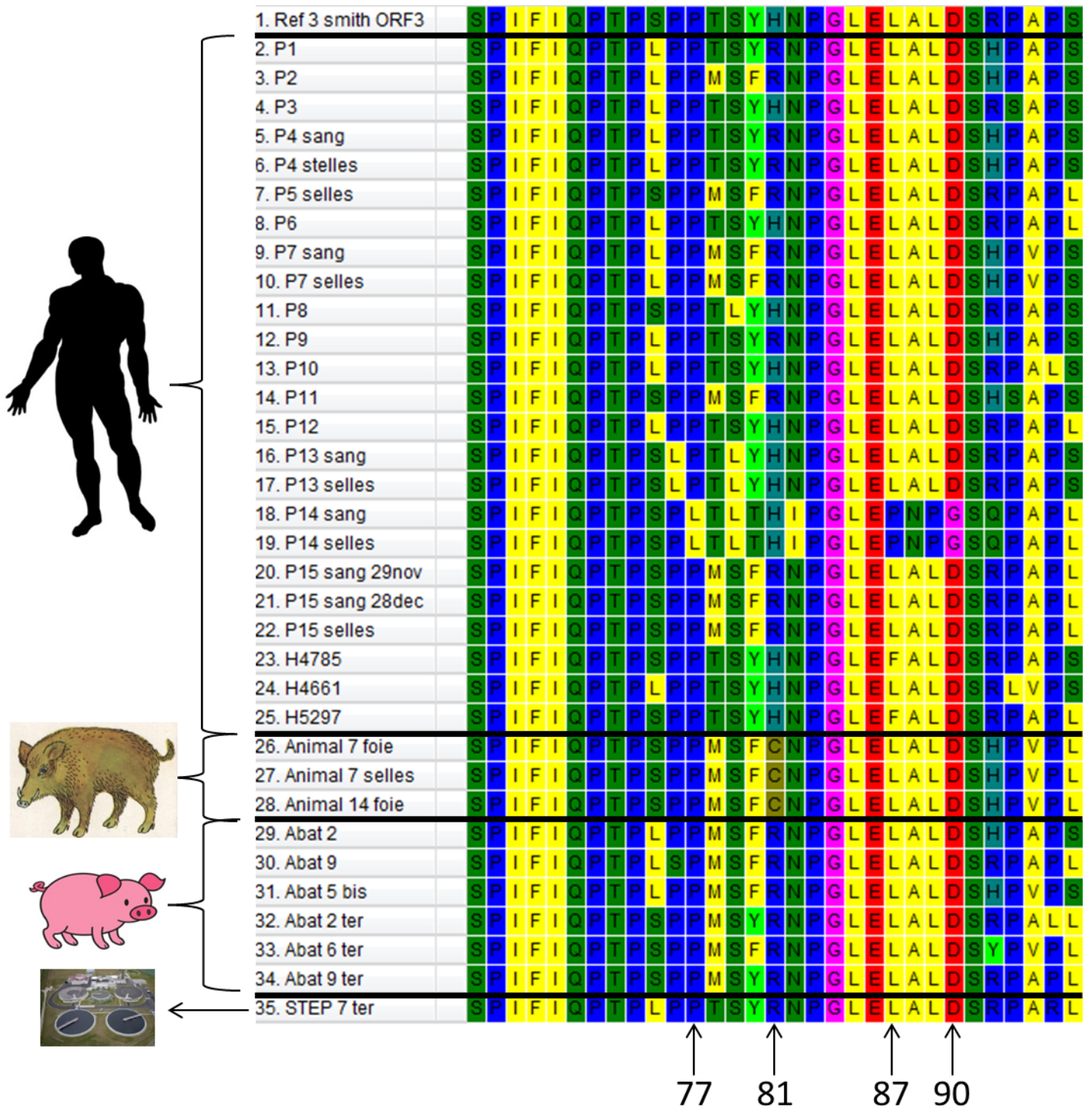


Figure 32 : Séquences en acides aminés de la zone de chevauchement

ORF2/ORF3, cadre de lecture ORF3 du VHE

Analyse par le logiciel MEGA 6. R : Arginine, H : Histidine, C : Cystéine, P :

Proline, N : Asparagine, G : Glycine, L : Leucine et I : Isoleucine.

Dans le cadre de lecture ORF2 (figure 33), la position 68 correspond à la position 81 dans le cadre de lecture ORF3. En position 68, 14 des 24 prélèvements humains présentent une proline, les prélèvements de sanglier présentent une leucine et les prélèvements d'origine porcine présentent tous une sérine. Nous retrouvons également une probable combinaison de « signatures » de virus provenant de lapins : il s'agit de la présence, d'une phénylalanine en position 56, d'un acide aspartique en position 67, d'une histidine en position 69, d'une sérine en position 72 et d'une lysine en position 75 (figure 33).

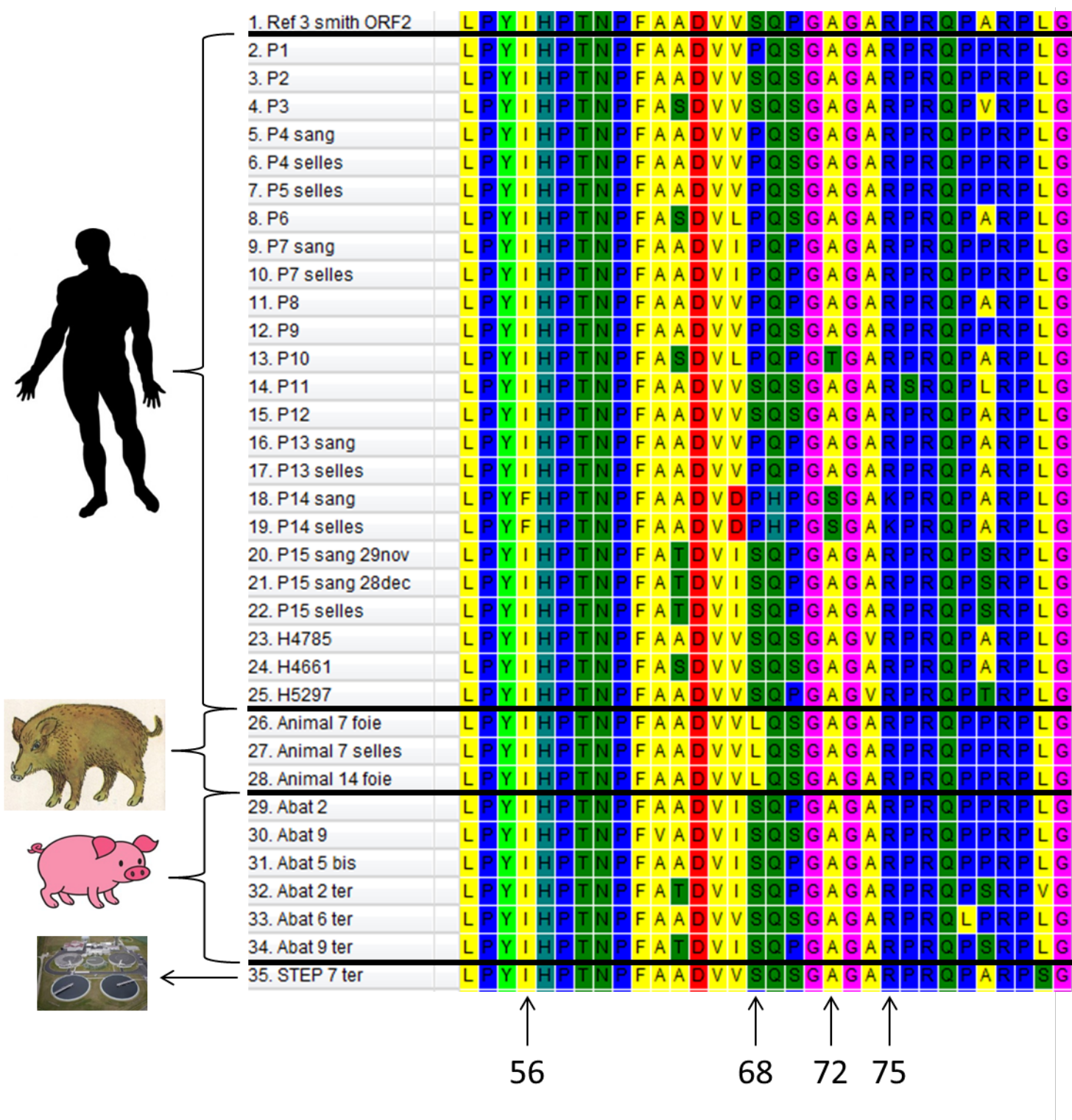


Figure 33 : Séquences en acides aminés de la zone de chevauchement

ORF2/ORF3, cadre de lecture ORF2 du VHE

Analyse par le logiciel MEGA. I : Isoleucine, F : Phénylalanine, P : Proline, S : Sérine
et L : Leucine, D : Acide aspartique, H : Histidine et K : Lysine.

D. Homologies entre types de prélèvements

D'après les séquences obtenues par séquençage direct, une séquence de synthèse a été déterminée pour chaque type de prélèvement en acides aminés dans les deux cadres de lecture, à l'aide du logiciel VESPA HCV. Les résultats sont représentés sur les figures 34 et 35.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Synthèse humains | S | P | I | F | I | Q | P | T | P | L | P | P | T | S | Y | R | N | P | G | L | E | L | A | L | D | S | R | P | A | P | S |
| 2. Synthèse animaux | S | P | I | F | I | Q | P | T | P | S | P | P | M | S | F | C | N | P | G | L | E | L | A | L | D | S | H | P | V | P | L |
| 3. Synthèse abattoirs version 1 | S | P | I | F | I | Q | P | T | P | L | P | P | M | S | F | R | N | P | G | L | E | L | A | L | D | S | R | P | A | P | L |
| 4. Synthèse abattoirs version 2 | S | P | I | F | I | Q | P | T | P | S | P | P | M | S | F | R | N | P | G | L | E | L | A | L | D | S | R | P | A | P | L |
| 5. P14 sang | S | P | I | F | I | Q | P | T | P | S | P | L | L | L | T | H | I | P | G | L | E | P | N | P | G | S | D | P | A | P | L |

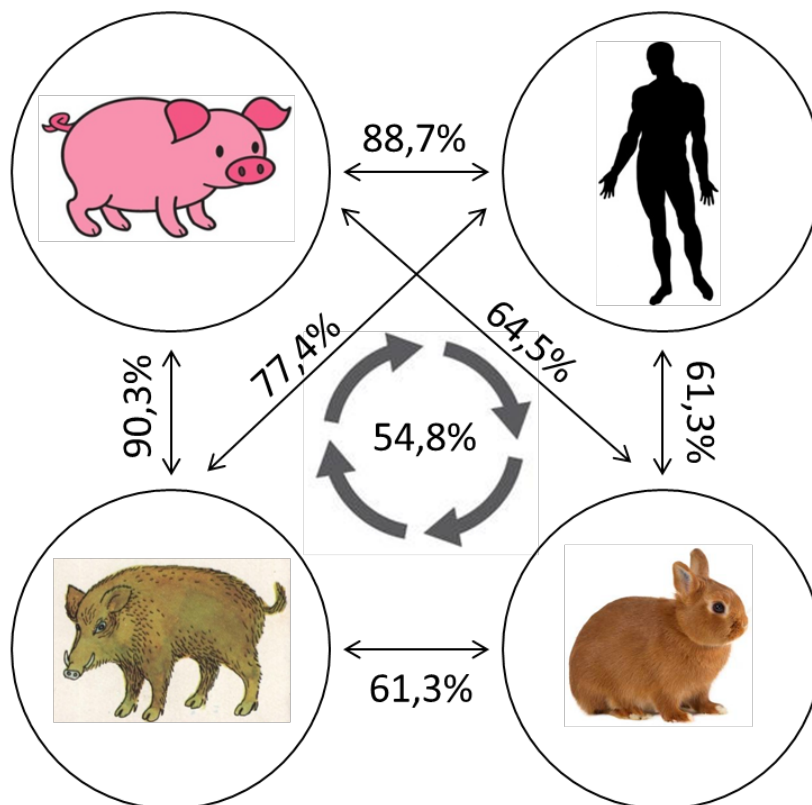


Figure 34 : Étude de l'homologie entre les séquences de VHE sur les différents types de prélèvement. L'étude est ici présentée sur la séquence en acides aminés dans le cadre de lecture ORF3.

Les séquences sont représentées en haut, les pourcentages d'homologie sont représentés en bas. Le patient 14 a été mis à part. A noter qu'il y a deux possibilités pour la séquence de synthèse des abattoirs : les deux sont représentées.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Synthese humains | L | P | Y | I | H | P | T | N | F | A | A | D | V | V | P | S | G | A | G | A | R | R | R | P | A | R | P | L | G | | |
| 2. Synthese animaux | L | P | Y | I | H | P | T | N | F | A | A | D | V | V | L | Q | S | G | A | G | A | R | R | Q | P | R | P | L | G | | |
| 3. Synthese abattoirs | L | P | Y | I | H | P | T | N | F | A | A | D | V | I | S | Q | P | G | A | G | A | R | R | Q | P | R | P | L | G | | |
| 4. P14 sang | L | P | Y | F | H | P | T | N | F | A | A | D | V | D | P | H | P | G | S | G | A | K | P | R | Q | P | A | R | P | L | G |

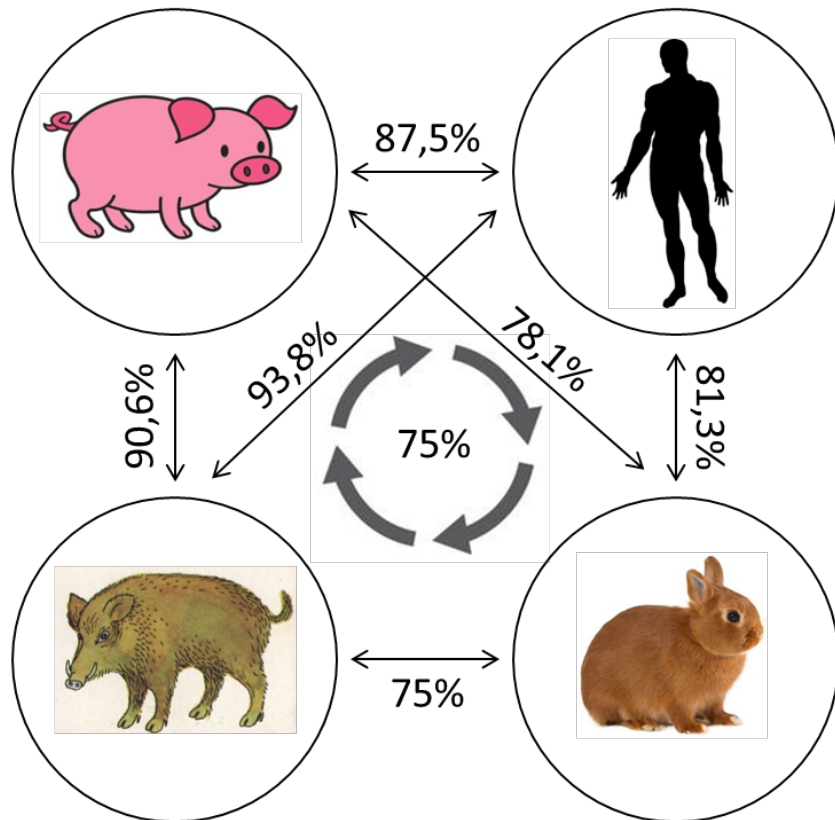


Figure 35 : Étude de l'homologie entre les séquences de VHE sur les différents types de prélèvement. L'étude est ici présentée sur la séquence en acides aminés dans le cadre de lecture ORF2.

Les séquences sont représentées en haut, les pourcentages d'homologie sont représentés en bas. Le patient 14 a été mis à part.

E. Antigénicité et hydrophobie prédites par bio-informatique

Nous avons réalisé des profils avec le logiciel AnTheProt. Les profils des principales substitutions d'acides aminés sont représentés dans les figures 36, 37, 38 et 39.

Sur le cadre de lecture ORF3, la substitution H81C, en association avec les substitutions T78M et Y80F, entraîne une baisse d'antigénicité prédite, avec abolition d'un pic ([figure 36](#)) ; cette association de substitutions est présente dans plus de 85% des *reads* des prélèvements de sangliers, 12% de ceux du prélèvement de selles de la patiente 4 et 25% de ceux d'un des prélèvements de STEP. La substitution S75L, présente dans plus de 75% des *reads* de 12 prélèvements humains et de trois prélèvements d'abattoir et dans 70% et 94% des *reads* des prélèvements de STEP, entraîne également une baisse d'antigénicité prédite ([figure 36](#)).

Sur le cadre ORF2, la substitution S68L, en association avec la substitution P70S, entraîne le décalage d'un pic d'antigénicité prédite vers l'extrémité N-terminale ([figure 37](#)). Cette association est présente à la même fréquence que les substitutions T78M, Y80F et H81C sur le cadre ORF3. La patiente 8 présente, sur un variant représenté à 29,5%, une substitution P76L : cette substitution entraîne une diminution d'antigénicité prédite ([figure 37](#)).

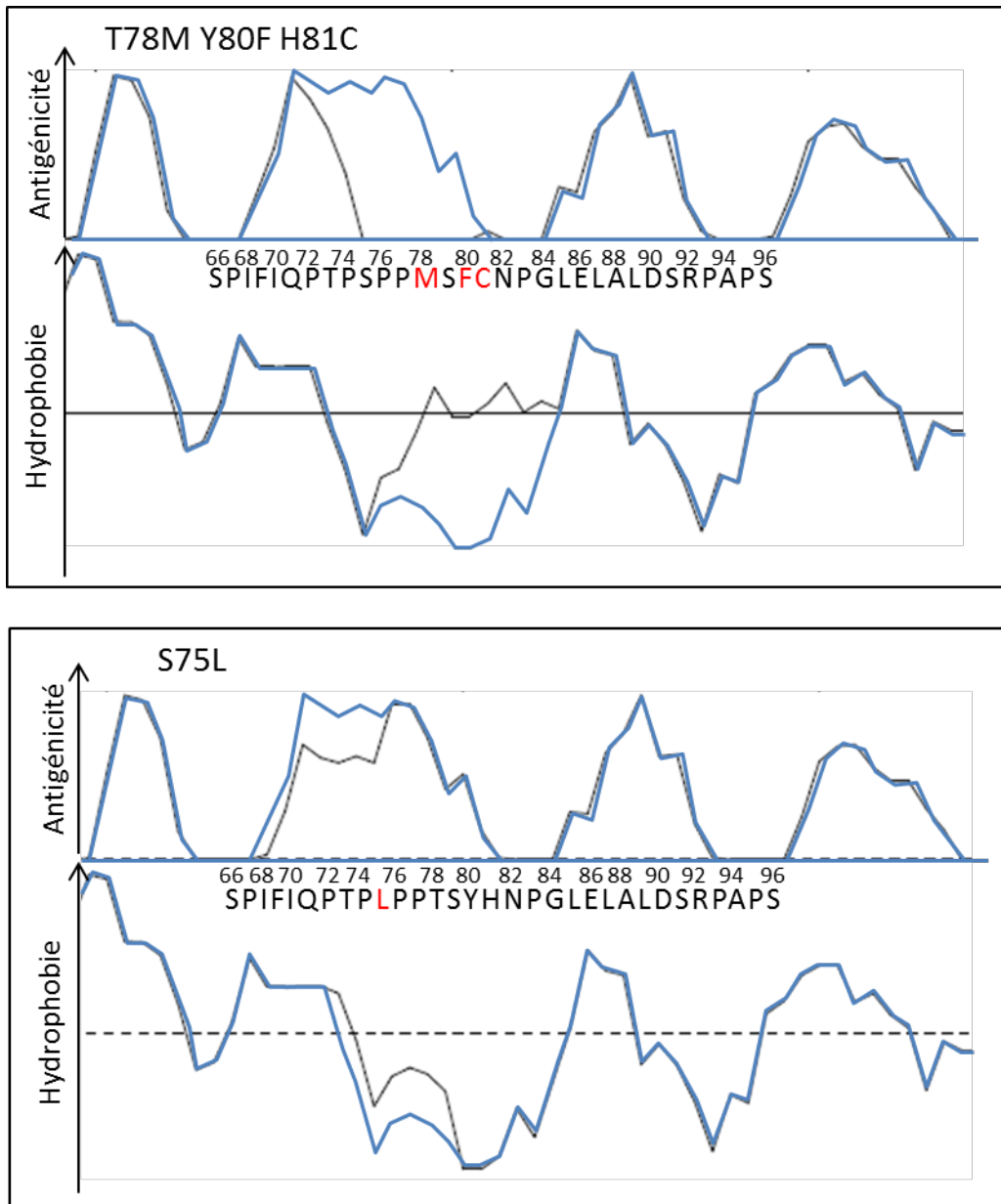


Figure 36 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt dans le cadre de lecture ORF3

Le tracé bleu représente la séquence AB369687 ; le tracé noir représente les séquences avec les substitutions T78M, Y80F et H81C (haut) et S75L (bas). Les numéros des acides aminés sont indiqués. Les acides aminés en rouge correspondent aux substitutions.

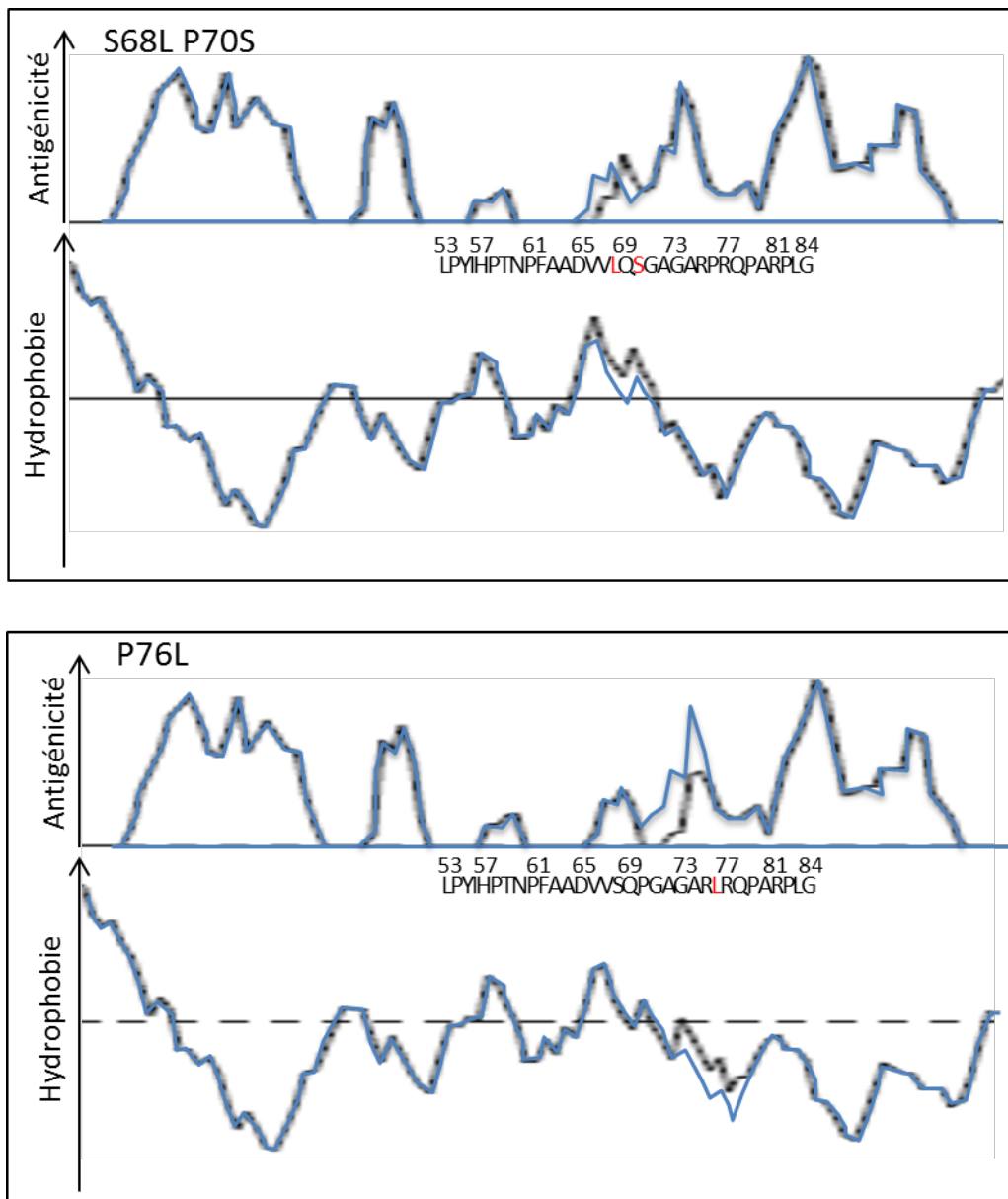


Figure 37 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt dans le cadre de lecture ORF2

Le tracé bleu représente la séquence AB369687 ; le tracé noir représente les séquences avec les substitutions S68L et P70S (haut) et P76L (bas). Les numéros des acides aminés sont indiqués. Les acides aminés en rouge correspondent aux substitutions.

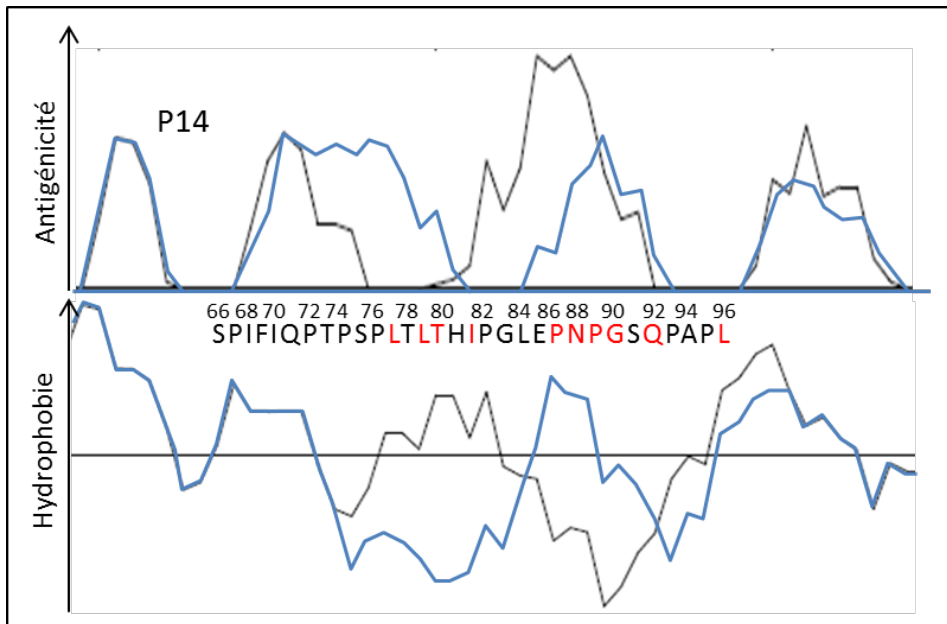


Figure 38 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt pour le patient 14 dans le cadre de lecture ORF3

Le tracé bleu représente la séquence AB369687 ; le tracé noir représente la séquence du patient. Les numéros des acides aminés sont indiqués. Les acides aminés en rouge correspondent aux substitutions.

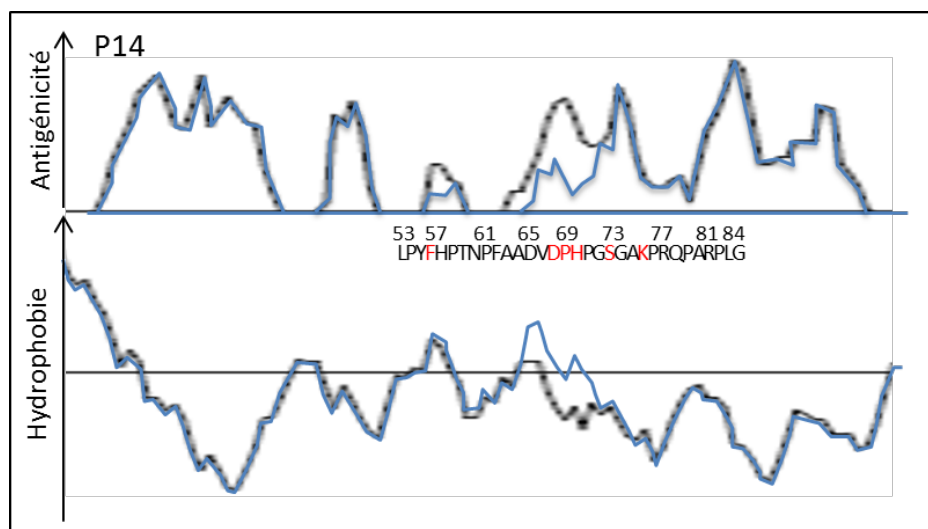


Figure 39 : Profils d'antigénicité et d'hydrophobie prédites par le logiciel AnTheProt pour le patient 14 dans le cadre de lecture ORF2

Le tracé bleu représente la séquence AB369687 ; le tracé noir représente la séquence du patient. Les numéros des acides aminés sont indiqués. Les acides aminés en rouge correspondent aux substitutions.

Résultats – études publiées

Étude n°1

Caractéristiques moléculaires de la circulation du virus de l'hépatite dans l'environnement et dans des échantillons humains

H. Fenaux, M. Chassaing, S. Berger, H. Jeulin,
A. Gentilhomme, M. Bensenane, J.P. Bronowicki,
C. Gantzer, I. Bertrand, E. Schvoerer

Étude publiée dans *Journal of Clinical Virology*,
2018, volume 103, pages 63-70

Objectifs

Le virus de l'hépatite E est un virus entraînant des hépatites pouvant être sévères. Les génotypes 1 et 2 sont strictement humains et sont transmis par l'eau dans les pays en développement. Les génotypes 3 et 4 infectent l'Homme mais aussi certains animaux (porcs, sangliers, cerfs) ; ils sont transmis à l'Homme par ingestion de viande d'animaux infectés dans les pays industrialisés. Cependant, la transmission de ces deux derniers génotypes comporte encore des zones d'ombre : y a-t-il un rôle de l'environnement hydrique dans la transmission du VHE de génotype 3 dans les pays industrialisés ?

Les protéines ORF2 et ORF3, présentes à la surface du virus et jouant un rôle dans son cycle réplcatif sont importantes concernant la circulation du virus puisqu'elles vont avoir un impact sur les interactions entre le virus et son environnement. Ces protéines présentent une variabilité pouvant impacter ces interactions.

Notre objectif dans cette étude était d'étudier la circulation du VHE entre humains, animaux et environnement dans le Nord-Est de la France (modèle de pays industrialisé) et de rechercher des caractéristiques moléculaires particulières dans les gènes ORF2 et ORF3 pouvant avoir un impact sur la circulation du VHE.

Résultats principaux

Nous avons retrouvé des échantillons positifs pour le génome du VHE chez des patients (9,1% des échantillons sanguins et 23,1% des échantillons de selles), chez des sangliers (10% des échantillons de foie et 5,3% des échantillons de selles) et dans des prélèvements environnementaux (25% des échantillons de STEP et 75% des échantillons de l'abattoir). Les charges virales étaient de l'ordre de $7 \log_{10}$ UI/g dans les prélèvements de foie de sanglier ainsi que dans les prélèvements de selles animales et humaines. Les charges virales dans les prélèvements sanguins humains étaient de l'ordre de $5 - 6 \log_{10}$ UI/ml. Dans les prélèvements hydriques, elles étaient de l'ordre de $1 \text{ à } 2 \log_{10}$ UI/ml.

Une analyse de séquençage direct sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3, concernant dix prélèvements humains, trois prélèvements d'eaux

usées de l'abattoir et trois prélèvements de sangliers a mis en évidence que tous les prélèvements comportaient un VHE de génotype 3. La substitution H81C a été mise en évidence sur le cadre ORF3 dans tous les prélèvements de sangliers.

Le séquençage haut débit a été réalisé sur le domaine M d'ORF2 sur cinq prélèvements humains et un prélèvement de sanglier. A l'échelle nucléotidique, la fréquence de mutation moyenne était de 0,012, tandis que l'entropie, prenant en compte le nombre d'haplotypes, était de 0,9 (l'échelle va de 0 à 1 ; 0 : toutes les séquences sont identiques ; 1 : chaque séquence comparée est différente des autres [264]) : la quasi-espèce présentait donc une complexité élevée mais un taux de mutations relativement bas. En acides aminés, cependant, chaque échantillon présentait un variant majoritaire identique à la séquence de référence. Nous avons donc principalement des mutations silencieuses et donc une pression de type conservative. La substitution D442G, présente dans le deuxième variant de deux patients (trois si l'on considère un seuil de 0,5%), entraîne une modification de l'antigénicité prédite.

Conclusion

Cette étude a montré, pour la première fois dans le nord-est de la France, la présence du VHE dans des prélèvements issus de l'environnement. Tous nos prélèvements présentaient un VHE de génotype 3, qui est le génotype le plus fréquent dans les pays industrialisés et en France.

Un des prélèvements de l'abattoir comportait une charge virale de $6,4 \times 10^3$ UI/ml. Les abattoirs constituent donc une source importante de contamination de l'environnement par le VHE.

La substitution H81C identifiée dans les prélèvements de sangliers pourrait constituer une signature moléculaire particulière, même si sa spécificité n'est pas de 100%. Cette substitution pourrait avoir un impact sur l'antigénicité et la conformation de la protéine ORF3 et favoriser le tropisme viral vis-à-vis du sanglier.

La substitution D442G située dans le domaine M d'ORF2 entraîne une diminution de l'antigénicité prédite, qui pourrait avoir un impact en termes d'échappement immunitaire.

D'autres prélèvements ont, par la suite, été ajoutés à la collection et du séquençage haut débit a pu être réalisé sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3, apportant des données complémentaires exposées plus haut.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples



H. Fenaux^{a,b,c,d}, M. Chassaing^{b,c,d}, S. Berger^a, H. Jeulin^{a,b,c,d}, A. Gentilhomme^{b,c,d}, M. Bensenane^e, J.P. Bronowicki^e, C. Gantzer^{b,c,d}, I. Bertrand^{b,c,d}, E. Schvoerer^{a,b,c,d,*}

^a Laboratoire de Virologie, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, F-54000, France

^c CNRS, LCPME UMR 7564, Nancy, F-54000, France

^d Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^e Service d'hépatogastro-entérologie, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepatitis E virus

Variability

Transmission

Ultra-deep sequencing

ABSTRACT

Background and objectives: Hepatitis E virus (HEV) is emerging but its circulation between humans and the environment remains misunderstood. HEV ORF2 gene encodes the capsid playing a key role in viral interactions with surfaces, ORF3 products are involved in the viral cycle. Our aim was to study the molecular characteristics of ORF2 and ORF3 which could favor HEV fitness in patients and the environment.

Study design: Samples from 69 patients with hepatitis (blood/stools), 20 urban wastewaters, 20 effluents of a pig slaughterhouse, 22 farm pigs (stools), 20 wild boars (liver/stools) were collected in North-Eastern France. HEV strains were analyzed by direct sequencing within the ORF2 M region, of ORF2/ORF3, for phylogeny and physicochemical prediction and for ORF2 by ultra-deep sequencing.

Results: The results showed frequent HEV-positive samples: 9.1% of the patient bloods, 23.1% of their stools; 25.0% of wastewaters, 75.0% for the slaughterhouse, 10.0% of the boar livers, 5.3% of their stools. The strains were classified as HEV genotype 3. In ORF2, HEV highlighted one homogeneous major viral variant within quasispecies and a decrease in predicted antigenicity for two minor mutations (D442G, V402A). A cysteine signature at position 81 in ORF3 was observed in the boars.

Conclusions: HEV RNA genotype 3 was detected in patients and in animals, in a slaughterhouse effluent and in wastewater. Moreover, the low variability of amino acids in the ORF2 M region and molecular features in ORF2 and ORF3 suggested that HEV strains could be advantageous for key properties.

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is suspected to be a food- and water-transmitted virus with a zoonotic cycle especially for HEV genotype 3 (HEV3) [1]. HEV1 and HEV2 are restricted to humans and transmitted through contaminated water in developing countries. HEV3 and HEV4 genotypes can infect humans, pigs and other mammals [2,3]. HEV5 and HEV6 were detected in wild boars in Japan and HEV7 in camels [4,5]. However, HEV circulation between human beings, animals and the environment remains misunderstood and has been investigated for the present study in North Eastern France where quite a high HEV prevalence in humans was observed [6].

HEV is a non-enveloped RNA virus and a member of *Hepeviridae* family [7]. The HEV genome contains three open reading frames (ORFs): ORF1 encodes nonstructural proteins, ORF2 the capsid protein

and ORF3 a small phosphoprotein. The HEV capsid plays a key role in the viral entry into hepatocytes, in the host-related immune response [8–10]. ORF3 has been reported to play a key role in viral cycle [11]. Genetic variation of ORF2 and ORF3 products may also, therefore, be an important factor for environmental transmission.

2. Objectives

Our aim was to explore a possible circulation of HEV between patients, animals and the environment and to investigate molecular features of HEV in the ORF2 and ORF3 genes, which could benefit the virus in both pathogenicity and transmission. We observed a HEV circulation in North-Eastern France, a tendency to molecular conservation of amino acid residues in ORF2 and an amino acid signature in ORF3, only found in HEV strains from wild boars.

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie, CHRU de Nancy Brabois, Rue du Morvan, 54511 VANDOEUVRE LES NANCY, France.

E-mail address: e.schvoerer@chru-nancy.fr (E. Schvoerer).

Table 1

Genome copies of HEV in stool, sera and liver from humans and animals, in slaughterhouse effluent and urban wastewater. ^a Concentrations are expressed in IU/g or IU/mL. ^b NA: Not Applicable.

| Sample Source | | Number of positive sample/Total number of samples | Concentration range ^a | Average |
|----------------|------------|---|--|-------------------|
| Patients | Blood | 8/88 | 1.4×10^3 – 4.4×10^7 | 5.7×10^6 |
| | Stool | 3/13 | 2.1×10^4 – 7.7×10^7 | 3.0×10^7 |
| Urban | Wastewater | 5/20 | 2.7×10^{-1} – 1.4×10^1 | 6.6 |
| Slaughterhouse | Effluent | 15/20 | 1.3×10^{-1} – 6.4×10^3 | 5.3×10^2 |
| Wild boar | Liver | 2/20 | 7.5×10^6 – 1.0×10^7 | 9.0×10^6 |
| | Stool | 1/19 | 2.0×10^7 | NA ^b |
| Farm pig | Stool | 0/22 | NA ^b | NA ^b |

3. Study design

The samplings were performed in North-Eastern France, in 2016 and 2017. Blood samples (n = 88) and stool samples (n = 13) were drawn from patients followed in the University Hospital of Nancy. The patients' non opposition was obtained, as approved by the "Comité de Protection des Personnes – CPP de Lorraine" (DC-2016-2790), in accordance with international guidelines (Helsinki). Urban wastewater was collected from an urban area of 260,000 inhabitants (n = 20) and effluents from of a pig slaughterhouse (n = 20). Samples were also collected from three farm pigs (n = 22 stool samples) and wild boars (n = 20 liver samples, 19 stool samples). The age of the animals ranged from two to 12 months old.

The samples taken in 2017 (urban wastewater: n = 11, 1L; slaughterhouse: n = 9, 1L for eight and 500 mL for one) underwent a first concentration step through use of glass powder (20 g) (Grosseron, Couëron, France). The samples taken in 2016 (urban wastewater: n = 9, 150 mL; slaughterhouse: n = 11, 60 mL) and the products of the first concentration were concentrated in a Centricon[®] Plus-70 centrifugal filter device (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, United States). Viral genome was recovered using lysis buffer (5 mL) from NucliSens magnetic extraction reagents (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). For water samples, RNA was extracted using Nuclisens magnetic extraction reagents on Nuclisens MiniMAG. HEV extraction from stool, serum and liver samples was achieved with the QIAamp Viral Mini Kit from Qiagen (Valencia, California) with the Viral RNA Mini Spin protocol. We applied HEV RT-qPCR (ORF3; SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[™] Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, California) [12].

HEV RNA was amplified in a part of the ORF2 M region (capsid) by a nested PCR with combinations of primers [13,9] (Titan one tube RT-PCR kit –Sigma-Aldrich, Phusion master mix –Fisher Scientific, St Quentin Fallavier and Illkirch, France, respectively). This PCR system generates a 216-nucleotide long fragment, starting at nucleotide 1152 of ORF2 gene. For the ORF2/ORF3 overlap region, four primers were used [14] (Access RT-PCR, Promega France, Charbonnières-les-Bains, France) and the Phusion master mix, to amplify a 137 bp fragment beginning at nucleotide 174 of ORF3. Amplicons were submitted to direct sequencing using the BigDye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an automated Sanger method DNA sequencer (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems). For the investigation on viral quasispecies by ultra-deep sequencing (UDS), amplicons of the ORF2 nested PCR were used with MiSeq Reagent Nano kit V2 (Illumina, Paris France); each DNA fragment was sequenced onto MiSeq Equipment (Illumina). Sequence editing and analysis were performed with Geneious software (www.geneious.com) with a HEV reference sequence (AB369687_3f from GenBank).

HEV strains were studied by phylogeny with the MEGA6 software, in comparison with reference sequences [15]. The selection pressure was analyzed with MEGA6 software (Nei-Gojobori method with Jukes-Cantor correction), using Z-test [16]. The prediction of the antigenicity of aa sequences in the HEV capsid was performed with the AnTheProt software (ANTHEPROT 6.7.0; <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>; IBMC Lyon) [17]; [18].

To evaluate the viral quasispecies features on the HEV ORF2 segment, the Mutation frequency (Mf) was obtained as the ratio of the number of observed mutations relative to the master sequence divided by the total number of nucleotides sequenced [19]. The genetic complexity which was determined by the Shannon entropy (Sn) of the nucleic acid sequences:

$$S_n = \frac{-\sum_i (p_i \ln p_i)}{\ln(h)}$$

where p_i is the frequency of the haplotype within the viral population. The result was normalized by the total number of haplotypes (h), the Sn varying from 0 (no complexity) to 1 (maximum complexity).

The statistical analyses were performed on the <https://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/student> site; the Student test was used in order to compare the viral loads between urban wastewater samples and slaughterhouse effluent samples with $p < 0.05$ considered as significant.

4. Results

Among the 202 samples, for patients suffering from hepatitis, 9.1% blood samples and 23.1% stool samples were positive (Tables 1 and 2). For the HEV-infected patients, some developed an acute hepatitis (n = 4), while the information was not available for 3 patients (and the last one deceased shortly after the HEV diagnosis).

Moreover, 25.0% of urban wastewater and 75.0% of slaughterhouse effluents were also positive. No HEV-positive stool sample was found in pigs while 10.0% liver samples and 5.3% stool samples were positive in the wild boars.

The quantifications of HEV RNA were reported in Fig. 1 and Table 1. For the slaughterhouse samples, the concentrations were variable and could reach 6.4×10^3 IU/mL. In the urban wastewater samples, the concentrations reached 1.4×10^1 IU/mL. In the human and wild boar samples, the concentrations were comprised between 1.4×10^3 and 4.4×10^7 IU/mL (blood samples) and 2.1×10^4 and 7.7×10^7 IU/g (stool and liver samples). Statistical analyses have been conducted comparing the viral loads between urban wastewater samples and slaughterhouse effluent samples: no significant result was observed.

The HEV ORF2 direct sequencing data were collected for five patients, with UDS for four of them and from one boar liver sample. The

Table 2
Patients characteristics – NA: not applicable, NR: not realized, N: normal, XN: superior normal multiplied by X, ALT: alanine aminotransferase.

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 |
|-----------------------------------|--|--|---|---|--|--|--|----------------------------------|
| Date of birth (dd/mm/yyyy) | 12/07/1943 | 16/05/1954 | 19/07/1983 | 07/05/1979 | 15/10/1935 | 29/08/1970 | 24/01/1951 | 17/07/1977 |
| Age at sample | 71 | 61 | 32 | 34 | 80 | 46 | 66 | 40 |
| Sex | F | M | F | F | M | M | M | F |
| Date of sample (dd/mm/yyyy) | 02/06/2015 | 03/01/2016 | 17/09/2015 (blood) | 27/02/2015 (blood) | 22/07/2016 (blood) | 06/04/2017 (blood) | 28/06/2017 (blood) | 29/08/2017 (blood) |
| HEV Serology IgG | Positive | Positive | Negative | Positive | NR | NR | NR | NR |
| IgM | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive |
| RNA concentration (IU/mL or IU/g) | 7.3×10^5 | 3.5×10^5 | 4.4×10^7 | 2.0×10^5 | 1.4×10^3 | 3.1×10^5 | 6.7×10^3 | 7.2×10^3 |
| ALT | 14N | 15N | 5,2N (74N 4 days later) | 61N | 1.02N (4.05N a few days earlier) | 18N (107N earlier) | 51.5N | 7.6N |
| Context | Discovery of biological hepatic Asthenia, digestive symptoms | Cirrhosis (healed hepatitis C) Acute hepatitis | Treated by chemotherapy for breast cancer Acute hepatitis, with lowered prothrombin (49%) | Treated by chemotherapy for breast cancer Discovery of biological hepatic cytolysis Fever (39 °C), asthenia, myalgia, diarrhea, vomiting, cough | Icterus Diarrhea Anorexia and weight loss (12 kg in a few months) No fever | Discovery of biologic hepatic cytolysis Asthenia | Fever Cough Asthenia Discovery of cirrhosis (unknown cause) with ascitis Discovery of biologic hepatic cytolysis | Flu syndrome Anorexia Dark urine |
| Acute/chronic hepatitis E | Evolution towards acute or chronic infection not available | Acute | Acute | Acute | Evolution towards acute or chronic infection not available | Evolution towards acute or chronic infection not available | NA | Acute |
| Follow up | Followed for Crohn's disease | Followed for diabetes and post hepatitis C cirrhosis | Followed for breast cancer | Followed for breast cancer | Not followed | Not followed | Deceased 10/07/2017 in a context of acute renal failure (unknown cause) | Followed for liver benign tumors |

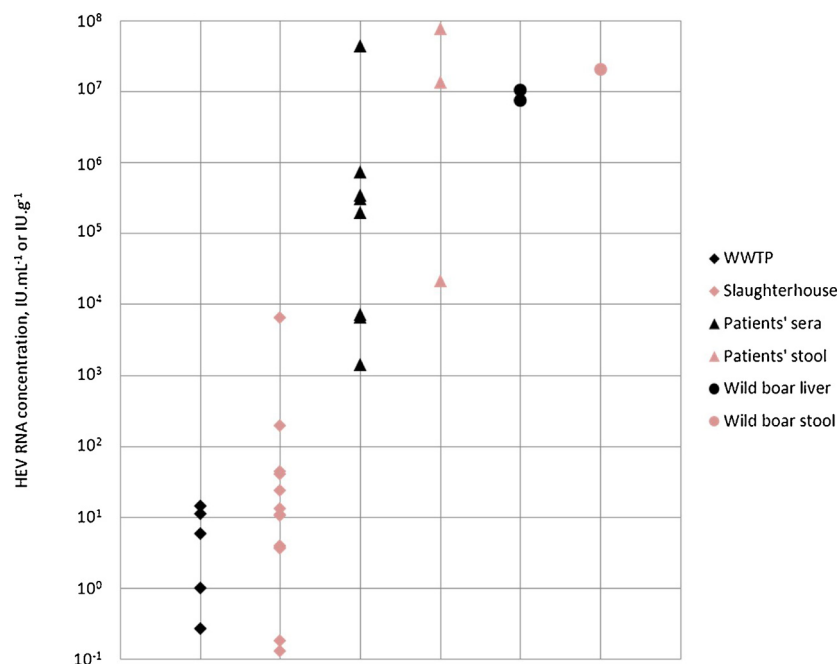


Fig. 1. Genome copies of HEV in samples coming from humans and animals as well as in slaughterhouse effluent and raw urban wastewater. WWTP: Urban wastewater; IU: International Unit

ORF2/ORF3 overlap direct sequencing data were available for eight patients (blood and/or stool), three slaughterhouse samples and two wild boars (liver ± stool).

A phylogenetic tree (see Fig. 2) was built with the ORF2/ORF3 overlap, allowing us to classify all the seventeen strains as HEV genotype 3, including one of the HEV strains which had been detected in wastewater. The subtype could be approached by Blast (not shown) in four of our patients: three HEV-3f subtypes and one HEV-3c subtype. P1 and P4 cluster together with 100% homology, the animal samples all cluster together with 100% homology. For ORF3 amino acid sequences (Table 3), in position 81, the wild boar samples harbored a cysteine whereas no other sample had this residue at this position.

UDS analyses generated between 36,765 to 64,770 reads per sample for the HEV ORF2 segment with an average of 49,844 reads/sample (Q score at a mean percent Q30 of 88.5%). Concerning the HEV quasispecies analyzed at the nucleic acid level, a mean mutation frequency was at 0.012, while the entropy taking into account the number of haplotypes was observed at 0.9. Thus, the HEV quasispecies were rather complex but the mutations were at quite a moderate frequency. Among the mutations of nucleic acids (na) from the most frequent sequences obtained by UDS, those which had an impact on the amino acid (aa) residues (that is, between amino acids 385 and 455 within ORF2M domain) were rare and have been highlighted in Fig. 3. The Z test of selection showed a purifying pressure (or conservative selection) on all the quasispecies ($p < 0.05$).

For aa residues, when comparing sera and stool samples (P1; P2; P3; P4 blood – P4 stool), we observed a highly conserved amino acid sequence which was analyzed for the HEV master strain of each quasispecies at 85.0%, 92.6%, 91.1%, 86.4% and 89.6%, respectively. The sequence from the boar liver was identical and represented 95.5% of the corresponding quasispecies. In the blood samples, minor amino acid sequences could be found above 1%, which was not the case in the

human stool and wild boar samples (see Fig. 3). The mutations D442G (found for P2 and P3) and V402A (P4) led to a decrease in the predicted antigenicity, 31.3% and 25.0% respectively (see Fig. 4).

5. Discussion

This study allowed us to highlight HEV by RT-qPCR in human samples of patients suffering from hepatic cytolysis and in environmental samples collected at the entrance of an urban wastewater treatment plant as well as in the effluent of a pig slaughterhouse and in wild boars. To our knowledge, HEV had never been reported before in environmental samples in North Eastern France despite a high serological prevalence in the population of the region compared to the rest of the country [6].

According to the sequencing results from HEV detected in the present study, phylogenetic analyses showed that all the strains were classified as HEV3. As mentioned above, HEV3 strains were more often observed in France, as well as in neighboring European countries. For three patients, the subtype was HEV-3f and for another one, it was HEV-3c. In the literature, HEV strains identified in France belonged to HEV-3c subtype, which is prevalent in pigs and wild boars [20] and 3i. HEV3 was found in inner organs and muscles from wild boars and deers in Germany [2] while in South Central Italy, wild boar HEV strains belonged to the HEV-3c subtype [21]. Besides, we found HEV concentrations up to 6.4×10^3 IU/mL in the slaughterhouse: it could therefore be an important source of HEV pollution in the environment.

HEV1 is known to be transmitted through water [3], whereas HEV3 is mainly considered foodborne. However, as observed in our study, HEV3 has already been found in wastewater samples in France [22,23], but also in Spain [22,24], Italy [25,26], the United Kingdom [27], Portugal [28], which could be in favor of a possible waterborne transmission of HEV3.

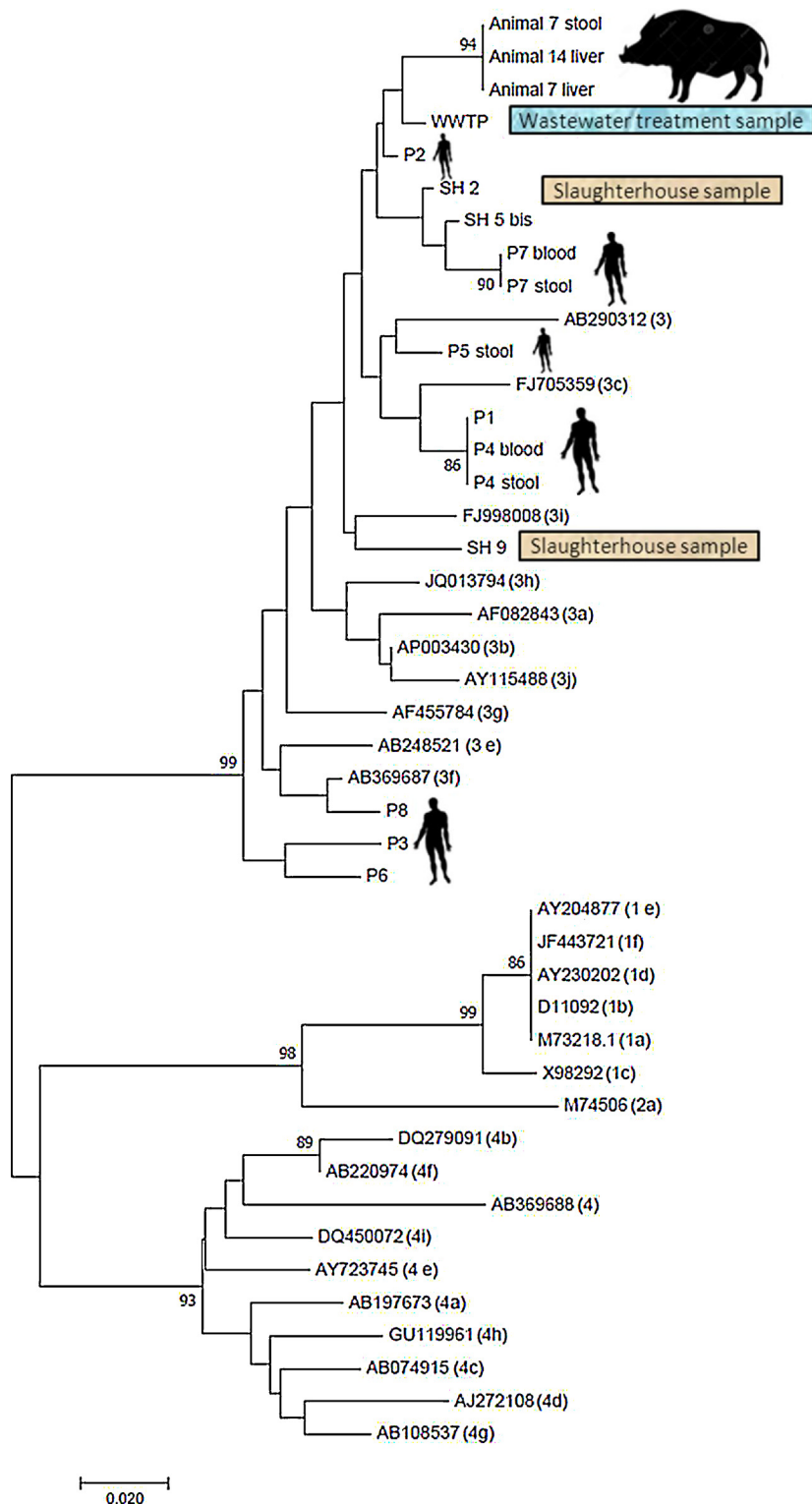


Fig. 2. Phylogenetic tree with sequences of the direct sequencing of the ORF2/ORF3 overlap. The neighbor-joining method was used with a phylogeny test with a 500 bootstrap replication and Kimura 2- parameter method for distance matrix. Reference sequences of genotypes 1, 2, 3 and 4 from Smith [15] have been used. SH: slaughterhouse sample. WWTP: wastewater treatment plant sample. All our samples cluster with genotype 3. P1 and P4 cluster together with 100% homology, the animal samples all cluster together with 100% homology. (All the sequences are available on request).

Table 3

mutations in nucleotides and corresponding amino acid substitutions compared with the ORF3 reference sequence (genotype 3f AB369687). nt: nucleotide; aa: amino acid; An liv: liver of the wild boar; An sto: stool of the wild boar; SH: slaughterhouse. At the amino acid level, humans share 80.6% homology with animals and 93.5% with slaughterhouse samples; animal and slaughterhouse samples share 87.1% homology. In position 81, all the animal samples harbored a cysteine, whereas no other sample had this amino acid in this position: it could constitute a special molecular pattern for animal HEV samples. In position 75, most of the human and all the slaughterhouse samples harbored a leucine, whereas none of the animal samples harbored that amino acid.

| nt | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 265 | 266 | 267 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Ref 3f | T | C | G | C | C | G | A | C | G | T | C | G | T | A | T | C | A | C | A | A | C | C | T | C | C | G | G | C | C | C | G | C | C | T | C | G | C | T | | | |
| aa | | 75 | | | | 76 | | | | | | | | | 80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ref 3f | | S | | | | P | | | | | | | | | Y | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P3 | | T | | | | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P6 | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P1 | | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P4B | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P4S | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P2 | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P5S | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P7B | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P7S | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| An 7 liv | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| An 7 sto | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| An 14 liv | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SH5bis | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SH2 | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SH9 | | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Between amino acids 385 and 455 within ORF2 M domain, which plays a role in host-related response, even though variable nucleic acid sequences were detected with a rather complex distribution of the viral variants within the HEV quasispecies, highly conserved amino acids were observed. These data allowed us to assume that homogeneous HEV strains could gain structurally and biologically advantageous properties of the capsid in a key functional domain. It has the potential to be more pathogenic and/or more transmissible and, as a consequence, might emerge in the human populations and in the environment, such as observed in a study by Aprea et al. in Italy [21]. Ultimately, only two minor mutations, D442G for two patients and V402A for one patient modified the predicted antigenicity of HEV capsid. These modulations could favor HEV evasion from the immune response as it was observed for other viruses, both with bio-informatics predictions and *in vitro* functional assays [29]. The mutations V402A and D442G were located within or very next to the HEV-ORF2₄₀₃₋₄₄₃ region which is known to play a role as linear epitopes in the M domain of HEV capsid [30,31]. Very few results were reported in the HEV M domain, with two mutated residues which were mentioned, i.e. the S390L mutation from a swine strain [32,33], and the S436A mutation from an avian HEV isolated from chickens without clinical disease [34]. The S390L mutation could be selected by the immune pressure and influence the viral protein ORF2 function.

The ORF3 products are involved in various steps of the viral cycle. In our HEV strains collection, amino acid signatures observed in ORF3 for HEV strains could, at least partially, explain a differential tropism between various hosts. At position 81, the boar samples harbored a

cysteine, whereas no other sample had this residue at this position. The cysteine residue is involved in proteins conformation and could play a role in HEV tropism for wild boars.

Thus, it can be assumed that in addition to the major advantaged HEV strains, accessory viruses highlighting mutations that can modify viral recognition by the host immunity and/or HEV interactions with various biological or abiotic partners could subsequently co-emerge.

As a conclusion, in the present study, HEV RNA, genotype 3, was detected in patients, at the WWTP entrance, from a pig slaughterhouse and in wild boars. In spite of variable nucleic acids in the ORF2 M domain which was explored, a conservation of amino acids was observed, suggesting that homogeneous HEV strains could have beneficial capsid properties and circulate as part of dominant viruses in North-Eastern France.

Foot notes

- The reagents for the experiments were obtained by using a budget from 'Projets Exploratoires Premier Soutien – PEPS Mirabelle', Lorraine University (PEPS Mirabelle Université de Lorraine-CNRS 2016). The authors are indebted to the Institut Jean Barriol for having pre-selected the study VH2E.
- For institutional statement purposes, the patients' non opposition was obtained, as approved by the "Comité de Protection des Personnes – CPP de Lorraine" (DC-2016-2790), in accordance with international guidelines (Helsinki).

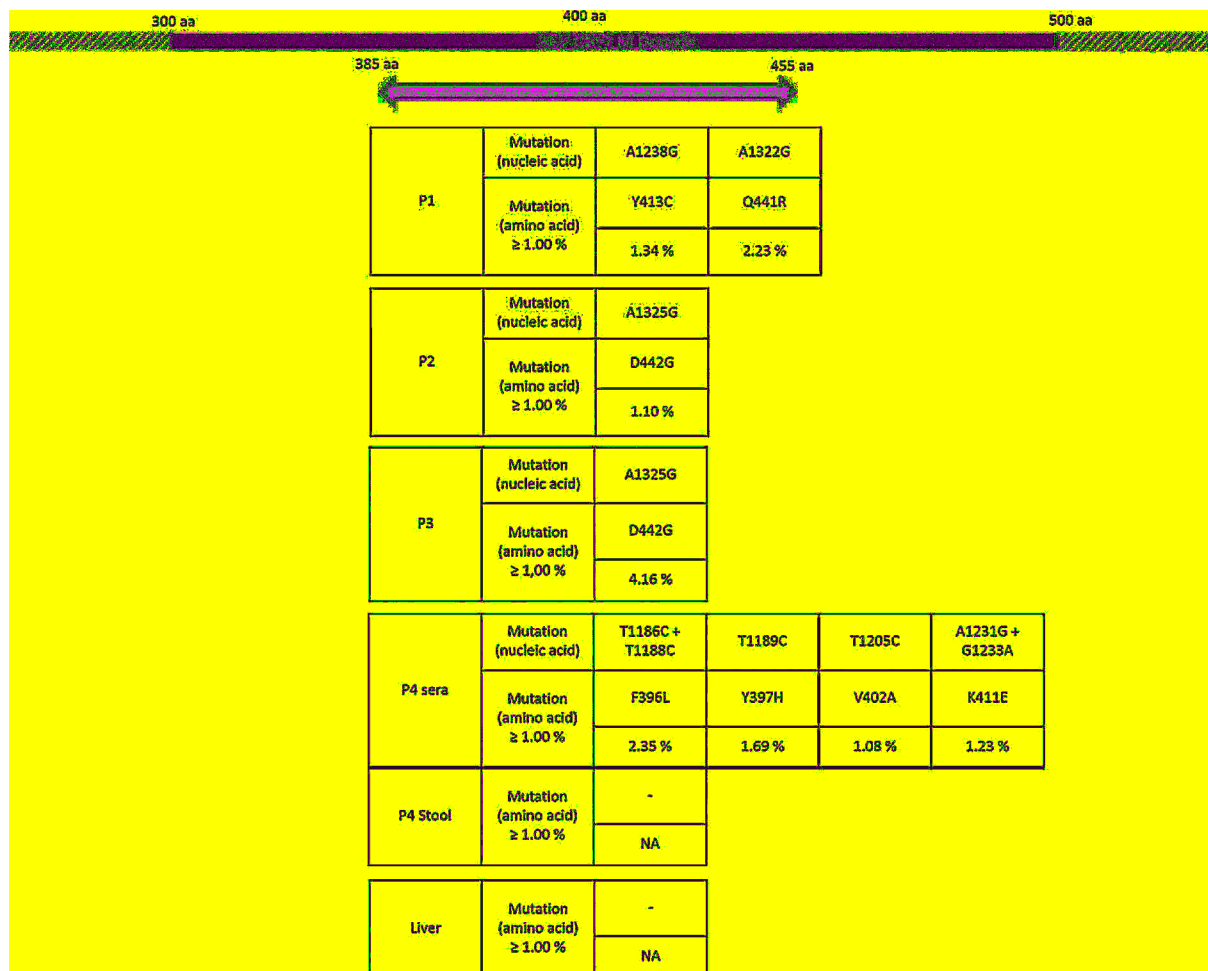


Fig. 3. Mutations are represented as XnY where X is either the wild nucleic acid or the wild amino acid, n is the position of the mutation in the ORF2 sequence and Y is either the mutated nucleic acid or the mutated amino acid. na: Nucleic acid, aa: Amino acid.



Fig. 4. AnTheProt ORF2 antigenicity profile. Mutations are represented as XnY where X is the wild amino acid, n is the position of the mutation in the ORF2 sequence and Y is the mutated amino acid.

Conflict of interest

None.

Author contributions

Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Bertrand I and Gentilhomme A collected the samples, performed the experiments and analyzed the data. Bronowicki JP, Bensenane M and Jeulin H contributed to

sampleings and took care of the patients. Schvoerer E, Bertrand I and Gantzer C designed the research, analyzed the data and wrote the paper.

Acknowledgments

We are indebted to Shaunagh Galgey for her re-reading of the manuscript as a native speaker of English and for her background in Virology. The reagents for the experiments were obtained by using a

budget from 'Projets Exploratoires Premier Soutien – PEPS Mirabelle', Lorraine University (PEPS Mirabelle Université de Lorraine-CNRS 2016).

References

- [1] D.M. Yugo, X.-J. Meng, Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10 (2013) 4507–4533, <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10104507>.
- [2] H.E. Anheyer-Behmenburg, K. Szabo, U. Schotte, A. Binder, G. Klein, R. John, Hepatitis E virus in wild boars and spillover infection in red and roe deer, Germany, 2013–2015, *Emerg. Infect. Dis.* 23 (2017) 130–133, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2301.161169>.
- [3] M.S. Khuroo, M.S. Khuroo, N.S. Khuroo, Transmission of Hepatitis E virus in developing countries, *Viruses* 8 (2016), <http://dx.doi.org/10.3390/v8090253>.
- [4] G.-H. Lee, B.-H. Tan, E.C.-Y. Teo, S.-G. Lim, Y.-Y. Dan, A. Wee, P.P.K. Aw, Y. Zhu, M.L. Hibberd, C.-K. Tan, M.A. Purdy, C.-G. Teo, Chronic infection with camelid Hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk, *Gastroenterology* 150 (2016) 355–357, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048> (e3).
- [5] P.C.Y. Woo, S.K.P. Lau, J.L.L. Teng, K.-Y. Cao, U. Wernery, T. Schountz, T.H. Chiu, A.K.L. Tsang, P.-C. Wong, E.Y.M. Wong, K.-Y. Yuen, New Hepatitis E virus genotype in bactrian camels, Xinjiang, China, 2013, *Emerg. Infect. Dis.* 22 (2016) 2219–2221, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2212.160979>.
- [6] J.M. Mansuy, P. Gallian, C. Dimeglio, K. Saune, C. Arnaud, B. Pelletier, P. Morel, D. Legrand, P. Tiberghien, J. Izopet, A nationwide survey of Hepatitis E viral infection in French blood donors, *Hepatol. Baltim.* 63 (2016) 1145–1154, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28436>.
- [7] S. Chapuy-Regaud, M. Dubois, C. Plisson-Chastang, T. Bonnefois, S. Lhomme, J. Bertrand-Michel, B. You, S. Simoneau, P.-E. Gleizes, B. Flan, F. Abravanel, J. Izopet, Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response, *Biochimie* 141 (2017) 70–79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.003>.
- [8] S.U. Emerson, H. Nguyen, U. Torian, R.H. Purcell, ORF3 protein of Hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro, *J. Virol.* 80 (2006) 10457–10464, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00892-06>.
- [9] S. Lhomme, F. Abravanel, M. Dubois, K. Sandres-Saune, L. Rostaing, N. Kamar, J. Izopet, Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients, *J. Virol.* 86 (2012) 10006–10014, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01003-12>.
- [10] J. Meng, X. Dai, J.C. Chang, E. Lopareva, J. Pillot, H.A. Fields, Y.E. Khudyakov, Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the Hepatitis E virus, *Virology* 288 (2001) 203–211, <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1093>.
- [11] S.P. Kenney, J.L. Wentworth, C.L. Heffron, X.-J. Meng, Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101, *Virology* 486 (2015) 198–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.012>.
- [12] F. Abravanel, K. Sandres-Saune, S. Lhomme, M. Dubois, J.-M. Mansuy, J. Izopet, Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 897–902, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05942-11>.
- [13] S.A. Burt, J. Veltman, R.H. Honing, H. der Schmitt, W.H.M. van der Poel, Hepatitis E virus in farmed rabbits, wild rabbits and petting farm rabbits in the Netherlands, *Food Environ. Virol.* 8 (2016) 227–229, <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9239-3>.
- [14] J. Inoue, M. Takahashi, Y. Yazaki, F. Tsuda, H. Okamoto, Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence, *J. Virol. Methods* 137 (2006) 325–333, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.004>.
- [15] D.B. Smith, P. Simmonds, J. Izopet, E.F. Oliveira-Filho, R.G. Ulrich, R. John, M. Koenig, S. Jameel, T.J. Harrison, X.-J. Meng, H. Okamoto, W.H.M. Van der Poel, M.A. Purdy, Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes, *J. Gen. Virol.* 97 (2016) 537–542, <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000393>.
- [16] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- [17] G. Deléage, C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities, *Comput. Biol. Med.* 31 (2001) 259–267.
- [18] J.M. Parker, D. Guo, R.S. Hodges, New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites, *Biochemistry (Mosc.)* 25 (1986) 5425–5432.
- [19] C. Ramírez, J. Gregori, M. Buti, D. Tabernero, S. Camós, R. Casillas, J. Quer, R. Esteban, M. Homs, F. Rodriguez-Frías, A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model, *Antiviral Res.* 98 (2013) 273–283, <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.007>.
- [20] F. Legrand-Abravanel, N. Kamar, K. Sandres-Saune, C. Garrouste, M. Dubois, J.-M. Mansuy, F. Muscari, F. Sallusto, L. Rostaing, J. Izopet, Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 835–844, <http://dx.doi.org/10.1086/655899>.
- [21] G. Aprea, M.G. Amoroso, I. Di Bartolo, N. D'Alessio, D. Di Sabatino, A. Boni, B. Cioffi, D. D'Angelantonio, S. Scattolini, L. De Sabato, G. Cotturone, F. Pomilio, G. Migliorati, G. Galiero, G. Fusco, Molecular detection and phylogenetic analysis of hepatitis E virus strains circulating in wild boars in south-central Italy, *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (2018) e25–e31, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12661>.
- [22] P. Clemente-Casares, S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. Martín, S. Bofill-Mas, R. Girones, Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries, *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 448–454, <http://dx.doi.org/10.3201/eid0904.020351>.
- [23] T. Miura, S. Lhomme, J.-C. Le Saux, P. Le Mehaute, Y. Guillois, E. Couturier, J. Izopet, F. Abravanel, F.S. Le Guyader, Detection of hepatitis E virus in sewage after an outbreak on a French Island, *Food Environ. Virol.* 8 (2016) 194–199, <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9241-9>.
- [24] J. Rodriguez-Manzano, M. Miagostovich, A. Hundsda, P. Clemente-Casares, A. Carratala, M. Buti, R. Jardi, R. Girones, Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples, *J. Water Health* 8 (2010) 346–354, <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2009.042>.
- [25] M. Iaconelli, G. Purpari, S. Della Libera, S. Petricca, A. Guercio, A.R. Ciccaglione, R. Bruni, S. Taffon, M. Equestre, M. Fratini, M. Muscillo, G. La Rosa, Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in Bivalve molluscs in Italy, *Food Environ. Virol.* 7 (2015) 316–324, <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-015-9207-3>.
- [26] G. La Rosa, M. Pourshaban, M. Iaconelli, V.S. Vennarucci, M. Muscillo, Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 5870–5873, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00336-10>.
- [27] D.B. Smith, J.O. Paddy, P. Simmonds, The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK, *J. Med. Virol.* 88 (2016) 915–918, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24403>.
- [28] A. Matos, J. Mesquita, D. Gonçalves, J. Abreu Silva, C. Luxo, M. Nascimento, Hepatitis E virus subgenotypes 3i and 3f in wastewater of treatment plants of Portugal, *J. Clin. Virol.* 82 (2016) S71, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.140>.
- [29] E. Schvoerer, R. Moenne-Loccoz, J.M. Murray, A. Velay, M. Turek, I. Fofana, S. Fafi-Kremer, A.-C. Erba, F. Habersetzer, M. Doffoël, J.-P. Gut, M.J. Donlin, J.E. Tavis, M.B. Zeisel, F. Stoll-Keller, T.F. Baumert, Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures are associated with treatment failure and modulation of viral entry and neutralization, *J. Infect. Dis.* 207 (2013) 1306–1315, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit032>.
- [30] S. He, J. Miao, Z. Zheng, T. Wu, M. Xie, M. Tang, J. Zhang, M.-H. Ng, N. Xia, Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus, *J. Gen. Virol.* 89 (2008) 245–249, <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.83308-0>.
- [31] T. Yamashita, Y. Mori, N. Miyazaki, R.H. Cheng, M. Yoshimura, H. Unno, R. Shima, K. Moriishi, T. Tsukihara, T.C. Li, N. Takeda, T. Miyamura, Y. Matsuura, Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 12986–12991, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0903699106>.
- [32] L. Córdoba, Y.-W. Huang, T. Opriessnig, K.K. Harral, N.M. Beach, C.V. Finkelstein, S.U. Emerson, X.-J. Meng, Three amino acid mutations (F51L, T59A, and S390L) in the capsid protein of the hepatitis E virus collectively contribute to virus attenuation, *J. Virol.* 85 (2011) 5338–5349, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02278-10>.
- [33] H. van Tong, N.X. Hoan, B. Wang, H. Wedemeyer, C.-T. Bock, T.P. Velavan, Hepatitis E virus mutations: functional and clinical relevance, *EBioMedicine* 11 (2016) 31–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.039>.
- [34] P. Billam, Z.F. Sun, X.-J. Meng, Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV, *J. Gen. Virol.* 88 (2007) 1538–1544, <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82754-0>.

Étude n°2

Caractéristiques moléculaires et propriétés de surface du virus de l'hépatite E dans des prélèvements humains et environnementaux

C. Hartard, H. Fenaux (co-premier auteur), A. Gentilhomme, John M Murray, E. Akand, E. Laugel, S. Berger, A. Maul, A. de Rougemont, T. Remen, M. Bensenane, J.P. Bronowicki, C. Gantzer, I. Bertrand, E. Schvoerer

Article en préparation, soumission prévue dans
Journal of Infectious Diseases

Objectifs

Au cours d'une première étude, nous avons montré la présence du VHE dans des prélèvements humains et environnementaux dans le nord-est de la France. Nous avons pu obtenir des données de séquençage direct sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3 et identifier la substitution H81C, une possible signature moléculaire, dans des prélèvements issus de sangliers.

Au cours de cette deuxième étude, nous avons pu obtenir plus de prélèvements humains, d'eaux usées de l'abattoir et urbaines de STEP et nous avons effectué du séquençage haut débit sur la zone de chevauchement ORF2/ORF3, ce qui permet d'avoir une idée des mutations particulières sur les variants minoritaires ainsi que de la répartition des différents variants au sein de chaque échantillon.

Le fragment N-terminal de la protéine ORF2 est localisé à l'intérieur du virion ; il se lie à l'ARN viral, permettant l'encapsidation de celui-ci dans les nouveaux virions [17]. Il comporte une séquence d'adressage vers le réticulum endoplasmique [10,18]. La protéine ORF3 est une petite protéine hydrophobe, qui tend à s'oligomériser dans des membranes dérivées du réticulum endoplasmique [31]. La région située entre les acides aminés 56 et 80 est impliquée dans l'interaction entre les protéines ORF2 et ORF3 [119] : cette interaction permet au VHE d'acquérir sa quasi-enveloppe grâce à l'interaction d'ORF3 avec des protéines de l'hôte permettant le bourgeonnement [265].

Nous avons également pratiqué des prédictions d'antigénicité et d'hydrophobie avec le logiciel AnTheProt et effectué des tests fonctionnels d'adhésion de particules virales du VHE sur des billes hydrophobes afin de mesurer leur hydrophobie.

Nos objectifs sont de comparer la variabilité, la complexité et la distribution de la quasi-espèce au sein d'isolats de différentes origines dans le nord-est de la France, afin de mieux comprendre la transmission virale et le pouvoir pathogène du virus. Des signatures moléculaires pouvant être impliquées dans la transmission ou la pathogénicité du virus seront informatives. Notre objectif mécanistique est d'évaluer l'hydrophobie de la surface virale par des tests fonctionnels.

Résultats principaux

L'analyse en séquençage haut débit a montré la présence d'un variant majoritaire très représenté et de variants minoritaires dans les prélèvements humains et environnementaux à l'exception d'une patiente et des deux prélèvements de STEP, pour lesquels il y avait une coexistence de nombreux variants. Cette patiente était connue comme étant infectée de manière chronique par le VHE.

Pour un de nos patients, le VHE par lequel il était infecté avait une séquence proche de celle des VHE isolés sur des lapins. Nous avons identifié plusieurs substitutions d'acides aminés sur les cadres ORF2 et ORF3, entraînant des modifications d'hydrophobie et d'antigénicité prédites. Dans ce contexte de modifications observées par prédiction bio-informatique, nous avons utilisé une approche *in vitro* d'étude de l'hydrophobie faisant suite à l'analyse *in silico*. Des particules de VHE ont été isolées de prélèvements de sang et de selles de deux patients (dont le patient infecté par un VHE proche de ceux isolés sur des lapins). Elles ont été mises en contact avec des billes hydrophobes ; après un temps d'incubation et des lavages, les virus ont été quantifiés sur les billes et dans le surnageant. Les virus isolés des deux prélèvements de sang (présents sous forme quasi-enveloppée) présentent une adhésion aux billes hydrophobes plus faible que ceux isolés des prélèvements de selles (présents sous forme non-enveloppée). Les virus de type « lapin » issus des selles d'un patient adhèrent plus que ceux issus des selles de l'autre patient. La portion de la protéine ORF2 séquencée étant située dans une zone située sur la partie interne de la capsid, une comparaison entre les résultats obtenus par estimation de l'antigénicité prédite et ceux obtenus par tests fonctionnels n'est pas envisageable. La forme quasi-enveloppée est, d'après les tests fonctionnels, moins hydrophobe que la forme non-enveloppée : ce résultat peut sembler surprenant car la quasi-enveloppe est composée de lipides, néanmoins la protéine ORF3 est enchâssée dans cette quasi-enveloppe et pourrait avoir une influence sur l'hydrophobie, de même, la protéine ORF2 pourrait entraîner une forte hydrophobie de la capsid. D'autre part la bicouche lipidique est constituée de phospholipides dont la partie hydrophile est localisée à l'extérieur, pouvant entraîner une baisse d'hydrophobie.

La substitution H81C sur le cadre de lecture ORF3, si elle représente les variants majoritaires des échantillons issus de sangliers, a aussi été observée dans 25% des *reads* d'un des prélèvements de STEP ainsi que dans 0,3 à 12% des *reads* de prélèvements humains, sanguins et fécaux. L'approche UDS permet ainsi de préciser sa fréquence relative et de moduler l'interprétation des résultats. Le tropisme pour les deux sangliers étudiés des souches de VHE qui comportent ce résidu n'empêche pas ces variants de circuler chez l'Homme. Cette substitution est responsable d'une baisse d'antigénicité prédite pouvant favoriser un échappement à l'immunité de l'hôte.

Conclusion

Nous avons retrouvé, dans les prélèvements de STEP, la présence de nombreux variants de VHE de différentes origines, ce qui démontre que l'eau usée est bien un maillon important du cycle de contamination du milieu hydrique mais aussi que celle-ci est le réceptacle de toutes les souches qui circulent dans la population y compris celles qui ne provoquent que peu de signes cliniques.

Nous avons également retrouvé la présence de nombreux variants dans le prélèvement d'une patiente connue pour être infectée chroniquement par le VHE : ceci peut être mis en relation avec les études de Lhomme, retrouvant une plus forte probabilité d'évoluer vers la chronicité lorsque la variabilité virale est élevée dans les domaines M et P d'ORF2 et dans la région riche en proline et le macrodomaine d'ORF1 [87,149].

Plusieurs substitutions d'acides aminés ont été mises en évidence sur des isolats de VHE provenant de types de prélèvements particuliers. Des modifications d'hydrophobie et d'antigénicité prédites ont été identifiées, pouvant avoir un impact sur l'hydrophobie générale du virus et donc ses interactions avec son environnement ainsi que sur la relation entre le virus et le système immunitaire de l'hôte. Les virus non-enveloppés présentent une hydrophobie supérieure à celle des virus quasi-enveloppés et les virus non-enveloppés proches de ceux isolés chez les lapins présentent une hydrophobie plus importante qu'une souche de VHE de référence.

Nos travaux permettent d'apporter un nouvel éclairage sur la circulation du VHE dans l'environnement ainsi que sur les déterminants qui jouent un rôle dans la pathogénicité du virus ainsi que dans son tropisme préférentiel pour certains hôtes.

1 **Variability in molecular features and surface properties of Hepatitis E Virus can**
2 **modulate its transmission and pathogeny**

3

4 ***Running title: HEV variability and biological impact***

5

6 Authors: Cédric Hartard^{1,2,#}, Honorine Fenaux^{1,2,#}, Alexis Gentilhomme¹, John M Murray^{3,4},
7 Elma Akand^{3,4}, Elodie Laugel^{1,2}, Sibel Berger¹, Armand Maul⁵, Alexis de Rougemont⁶, Thomas
8 Remen⁷, Mouni Bensenane⁸, Jean-Pierre Bronowicki⁸, Christophe Gantzer², Isabelle Bertrand²,
9 Evelyne Schvoerer^{1,2}.

10

11 ¹Laboratoire de Virologie, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

12 ²LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et
13 l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

14 ³School of Mathematics and Statistics, UNSW Sydney, NSW 2052, Australia

15 ⁴Cancer Research Division, Cancer Council NSW, Woolloomooloo, NSW 2021, Australia

16 ⁵LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Metz,
17 France

18 ⁶CHU de Dijon, Centre national de référence des virus entériques, Dijon, France

19 ⁷DRCI, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, Unité de Méthodologie, Data
20 Management et Statistique, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

21 ⁸Service d'hépatogastro-entérologie, CHRU de Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy,
22 France

23 # Contributed equally

24

25

26 **Corresponding author:**
27 Prof. E Schvoerer
28 Laboratoire de Virologie - CHRU de Nancy Brabois
29 Rue Morvan, 54511 VANDOEUVRE LES NANCY
30 Tel. +33 (0)3.83.15.52.69 / Fax. +33 (0)3.83.15.43.76
31 eschvoerer@gmail.com
32
33

34 **Abstract:**

35 **Background:** Hepatitis E virus (HEV) causes mostly self-limited liver diseases but also severe
36 or chronic cases. Genotypes 1 (G1) and 2 circulate in developing countries, are human-
37 restricted and waterborne whereas G3 and G4 circulate in industrialised countries, infect
38 humans and animals and are rather transmitted through the consumption of infected meat. Our
39 aims were to identify signatures in HEV amino acids involved in pathogenicity and
40 transmission and to investigate their functional impact regarding antigenicity and
41 hydrophobicity.

42 **Methods:** Human (n=25), wild boar (n=3), pig slaughterhouse effluent (n=6) and urban
43 wastewater samples (n=2) have been investigated using ultra-deep sequencing (ORF2/ORF3
44 overlap). Viral particles were recovered from human blood and stool and polystyrene beads
45 have been used to assess hydrophobicity.

46 **Results:** Most samples showed a major variant while a mixture has been identified in urban
47 wastewater and in a chronically infected patient. Amino acid signatures have been identified,
48 as a rabbit-linked HEV pattern or S68L (ORF2)/H81C (ORF3) residues. Signatures impacting
49 hydrophobicity and antigenicity have been brought out and a better adhesion to hydrophobic
50 beads of HEV non-enveloped form has been observed.

51 **Conclusions:** Human and environmental HEV strains present molecular signatures that may
52 impact their surface properties and thus their transmission.

53

54 **Key words:** Hepatitis E virus, water, UDS, ORF2/ORF3, signatures, hydrophobicity.
55

56 **Foot notes**

57 The results of the present study were partially presented in SFM (Société Française de
58 Microbiologie) and RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse)
59 congress, Paris, France, 2018. The present investigations were in continuation with our first
60 work (Fenaux/Schvoerer, J Clin Virol, 2018), in order to investigate HEV variability on
61 additional human and environmental samples, thanks to bioinformatics analyses and prediction,
62 by adding amino acid covariance analyses and also functional *in vitro* assays concerning HEV
63 hydrophobicity.

64 The experiments were performed with the support of the ‘Association Chefs de Service du
65 CHRU de Nancy’, Virology budget, university hospital of Nancy, France and by closing a grant
66 from ‘Projets Exploratoires Premier Soutien - PEPS Mirabelle’, Lorraine university (PEPS
67 Mirabelle université de Lorraine-CNRS 2016).

68 For institutional statement purposes, the patients’ non-opposition was obtained, as approved by
69 the “Comité de Protection des Personnes – CPP de Lorraine” (DC-2016-2790 & 2018-A00117-
70 48), in accordance with international guidelines (Helsinki).

71

72 **Author contributions**

73 Hartard C, Fenaux H, Laugel E, Gentilhomme A, Berger S, Bertrand I and de Rougemont A
74 collected the samples, performed the experiments and analysed the data. Murray JM and Akand
75 E were in charge of HEV amino acid covariance analyses. Remen T and Maul A performed the
76 statistical analyses. Bronowicki JP and Bensenane M contributed to samplings and took care of
77 the patients. Hartard C, Fenaux H, Schvoerer E, Bertrand I and Gantzer C analysed the data and
78 wrote the paper. Schvoerer E, Bertrand I and Gantzer C designed the research.

79

80

81 **Background**

82 Discovered in 1983 [1] during massive outbreaks in developing countries, hepatitis E virus
83 (HEV) [2], is also associated with hepatitis cases in industrialised countries, while
84 underestimated [3]. A global seroprevalence of 20 % is admitted in industrialised countries [4],
85 close to what is observed in countries with lower sanitary conditions [5,6].

86 HEV is an RNA virus subdivided in 8 genotypes [7]. Genotypes G1 and G2 are restricted to
87 humans, circulate in developing countries and are mainly transmitted on an epidemic mode
88 through water [8]. G3 and G4 are mainly reported in developed countries after transmission to
89 humans by consumption of raw or undercooked meat of infected animals (e.g. pigs, wild boars
90 and deer) [9].

91 While more often self-limited, severe acute and/or chronic cases of HEV infections have been
92 reported, leading to liver damage and possibly to extrahepatic manifestations [10,11].

93 HEV genome consists of a 7.2 kb long RNA with 3 open reading frames (ORF): ORF1 encodes
94 for non-structural proteins, ORF2 for the capsid protein and ORF3 for a cytoskeleton-associated
95 small phosphoprotein [12]. HEV circulates in human blood as quasi-enveloped particles,
96 wrapped in a cell derived lipidic membrane associated with ORF3 protein. ORF3 protein plays
97 a key role in HEV lifecycle, interacts with host proteins by prolonging the cell survival,
98 modifying the liver microenvironment and the inflammatory response [13,14]. This lipidic
99 envelope is destroyed by bile acids and naked capsids found in stool and then in the environment
100 are exclusively composed of ORF2 proteins. In the human body, the capsid protein is involved
101 in interactions with cell receptors or the immune system. In the environment, it is exposed and
102 may affect infectious particles behaviour.

103

104 In spite of recent data, the mechanisms of HEV circulation, transmission, as well as clinical
105 variability remain partially unclear. In industrialised countries, beside the zoonotic

106 transmission, HEV has also been recovered in environmental waters which may play a
107 significant role [15–17]. When studying viral transmission in a given environment and its
108 behaviour in infected hosts mounting an immune response, the virus surface characteristics
109 including hydrophobicity [18–20] and antigenicity [21] have to be taken into account. In this
110 study, we compared HEV variability, complexity and quasispecies distribution in clinical and
111 environmental isolates of different origins using ultra deep sequencing (UDS). The aim was
112 first to identify signatures in HEV amino acids (aa) that could be involved in pathogenicity or
113 in transmission and then to perform a functional *in vitro* assay to evaluate viral surface
114 hydrophobicity.

115

116 **Methods**

117 ***Sampling***

118 Twenty-five human samples (19 blood, 6 stool samples) were collected between 2016 and 2018
119 in North-Eastern France, from patients followed in the university hospital of Nancy (16
120 patients) or Dijon (3 patients). The severity of the liver impact has been ranked either regarding
121 the prothrombin ratio (PR) or HEV infection duration. A severe hepatitis case was defined by
122 a PR<50 %. Chronic hepatic infections, defined by the detection of HEV genome more than 3
123 months in blood or stool, have been considered as potentially severe. For institutional statement
124 purposes, the patients' non-opposition was obtained, as approved by the "Comité de Protection
125 des Personnes – CPP de Lorraine" (DC-2016-2790 & 2018-A00117-48) in accordance with
126 international guidelines (Helsinki).

127

128 Environmental HEV strains were also investigated, coming from 6 pig slaughterhouse effluent
129 samples (SH), 2 urban wastewater samples (UW, 260,000 inhabitants), 2 livers and 1 stool from
130 two wild boars (WB).

131

132 ***HEV genome extraction***

133 HEV genome was extracted from 140 µL of human serum and from stool suspension using

134 QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen Courtaboeuf, France).

135 Concerning environmental water samples (SH, UW), viruses were concentrated from 60 to 150

136 mL using Centricon® Plus-70 centrifugal filter device (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

137 Extraction was done with NucliSens kit, using a MiniMAG® device (BioMérieux, Marcy

138 l'Etoile, France). Liver extraction was performed from 1 to 2 g of tissue using QIAamp Viral

139 RNA Mini Kit after digestion by proteinase K (Qiagen, Courtaboeuf, France). Genome

140 quantification was performed by using a RT-qPCR system previously described [16].

141

142 ***Ultra-deep sequencing and molecular signatures investigation***

143 According to its potential for HEV strains genotyping [22] as well as its functional impact

144 [16,23,24], the ORF2/ORF3 overlapping region variability was investigated. A nested PCR

145 system [22] was applied giving an amplification product of 137bp (nt 5290-5426). With a view

146 to ultra-deep sequencing using Miseq Nano Kit v2 (MS-103-1003, Illumina), the second PCR

147 step was done with tagged primers suitable for Nextera XT Index Kit (FC-131-1001, Illumina)

148 and the manufacturer protocol was followed. To avoid cross contaminations, molecular

149 procedures were carefully applied; RTq-PCR was done with a negative control and UDS

150 performed in different rooms for the successive steps with frequent gloves changing.

151

152 The resulting data were analysed using Geneious Prime and MEGA V6 software, nucleotide

153 sequences were aligned to the HEV subgenotype G3f (reference AB369687) [25] and the

154 VESPA software (<https://hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>) was used to look

155 for signatures. Statistical analyses were done to compare aa differences between sample types.

156 In each sample, the major and the five first minor variants were considered and the Fisher exact
157 test was used to compare groups of human samples and groups of environmental ones. The
158 AnTheProt software was used to predict the antigenicity of the aa sequences, taking into
159 account their hydrophobicity, flexibility and accessibility [26].

160

161 At last, position-specific differences in aa sequences were investigated to identify motifs in
162 environmental strains which are not present in human samples [27]. Covariance analyses were
163 also performed and the CPLEX interactive optimizer 12.9.0 was used as a solver.

164

165 ***Viral particles purification***

166 HEV particles were purified from the blood (quasi-enveloped virions – envHEV) and stool
167 (naked virions – nHEV) of patients. Virions were purified from 200 μL of serum and from 2
168 mL of a 10-fold diluted stool suspension using Float-A-lyzer 100 kDa (SpectrumLabs, CA,
169 USA). Dialyses were performed twice, 6 h then 18 h against 10 L of 0.1X PBS. In order to
170 estimate the viral load using RT-qPCR, 100 μL of dialysate were treated with 7 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ RNase
171 (Invitrogen, CA, USA), 37°C, 60 min, then extracted using NucliSens kit on easyMAG[®] device
172 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

173

174 ***Analysis of virions hydrophobicity***

175 With the aim of investigating viral particle hydrophobicity, purified HEV were incubated with
176 0.5 μm diameter polystyrene beads (Polybead 07307-15, Hirschberg an der Bergstrasse,
177 Germany) in triplicate.

178 A 500 μL volume of dialysate (5×10^4 - 5×10^6 viral particles) was incubated 2 hours in a
179 Protein Lobind tube under agitation at room temperature, with 10^9 polystyrene beads in a final
180 volume of 2 mL of 5X PBS. Beads were then separated from supernatant by centrifugation

181 (14,000 x g, 3 min). Genome extraction was performed from the supernatant using the
182 easyMAG[®] device, as well as from the beads pellet after a double PBS washing. The Mann-
183 Whitney-Wilcoxon test was used to compare adhesion rates.

184

185 **Results**

186 *Patients' characteristics*

187 Among the 19 patients, 5 were considered to present severe hepatitis: PR below 50 % (n=3),
188 chronically infected (n=2); the detailed patients' features appear in Table 1. HEV genome load
189 in blood samples ranged from 6.7×10^3 IU/mL to 2.1×10^8 IU/mL; the alanine aminotransferase
190 rates were between N and 107N.

191

192 *HEV quasispecies distribution according to clinical evolution or sampling origin*

193 UDS analyses generated between 205 and 32,693 reads per clinical sample (average of 15,034
194 reads; two samples below 1,000 reads) (Table 1). Concerning environmental samples, an
195 average of 17,134 reads was observed (min: 142 reads; max: 29,307 reads; one UW sample
196 below 1,000 reads). All HEV strains isolated from clinical and environmental samples belong
197 to G3. Most samples (30/36) are characterised by a major variant (> 70 % of the quasispecies),
198 followed by numerous minor variants (Figures 1 and 2).

199 Among clinical samples, P4 and P17 were distinctive by the presence of a second variant
200 representing up to 34 % of the quasispecies. The chronically infected P19 patient harbours
201 numerous strains with a major variant representing less than 20 % of the quasispecies (average
202 genetic distance between reads of 0.063), followed by 2 minor variants at 6.3 % and 5.5 %. The
203 other chronically infected patient P16 presents a quasispecies distribution with a genetic
204 distance of 0.011, close to those observed in acutely infected patients (0.004 to 0.032).

205 Concerning environmental samples, UW samples were distinguished by the presence of
206 numerous minor variants in favour of a mixture of several contamination ways (major variant
207 < 25 % of the total number of reads, first minor variants with a close frequency) (Figure 1).

208

209 *HEV amino acid mutations according to viral strain origin*

210 While the mutation C5381T observed in P4 has an impact on the corresponding aa sequence
211 (P76L regarding ORF2 and L89F regarding ORF3) (Figure 2), the C5394T and C5397T
212 mutations observed in P17 are silent regarding ORF2 but show the changes P93L and A94V
213 regarding ORF3.

214 Strains isolated from P16 harbour specific nucleotide mutations, leading to I56F substitution
215 and a 67-(D/G)P(H/R)PGSGAK-75 motif regarding ORF2, as well as the 77-LTL(T/A)H(I/V)-
216 82 and 87-PNPGSQ-92 motifs regarding ORF3, which are typical from HEV G3ra strains
217 commonly circulating in rabbits. The S79L substitution (ORF3) contained in this motif is also
218 found in 100 % of the studied variants isolated from P1. The H81C substitution (ORF3)
219 previously identified in WB (Fenaux et al., 2018), has also been detected at low frequency in
220 UW1 and P6 stool. At last, A74V (ORF2) and L87F (ORF3) substitutions were only detected
221 in variants isolated from two of the patients followed in Dijon.

222

223 The comparison between isolates of different origins through use of the VESPA software shows
224 several positions with a mutated aa at a variable frequency according to sample groups or
225 subgroups (supplementary data). In the ORF2 frame, the V67I substitution was frequent in SH
226 samples (82 %) compared to other groups and the S68L substitution observed at 98 % in animals
227 was more frequent than in other environment samples (Fisher exact test, p-value = 0.03). In the
228 ORF3 frame, the positions 78, 80, 81 show differences according to the virus origin and the
229 substitution R92H was more frequent in animals (99.6 %). The H81C substitution was observed

230 at 98 % in animals, which was significantly more frequent than in other environment samples
231 ($p = 0.04$). Moreover, most reads isolated from SH harbour the 78-MSFR-81 motif (62 % of
232 the studied reads) regarding ORF3 (Figure 2B), which is present in only 2 of the G3 reference
233 strains ($n=18$) proposed by Smith et al. [25].

234

235 Compositional differences between the major variant of strains isolated from environment
236 (without distinguishing origin, $n=11$) and humans ($n=25$) were also investigated to identify
237 molecular signatures which are significantly scarcely represented in humans (t-test, p -value $<$
238 0.05). Environmental sequences were used as positive samples and the most enriched sites are
239 L68 and P80 regarding ORF2, and M78, F80, C81 and V94 regarding ORF3 (Figure 3A).
240 Amino acids covariance analyses allowed to identify 435 pairs from environmental and human
241 samples. A total of 208 covarying pairs were included for environmental samples where each
242 pair is separated by a single combination of aa pair from all human samples. A minimum of 5
243 pairs were required to separate all environment samples from human. Using the CPLEX
244 interactive optimizer 12.9.0 as a solver, 15 correlated pairs separating environment samples
245 were identified in 30 optimal solutions (Figure 3B).

246

247 ***HEV mutations can modulate predicted antigenicity and hydrophobicity***

248 Considering ORF2, the P76L substitution observed in P4 leads to a decrease of the predicted
249 antigenicity (-38 %, aa74 position) (Figure 4A). The corresponding L89F has no impact
250 regarding ORF3 antigenicity. P93L and A94V substitutions observed in P17 lead to a 69 %
251 decrease of the antigenicity considering ORF3 (aa90 position) (Figure 4B) and the S96L
252 substitution commonly observed in samples leads to a decrease of 44 % (aa90 position) (Figure
253 4C).

254

255 The G3ra strain isolated from P16 (derived from rabbit strain) presents an original profile
256 (Figure 5). It appears to be more antigenic considering ORF2 (+52 %, aa70 position) and shows
257 modifications in ORF3 (-95 %, aa77 position; +72 %, aa86 position). The loss of antigenicity
258 is overall associated with an increase of the protein hydrophobicity. Among all the ORF3
259 mutations observed in this rabbit-like strain (*i.e.* P77L, S79L, Y80T, N82I, L87P, A88N, L89P,
260 D90G, R92Q), the single S79L substitution, which is also observed in patient P1 has an impact
261 regarding antigenicity (-29 %, aa75 position) and hydrophobicity (+0.095, aa79 position).

262

263 At last, while the H81R substitution has minor impact regarding the predictive ORF3
264 antigenicity, the H81C leads to a significant decrease (-52 %, aa80 position) (supplementary
265 data). When the T78M and Y80F are associated with H81R (*i.e.* 52 % of the clinical samples),
266 a loss of the predicted protein antigenicity (-53 %, aa74 position) is observed, and the
267 phenomenon is increased when T78M and Y80F are associated with H81C (-95 %, aa77
268 position), as observed in WB [16].

269

270 ***Functional tests***

271 The capacity of adhesion to hydrophobic beads has been tested for viruses isolated from P1
272 (G3f) and P16 patients (G3ra). For both isolates, envHEV derived from blood appears to be
273 hardly capable to adhere to hydrophobic beads, with a ratio beads/supernatant of 0.8 ± 0.3 and
274 0.9 ± 0.2 for G3f and G3ra strains, respectively. Regarding nHEV isolated from stool, the ratio
275 is 4.1 ± 2.1 for the G3f strain while it reaches 24.6 ± 13.1 for G3ra (Figure 6). Overall, naked
276 particles appear to be more hydrophobic than the corresponding enveloped particles (Mann-
277 Whitney-Wilcoxon test, p -value = 0.1), and a higher hydrophobicity is observed for HEV G3ra
278 strain compared to the common HEV G3f (p -value = 0.1), while no difference is observed
279 between their enveloped form (p -value = 0.825).

280

281 **Discussion**

282 Ultra-deep sequencing allows studying HEV quasispecies distribution and genetic mutations,
283 bringing potential benefices for a better understanding of HEV pathogeny and transmission, by
284 identifying molecular features, which may furthermore be studied in terms of functional
285 relevance, *i.e.* antigenicity and hydrophobicity.

286 We focus here on the ORF2/ORF3 overlap region, which plays different structural and
287 functional roles. ORF2 sequenced fragment (aa53 to aa84) is located upstream the S-domain
288 forming the capsid shell (aa129-319), but is essential to virion morphogenesis by interacting
289 with the genomic RNA [28]. In addition to their structural interest, a T-cell epitope function
290 may also be assumed for the aa73-156 peptide [29]. The corresponding ORF3 sequence (aa66
291 to aa96) is also of particular interest, including 1) the end of the proposed hydrophobic
292 transmembrane region (aa66 to aa71), 2) a proline-rich domain (aa74 to aa85) including the 74-
293 PXXP-77 domain and the possibly phosphorylated S79 [30] and 3) a part of the 95-PSAP-98
294 domain also involved in ORF3 phosphorylation [31].

295

296 We reported here a case of infection resulting from a HEV strain typically circulating in rabbits
297 (G3ra) [32]. HEV G3ra infections are infrequent and are not always the result of a direct contact
298 or consumption of rabbit meat. Hence, Abravanel et al. (2017) assumed the role of water in
299 their transmission. This hypothesis is likely, considering the mixture of HEV variants reported
300 here in UW, which is then released in the environment. It argues in favour of possible different
301 types of contamination routes and waterborne infections have thus to be considered, not only
302 in countries with poor sanitary conditions [33]. HEV G3ra has rather been associated with
303 immunocompromised patients suggesting a less infectious subtype [32]. Here again, infection
304 has been linked to immunosuppression. Regarding the genome fragment which was

305 investigated, the predicted antigenicity and hydrophobicity of HEV G3ra are substantially
306 different from those of a HEV G3f reference strain. Additionally, functional assays have shown
307 a better adhesion of naked HEV G3ra on a hydrophobic surface compared to naked HEV G3f.
308 The prediction of hydrophobicity using the AnTheProt software being performed on an internal
309 region of the shell (playing a minor role in the viral adhesion properties), making a correlation
310 with functional assays is biased. However, a difference of hydrophobicity has been observed
311 between HEV G3f and G3ra strains using both predictive and functional tests. Enveloped HEV
312 G3ra and HEV G3f present for their part a close hydrophobicity, which contrary to all
313 expectation is lower than that of the corresponding naked particles. Although the quasi-
314 envelope is made of cell-derived lipids, phospholipid tails are oriented inside the double
315 lipid layer which limits the hydrophobicity. Another explanation may be found through the
316 presence of the transmembrane ORF3 protein [34,35] which may influence the hydrophobicity
317 of the quasi-enveloped virus.

318

319 We previously evidenced a H81C substitution (ORF3) in samples originating from two WB
320 [16]. In the study presented here, the mutation has also rarely been reported in some minor
321 variants of clinical samples. We have evidenced both the S68L substitution in ORF2 and its
322 match in the ORF3 frame, H81C, to be more frequent in WB samples, compared to other
323 samples. H81C concerns a key region of the genome since mutations in aa80-82 have been
324 reported to impact virions release [35]. Very close to it, the T78M and Y80F substitutions,
325 which are commonly observed in this study (*i.e.* clinical samples as well as SH effluents) have
326 important impact regarding protein conformation, leading to a decrease of the predicted
327 antigenicity, and acting in synergy with the H81C substitution.

328 Still in the same location, the S79L substitution also reported here has been associated with a
329 significant loss of protein antigenicity. The aa79 is involved in the interaction between ORF2

330 and ORF3 proteins [24] and allows HEV to acquire its quasi-envelope through the interaction
331 between ORF3 and host proteins involved in budding [36]. Interestingly, the S79A mutation
332 (reported here in very rare variants of UW samples) is associated with abolishment of HEV
333 infectivity, but not the S79L. The S79L substitution has previously been observed by Norder et
334 al. (2018) in a serologically HEV-negative donor. As this substitution may prevent ORF3
335 phosphorylation, Norder et al. assumed the compensation of phosphorylation by an associated
336 A97S substitution (analyses performed here did not include this residue).

337 At last, L87F has exclusively been observed in two of the three patients followed in the
338 university hospital of Dijon (present in only 1 of the 18 G3 reference strains proposed by Smith
339 et al. [25]), but did not impact the predicted antigenicity. Although on the basis of a limited
340 number of samples, it raises the question of the circulation of a specific cluster in a given
341 geographical area.

342
343 Regarding HEV quasispecies distribution, most of the clinical samples collected in this study
344 present a major variant above 70 %. We however report a high heterogeneity in a chronically
345 infected patient, with a major variant at less than 20 %. HEV quasispecies heterogeneity has
346 previously been observed regarding the M and P domains of ORF2, as well as the proline rich
347 region and the macrodomain of ORF1, suggesting that the higher the variability is, the more
348 probable it is to move towards chronic infection [37,38]. On the other hand, another chronically
349 infected patient followed here presents a HEV variant distribution close to that of the other
350 patients of the cohort. However, no information concerning the duration of HEV infection is
351 available for these 2 patients, which may significantly influence the quasispecies dynamics. No
352 significant association has been noted between aa substitutions and the chronic state or the
353 severity of infection, but this have to be weighted by the few number of forms followed in the
354 cohort.

355

356 At last, when considering the wholeness of environmental strains, position-specific differences
357 and covariance analyses allowed to identify aa substitutions which are absent in strains isolated
358 from humans. Even if not informative for transmission ways, it raises the question of the
359 compartmentalization and the adaptability of strains under environmental selection pressure,
360 which is determinant when approaching HEV pathogenicity.

361

362 As a conclusion, a regular circulation of HEV both in humans and in the environment has been
363 brought out. Several mutations have been identified, which are linked with animal origin,
364 potentially with geographical source(s), and may have an impact on HEV properties regarding
365 antigenicity and hydrophobicity. The hydrophobic properties of two viral strains have been
366 studied and were modified in a similar way between naked and enveloped particles. Some
367 mutations associated to a modification of antigenicity have been described only in minor
368 variants, which might give HEV a possible host adaptation and immune escape.

369

370 **Acknowledgements**

371 We thank T Josse for his excellent technical assistance. We also thank the ‘Centre national de
372 référence du VHE’ of Toulouse (France), for the genotyping of the rabbit strain.

373

374 **References**

375

- 376 1. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A,
377 non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. **1983**; 20(1):23–31.
- 378 2. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years
379 down the memory lane. *Virus Res*. **2011**; 161(1):3–14.
- 380 3. Colson P, Raoult D. Autochthonous hepatitis E: a common and fatal but neglected
381 emerging disease in France. *Clin Microbiol Infect*. **2017**; 23(12):898–899.

- 382 4. Servant-Delmas A, Abravanel F, Lefrère J-J, et al. New insights into the natural history
383 of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused
384 immunocompetent patients in France. *J Viral Hepat.* **2016**; 23(7):569–575.
- 385 5. Dagneu M, Belachew A, Tiruneh M, Moges F. Hepatitis E virus infection among
386 pregnant women in Africa: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* **2019**;
387 19(1):519.
- 388 6. Yue N, Wang Q, Zheng M, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection among people
389 and swine in mainland China: A systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public*
390 *Health.* **2019**; 66(3):265–275.
- 391 7. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and
392 challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2018**; 15(2):96–110.
- 393 8. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing
394 Countries. *Viruses.* **2016**; 8(9).
- 395 9. Dalton HR, Izopet J. Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3
396 and 4 Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2018**; .
- 397 10. Ankcorn MJ, Tedder RS. Hepatitis E: the current state of play. *Transfus Med.* **2017**;
398 27(2):84–95.
- 399 11. Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus:
400 Infection beyond the liver? *J Hepatol.* **2017**; 66(5):1082–1095.
- 401 12. Cao D, Meng X-J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg*
402 *Microbes Infect.* **2012**; 1(8):e17.
- 403 13. He M, Wang M, Huang Y, et al. The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus
404 Suppresses TLR3-induced NF- κ B Signaling via TRADD and RIP1. *Sci Rep.* **2016**;
405 6:27597.
- 406 14. Kenney SP, Wentworth JL, Heffron CL, Meng X-J. Replacement of the hepatitis E virus
407 ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via
408 interaction with TSG101. *Virology.* **2015**; 486:198–208.
- 409 15. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, et al. Hepatitis E virus epidemiology in
410 industrialized countries. *Emerging Infect Dis.* **2003**; 9(4):448–454.
- 411 16. Fenaux H, Chassaing M, Berger S, et al. Molecular features of Hepatitis E Virus
412 circulation in environmental and human samples. *J Clin Virol.* **2018**; 103:63–70.
- 413 17. Smith DB, Paddy JO, Simmonds P. The use of human sewage screening for community
414 surveillance of hepatitis E virus in the UK. *J Med Virol.* **2016**; 88(5):915–918.
- 415 18. Boudaud N, Machinal C, David F, et al. Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages
416 during drinking water treatment at pilot scale. *Water Res.* **2012**; 46(8):2651–2664.

- 417 19. Brié A, Bertrand I, Meo M, Boudaud N, Gantzer C. The Effect of Heat on the
418 Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. *Food Environ Virol.* **2016**;
419 8(4):251–261.
- 420 20. Dika C, Ly-Chatain MH, Francius G, Duval JFL, Gantzer C. Non-DLVO adhesion of F-
421 specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness,
422 hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical
423 and Engineering Aspects.* **2013**; 435:178–187.
- 424 21. Xing L, Wang JC, Li T-C, et al. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic
425 domain. *J Virol.* **2011**; 85(2):1117–1124.
- 426 22. Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H. Development and validation of
427 an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E
428 virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods.* **2006**; 137(2):325–
429 333.
- 430 23. Hartard C, Gantzer C, Bronowicki J-P, Schvoerer E. Emerging hepatitis E virus
431 compared with hepatitis A virus: A new sanitary challenge. *Rev Med Virol.* **2019**;
432 :e2078.
- 433 24. Tong H van, Hoan NX, Wang B, Wedemeyer H, Bock C-T, Velavan TP. Hepatitis E
434 Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance. *EBioMedicine.* **2016**; 11:31–42.
- 435 25. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, et al. Proposed reference sequences for hepatitis E
436 virus subtypes. *J Gen Virol.* **2016**; 97(3):537–542.
- 437 26. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-
438 performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted
439 surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.*
440 **1986**; 25(19):5425–5432.
- 441 27. Vacic V, Iakoucheva LM, Radivojac P. Two Sample Logo: a graphical representation of
442 the differences between two sets of sequence alignments. *Bioinformatics.* **2006**;
443 22(12):1536–1537.
- 444 28. Xing L, Li T-C, Mayazaki N, et al. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals
445 an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem.* **2010**; 285(43):33175–33183.
- 446 29. Aggarwal R, Shukla R, Jameel S, et al. T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3
447 proteins of human hepatitis E virus. *J Viral Hepat.* **2007**; 14(4):283–292.
- 448 30. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus
449 is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol.* **1997**; 71(12):9045–
450 9053.
- 451 31. Norder H, Galli C, Magnil E, et al. Hepatitis E Virus Genotype 3 Genomes from RNA-
452 Positive but Serologically Negative Plasma Donors Have CUG as the Start Codon for
453 ORF3. *Intervirology.* **2018**; 61(2):96–103.
- 454 32. Abranavel F, Lhomme S, El Costa H, et al. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in
455 Humans, France. *Emerging Infect Dis.* **2017**; 23(7):1191–1193.

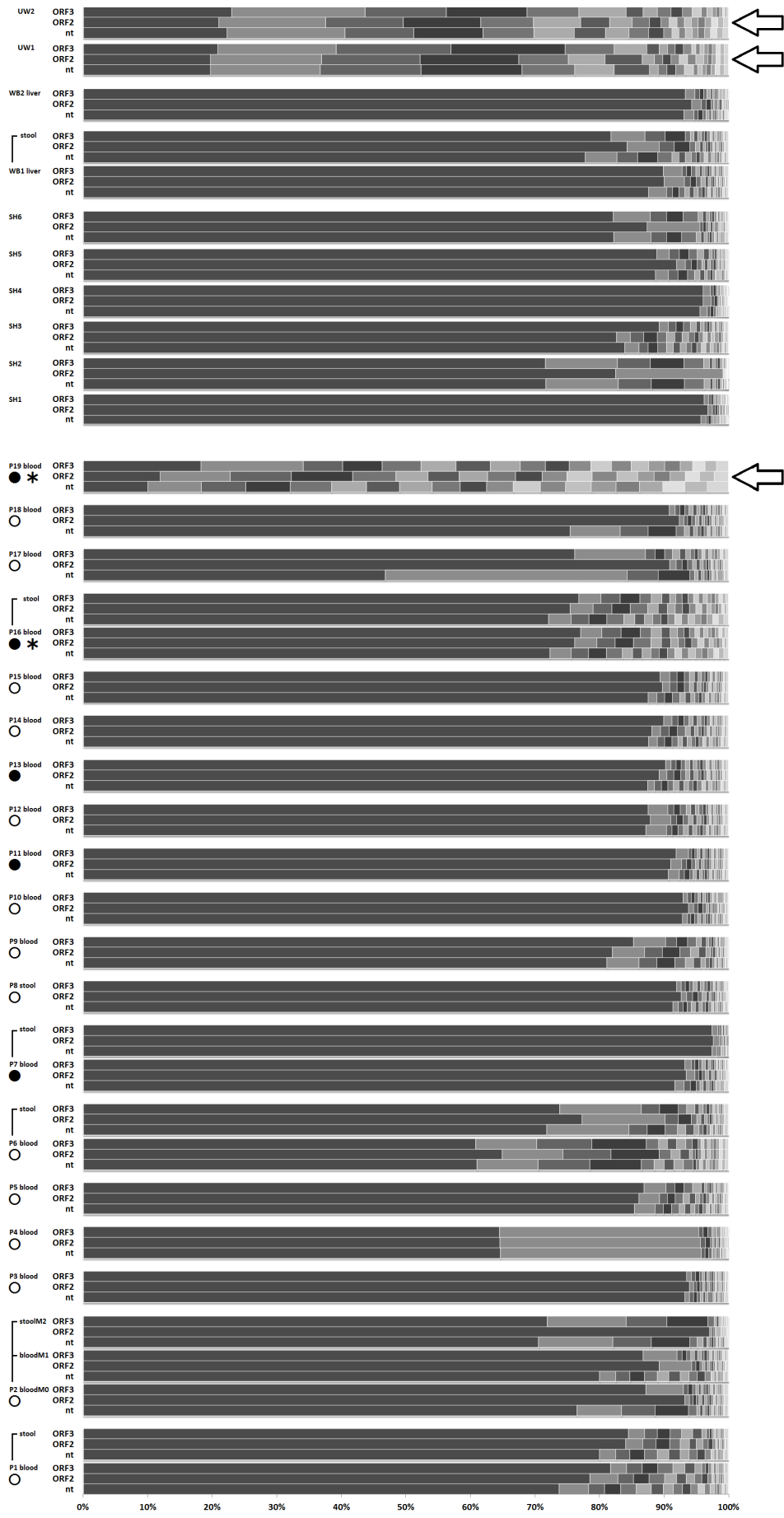
- 456 33. Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Transmission of
457 hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries. *Water Res.*
458 **2019**; 151:144–157.
- 459 34. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol.* **2013**; 48(2):147–158.
- 460 35. Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion
461 channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2017**;
462 114(5):1147–1152.
- 463 36. Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res.* **2011**; 161(1):65–77.
- 464 37. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the
465 outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol.* **2012**;
466 86(18):10006–10014.
- 467 38. Lhomme S, Garrouste C, Kamar N, et al. Influence of polyproline region and macro
468 domain genetic heterogeneity on HEV persistence in immunocompromised patients. *J*
469 *Infect Dis.* **2014**; 209(2):300–303.
- 470

Table 1: Patients' characteristics and number of UDS reads regarding HEV ORF2/ORF3 overlapping region. NR: not realised, NA: not applicable, ALAT: alanine amino transferase, PR: prothrombin ratio, IU: international units.

| | P1 | | P2 | | P3 | | P4 | | P5 | |
|--|--|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|--|---------------------|------------------------|--|
| Age | 46 | | 31 | | 46 | | 40 | | 71 | |
| Sex | M | | F | | M | | F | | F | |
| Date of sample (dd/mm/yy) | 25/10/18 (blood) | 22/10/18 (stool) | 29/11/18 (blood) | 28/12/18 (blood) | 10/01/19 (stool) | 06/04/17 (blood) | 29/08/17 (blood) | 05/05/18 (blood) | | |
| HEV Serology | IgG | NR | NA | NR | NR | NA | NR | NR | NR | |
| | IgM | NR | NA | NR | Negative | NA | Positive | Positive | Positive | |
| RNA concentration (IU/mL or IU/g) | 2.0x10 ⁶ | 5.6x10 ⁸ | 4.6x10 ⁷ | 9.8x10 ⁵ | 2.3x10 ⁴ | 3.1x10 ⁵ | 7.2x10 ³ | 1.7x10 ⁴ | | |
| ALAT | 67.5N | 27.3N | 6.6N | 41.1N | 3.6N | 107N | 7.6N | 4.7N | | |
| PR (%) | 100 | | 100 | 100 | NR | 100 | 95 | 88 | | |
| Context | - Epigastric pain, pruritus, icterus | | - High grade lymphoma - Discovery of biologic hepatic cytolysis - Icterus, pruritus | | - Discovery of biologic hepatic cytolysis - Asthenia | | - Flu syndrome - Anorexia - Dark urine | | Abdominal pain | |
| Acute/chronic hepatitis E | Clinical stabilisation | | Acute but treatment by Ribavirin (there was a need to continue chemotherapy quickly) | | Clinical stabilisation | | Acute | | Clinical stabilisation | |
| Follow up | Followed for hepatitis E during two months | | Followed for lymphoma | | / | | Followed for liver benign tumours | | / | |
| Number of UDS HEV reads | 7,995 | 7,528 | 24,441 | 25,837 | 27,149 | 32,693 | 15,796 | 1,187 | | |

| | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 | | |
|--|---|---|---|--|--|---|---------------------|---------------------|
| Age | 34 | 66 | 80 | 71 | 61 | 32 | | |
| Sex | F | M | M | F | M | F | | |
| Date of sample (dd/mm/yy) | 27/02/15 (blood) | 02/03/15 (stool) | 28/06/17 (blood) | 04/07/17 (stool) | 23/07/16 (stool) | 02/06/15 (blood) | 03/01/16 (blood) | 17/09/15 (blood) |
| HEV Serology | IgG | Positive | NA | NR | NA | Positive | Positive | Negative |
| | IgM | Positive | NA | Positive | NA | NA | Positive | Positive |
| RNA concentration (IU/mL or IU/g) | 2.0x10 ⁵ | 7.7x10 ⁷ | 6.7x10 ³ | 2.1x10 ⁴ | 1.3x10 ⁷ | 7.3x10 ⁵ | 3.5x10 ⁵ | 4.4x10 ⁷ |
| ALAT | 61N | 36N | 51.5N | 13.7N | N | 14N | 15N | 74N |
| PR(%) | 91 | 94 | 47 | 63 | 73 | 100 | 63 | 49 |
| Context | - Chemotherapy for breast cancer - Biological hepatic cytolysis - Fever (39°C), asthenia, myalgia, diarrhoea, vomiting, cough | - Fever - Cough - Asthenia - Biologic hepatic cytolysis - Discovery of cirrhosis with ascites (unknown cause) | - Icterus - Diarrhoea - Anorexia and weight loss (12kg in a few months) | - Biological hepatic cytolysis - Asthenia, digestive symptoms | - Acute hepatitis - Cirrhosis (hepatitis C) | - Chemotherapy for breast cancer - Fever, nausea, myalgia - Acute hepatitis, with lowered prothrombin | | |
| Acute/chronic hepatitis E | Acute | NA | Clinical stabilisation | Clinical stabilisation | Acute | Acute | | |
| Follow up | Followed for breast cancer | Deceased in a context of acute renal failure (unknown cause) | / | Followed for Crohn's disease | Followed for diabetes and post hepatitis C cirrhosis | Followed for breast cancer | | |
| Number of UDS HEV reads | 205 | 4,684 | 20,036 | 26,054 | 28,234 | 15,796 | 29,964 | 22,474 |

| | P12 | P13 | P14 | P15 | P16 | P17 | P18 | P19 | |
|--|---|---|--|---|---|---|--|---|---------------------|
| Age at sample | 52 | 50 | 49 | 86 | 63 | 31 | 66 | 44 | |
| Sex | F | F | F | F | M | F | M | F | |
| Date of sample (dd/mm/yy) | 11/12/17 (blood) | 20/02/18 (blood) | 25/03/18 (blood) | 27/05/2018 (blood) | 22/11/18 (blood) | 10/12/18 (stool) | 07/06/2017 (blood) | 27/07/17 (blood) | 26/04/18 (blood) |
| HEV Serology | IgG | NR | NR | NR | NR | NA | NR | NR | NR |
| | IgM | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | NA | Positive | Positive |
| RNA concentration (IU/mL or IU/g) | 9.9x10 ³ | 3.3x10 ⁶ | 5.7x10 ⁵ | 1.2x10 ⁶ | 2.1x10 ⁸ | 1.7x10 ⁹ | 1.0x10 ⁶ | 2.2x10 ⁵ | 1.8x10 ⁴ |
| ALAT | 6.7N | 17.3N | 63.7N | 42.4N | 2.3N | NR | 46.1N | 5.8N | N |
| PR (%) | 94 | 48 | 89 | 58 (Apixaban) | 100 | NR | 100 | 100 | 100 |
| Context | - Liver transplant receiver (Rendu-Osler disease) - Biological hepatic cytolysis | - Chemotherapy for gastric cancer - Fever, liver pain, hepatic cytolysis, hepatic encephalopathy | - Icterus, abdominal pain, digestive symptoms, asthenia, icterus, dark urine | - Asthenia, icterus, dark urine - Anaemia - Inflammatory syndrome | - Twice renal transplant receiver (diabetic and vascular nephropathy) - Cirrhosis of unknown cause, metabolic syndrome (obesity) - Biological hepatic cytolysis several months before HEV diagnosis | - Asthenia, icterus, nausea, abdominal pain, dark urine, biological hepatic cytolysis | - Hepatomegaly, biological hepatic cytolysis | - Renal transplant receiver - Biological hepatic cytolysis | |
| Acute/chronic hepatitis E | Acute | NA | Clinical stabilisation | Clinical stabilisation | Chronic | Acute | Acute | Chronic | |
| Follow up | Followed for liver transplant | Deceased probably due to hepatitis E | / | / | Followed for cirrhosis and hepatitis E | / | / | / | |
| Number of UDS HEV reads | 926 | 2,586 | 1,908 | 2,019 | 27,791 | 25,141 | 5,143 | 17,921 | 2,343 |



472 **Figure 1: HEV quasispecies distribution based on the first 20 most-represented variants.**
473 Distribution is represented regarding nt sequences as well as corresponding aa sequences in
474 ORF2 and ORF3. P, patient; SH, slaughterhouse effluent; WB, wild boars; UW, urban
475 wastewater. ○, patient presenting mild infection; ●, severe infection; *, chronic infection.
476 The arrows highlight samples into which complex quasispecies have been found.
477
478

A

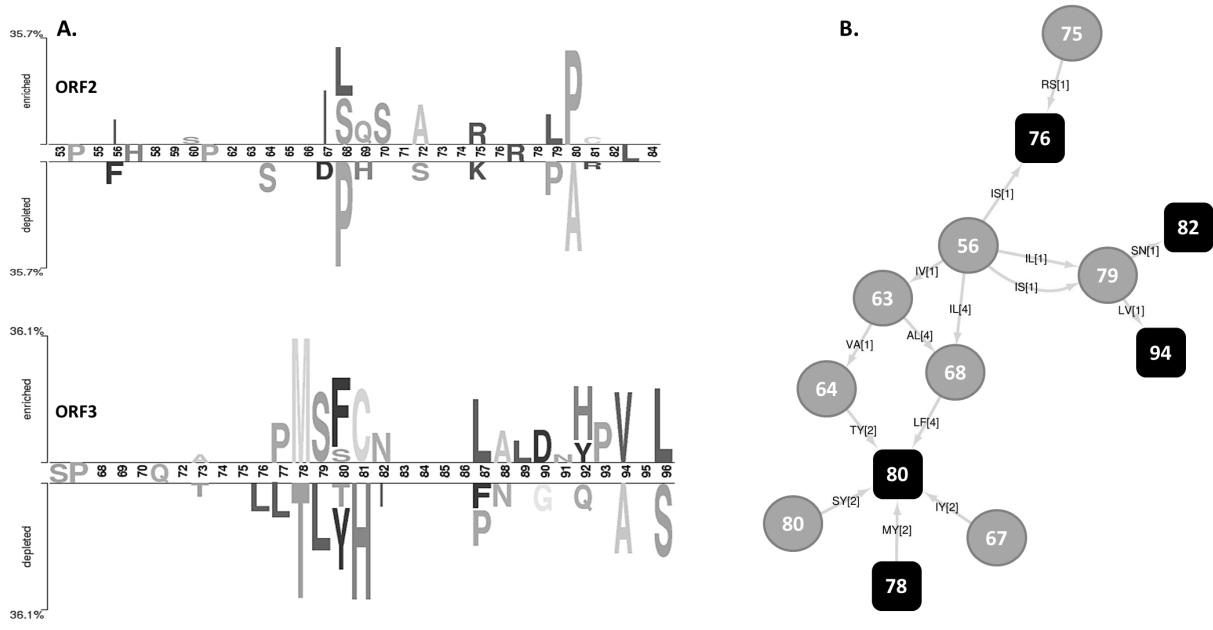
| HEVG3ref_ORF2 | 53- LPYI HPTN PFAADVVS QPGAGARPRQPARPLG-84 |
|--------------------|--|
| P1 blood_Majo78 |V.....P |
| P1 blood_Mino4 |G.....P |
| P1 stool_Majo85 |P |
| P1 stool_Mino2 |G.....P |
| P1 stool_Mino2 |V.....P |
| | |
| P2 bloodM0_Majo93 |T.....S |
| P2 bloodM0_Mino1 |T.....P |
| P2 bloodM0_Mino0.5 |T.....S |
| | |
| P2 bloodM1_Majo89 |T.....S |
| P2 bloodM1_Mino1 |T.....S |
| P2 bloodM1_Mino1 | F.....T.....S |
| P2 stoolM2_Majo97 |T.....S |
| P2 stoolM2_Mino0.5 | D.....T.....S |
| P2 stoolM2_Mino0.5 |T.....P |
| P2 stoolM2_Mino0.5 |T.....S |
| P2 stoolM2_Mino0.5 |T.....R S |
| | |
| P3 blood_Majo94 |S.....P |
| P3 blood_Mino1 | V.....S.....P |
| P3 blood_Mino0.5 | S.....S.....V |
| P3 blood_Mino0.5 | S L P.....S |
| P3 blood_Mino0.5 | T.....S L P S.....S |
| | |
| P4 blood_Majo65 |P.....L |
| P4 blood_Mino31 |P.....L |
| P4 blood_Mino1 |P.....P |
| P4 blood_Mino0.5 |P.....X |
| P4 blood_Mino0.5 |P R.....P |
| | |
| P5 blood_Majo87 |S.....P |
| P5 blood_Mino3 | F.....P.....P |
| P5 blood_Mino1 |L.....P |
| | |
| P6 blood_Majo70 |P.....P |
| P6 blood_Mino10 |P.....P |
| P6 blood_Mino8 | V.....S.....P |
| P6 blood_Mino2 |I.....P |
| P6 blood_Mino1 | S.....P S.....P |
| P6 stool_Majo79 |P.....P |
| P6 stool_Mino12 |L.....P |
| P6 stool_Mino2 | P.....P S V.....P |
| P6 stool_Mino1 |P.....S |
| P6 stool_Mino0.5 |P S.....L P |
| | |
| P7 blood_Majo94 |P.....P |
| P7 blood_Mino1 |P.....S |
| P7 blood_Mino0.5 |P S.....P |
| P7 blood_Mino0.5 | S.....P.....V |
| P7 stool_Majo98 |P.....P |
| P7 stool_Mino0.5 |P S.....P |
| P7 stool_Mino0.5 | L.....I P.....P |
| P7 stool_Mino0.5 | D.....I P.....P |
| P7 stool_Mino0.5 | T P.....P.....P |
| | |
| P8 stool_Majo93 |P.....P |
| P8 stool_Mino1 |L.....P |
| P8 stool_Mino1 |P.....P A |
| P8 stool_Mino1 |P S.....L |
| P8 stool_Mino1 | I P.....P |
| | |
| P9 blood_Majo84 |P.....P |
| P9 blood_Mino5 |P S.....L P |
| P9 blood_Mino3 |P S.....P |
| P9 blood_Mino2 | V.....P S.....P |
| P9 blood_Mino2 |P S.....H P |
| | |
| P10 blood_Majo94 |S.....P |
| P10 blood_Mino1 |P S.....P |
| P10 blood_Mino1 | I P.....P |
| P10 blood_Mino0.5 |L.....P |
| P10 blood_Mino0.5 | T.....L.....P |
| | |
| P11 blood_Majo91 |S.....V |
| P11 blood_Mino2 | S.....S.....V |
| P11 blood_Mino1 | S I.....S.....V |
| P11 blood_Mino0.5 | S.....S.....X |
| P11 blood_Mino0.5 | S P.....S.....V |
| | |
| P12 blood_Majo88 |S.....L |
| P12 blood_Mino3 | G.....P.....S |
| P12 blood_Mino1 |P.....X |
| P12 blood_Mino1 |S.....V |
| P12 blood_Mino1 |S.....X |
| | |
| P13 blood_Majo89 |P.....P |
| P13 blood_Mino1 |P S.....P |
| P13 blood_Mino1 |L.....P |
| | |
| P14 blood_Majo89 | S L P.....T |
| P14 blood_Mino1 | S L P.....T V |
| P14 blood_Mino1 | S L P.....T X |
| P14 blood_Mino1 | S L P.....T L |
| | |
| P15 blood_Majo90 |S.....L |
| P15 blood_Mino1 | V.....S.....L |
| P15 blood_Mino1 |S.....S L |
| | |
| P16 blood_Majo78 | F.....D P H S K |
| P16 blood_Mino3 | F.....D P R S K |
| P16 blood_Mino2 | F.....D H S K |
| P16 blood_Mino1 | F.....D P H S K |
| P16 stool_Majo77 | F.....D P R S K |
| P16 stool_Mino3 | F.....D P R S K |
| P16 stool_Mino3 | F.....D P R S K |
| P16 stool_Mino2 | F.....D H S K |
| P16 stool_Mino1 | F.....D P H S |
| | |
| P17 blood_Majo91 | S.....S |
| P17 blood_Mino1 | S.....S X |
| P17 blood_Mino1 | S.....S S |
| | |
| P18 blood_Majo92 |S V |
| P18 blood_Mino1 | T.....S V |
| P18 blood_Mino0.5 | G.....S V |
| P18 blood_Mino0.5 | P.....S V |
| | |
| P19 blood_Majo12 | V.....V T |
| P19 blood_Mino11 | V.....V S |
| P19 blood_Mino10 | V.....V T |
| P19 blood_Mino7 | T.....V S |
| P19 blood_Mino5 | V.....V S |

B

| HEVG3ref_ORF3 | 66- SPIFI QPTP SPTT SYH NNPGLLELALDSRPAPS-96 |
|---------------------|--|
| P1 blood_Majo83 |L A L |
| P1 blood_Mino2 |L L |
| P1 blood_Mino2 |L S L |
| P1 stool_Majo86 |L L |
| P1 stool_Mino2 |L A L |
| P1 stool_Mino2 |L L L |
| P1 stool_Mino2 |L S L |
| P1 stool_Mino2 |L M L |
| | |
| P2 bloodM0_Majo87 |L M F R |
| P2 bloodM0_Mino6 |L M F R |
| P2 bloodM0_Mino0.5 |L M F R |
| P2 bloodM0_Mino0.5 | L.....M F R |
| | |
| P2 bloodM1_Majo87 |L M F R |
| P2 bloodM1_Mino5 |L M F R |
| P2 bloodM1_Mino1 |L M F R |
| P2 stoolM2_Majo76 |L M F R |
| P2 stoolM2_Mino13 |L M F R |
| P2 stoolM2_Mino6 |L M F R |
| P2 stoolM2_Mino1 |L M F R P |
| P2 stoolM2_Mino10.5 |L M F R H |
| | |
| P3 blood_Majo93 |L M F R |
| P3 blood_Mino1 |L M F R G |
| P3 blood_Mino1 |L S M F R |
| P3 blood_Mino0.5 |L M F R S |
| P3 blood_Mino0.5 |L L |
| | |
| P4 blood_Majo65 |L |
| P4 blood_Mino31 |L F |
| P4 blood_Mino1 |L M F R H |
| P4 blood_Mino1 |L M F R H V |
| P4 blood_Mino0.5 |L M F R H V |
| | |
| P5 blood_Majo88 |L M F R |
| P5 blood_Mino3 |M F R S |
| P5 blood_Mino1 |M F R R |
| | |
| P6 blood_Majo86 |L M F R |
| P6 blood_Mino10 |L M F R H V |
| P6 blood_Mino9 |L M F R |
| P6 blood_Mino2 |L M F R H |
| P6 blood_Mino1 |L M F R H |
| P6 stool_Majo76 |L M F R H V |
| P6 stool_Mino12 |L M F R H V |
| P6 stool_Mino3 |L L R H |
| P6 stool_Mino1 |L M R H |
| P6 stool_Mino1 |L M R H |
| | |
| P7 blood_Majo93 |L M F R |
| P7 blood_Mino1 |L M F R V H V |
| P7 blood_Mino0.5 |L M L R H V |
| P7 blood_Mino0.5 |L M F R S |
| P7 stool_Majo97 | S.....L M F R H V |
| P7 stool_Mino1 |L M F R H V |
| P7 stool_Mino1 |L M F R H V |
| P7 stool_Mino0.5 |L M F R X H V |
| P7 stool_Mino0.5 |L M F R H |
| | |
| P8 stool_Majo92 |M F R |
| P8 stool_Mino5 |M F R S |
| P8 stool_Mino0.5 |L M F R H V |
| P8 stool_Mino0.5 |L M F R |
| P8 stool_Mino0.5 |L M F R V |
| | |
| P9 blood_Majo86 |L M F R |
| P9 blood_Mino5 |L M F R H |
| P9 blood_Mino2 |L S M F R H |
| P9 blood_Mino1 |L M F R H V |
| P9 blood_Mino1 |L M F R H V |
| | |
| P10 blood_Majo93 |L M F R |
| P10 blood_Mino1 |L M F R H V |
| P10 blood_Mino0.5 |L M F R G H |
| P10 blood_Mino0.5 |L M F R G H |
| P10 blood_Mino0.5 |L M F R H |
| | |
| P11 blood_Majo92 |L M F R |
| P11 blood_Mino2 |L M F R H |
| P11 blood_Mino0.5 |L M F R P S |
| P11 blood_Mino0.5 |L M F R S S |
| P11 blood_Mino0.5 |L M F R S |
| | |
| P12 blood_Majo88 |L A |
| P12 blood_Mino1 |L A S |
| P12 blood_Mino1 |L A X |
| P12 blood_Mino0.5 |L A X |
| | |
| P13 blood_Majo90 |L L R |
| P13 blood_Mino1 |L L R H |
| P13 blood_Mino1 |L L R H |
| P13 blood_Mino1 |L M R H |
| P13 blood_Mino0.5 |L M R H |
| | |
| P14 blood_Majo90 |L L |
| P14 blood_Mino1 |L L S L |
| P14 blood_Mino1 |L L L |
| P14 blood_Mino1 |L L L X |
| P14 blood_Mino0.5 |L L L L |
| | |
| P15 blood_Majo90 |L M F R |
| P15 blood_Mino1 |L M F R H S |
| P15 blood_Mino1 |L M F R H S |
| P15 blood_Mino1 |L M F R H S |
| P15 blood_Mino1 |L M F R H S |
| | |
| P16 blood_Majo79 | L L T I P N P G Q |
| P16 blood_Mino3 | L L T V P N P G Q |
| P16 blood_Mino1 | L L T I P N P G Q |
| P16 blood_Mino1 | L L T I P D P G Q |
| P16 stool_Majo78 | L L T I P N P G Q |
| P16 stool_Mino3 | L L T V P N P G Q |
| P16 stool_Mino3 | L L A I P N P G Q |
| P16 stool_Mino1 | L L T I P N P G Q |
| P16 stool_Mino1 | L L T I P D P G Q |
| | |
| P17 blood_Majo77 | L L T I L V |
| P17 blood_Mino11 | L L T I V |
| P17 blood_Mino1 | L L T I V F |
| P17 blood_Mino0.5 | L L T I L V |
| | |
| P18 blood_Majo91 |L M F F |
| P18 blood_Mino1 |L M F F |
| P18 blood_Mino1 |L M F F |
| P18 blood_Mino0.5 |L M F F |
| | |
| P19 blood_Majo19 |F |
| P19 blood_Mino6 |S F |
| P19 blood_Mino6 |S F |
| P19 blood_Mino6 |S F |
| P19 blood_Mino5 |L F |

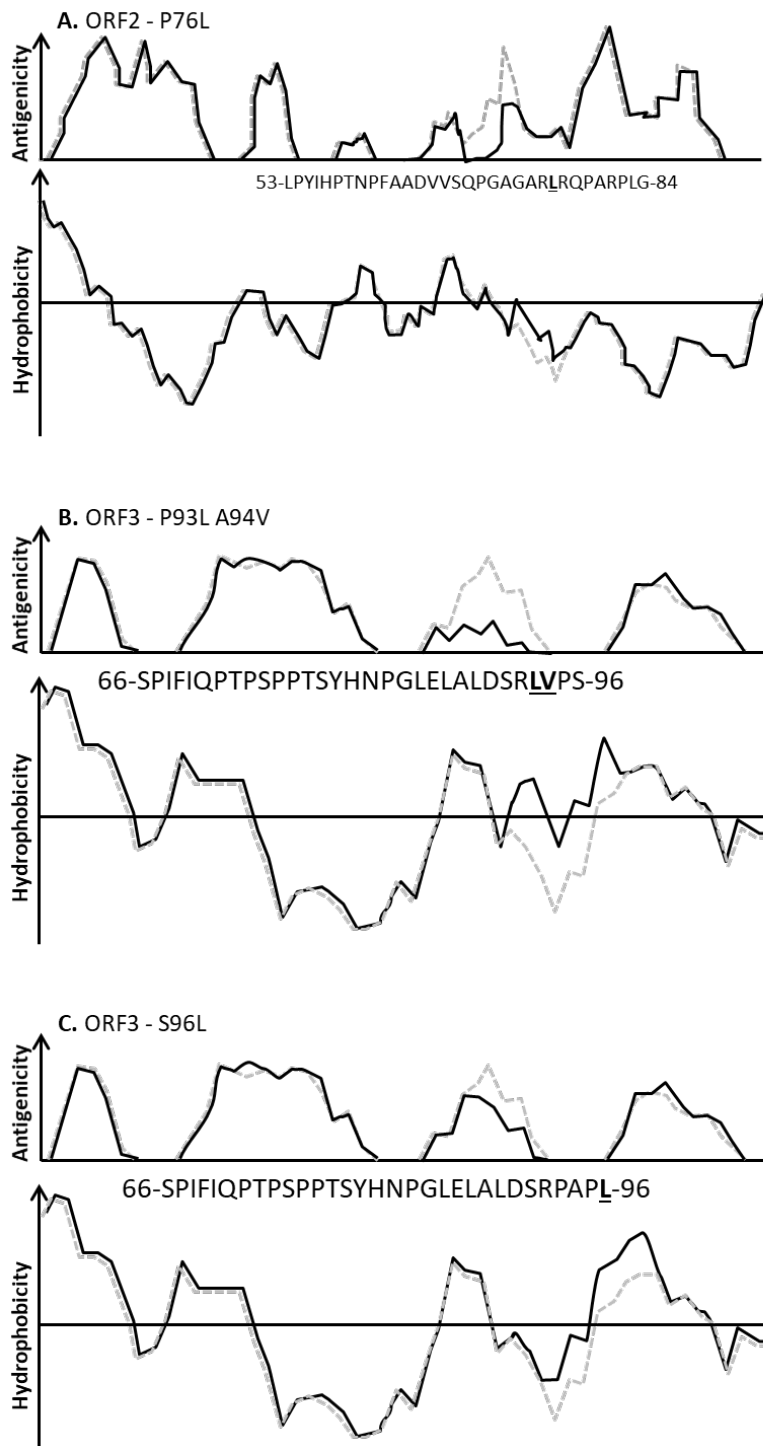
479
480
481
482
483

Figure 2: Amino acid sequences of the most represented HEV variants from clinical samples. A, ORF2 (aa53 to aa84). B, ORF3 (aa66 to aa96). Substitutions of interest are in boxes. HEV G3f AB369687 is used as a reference.



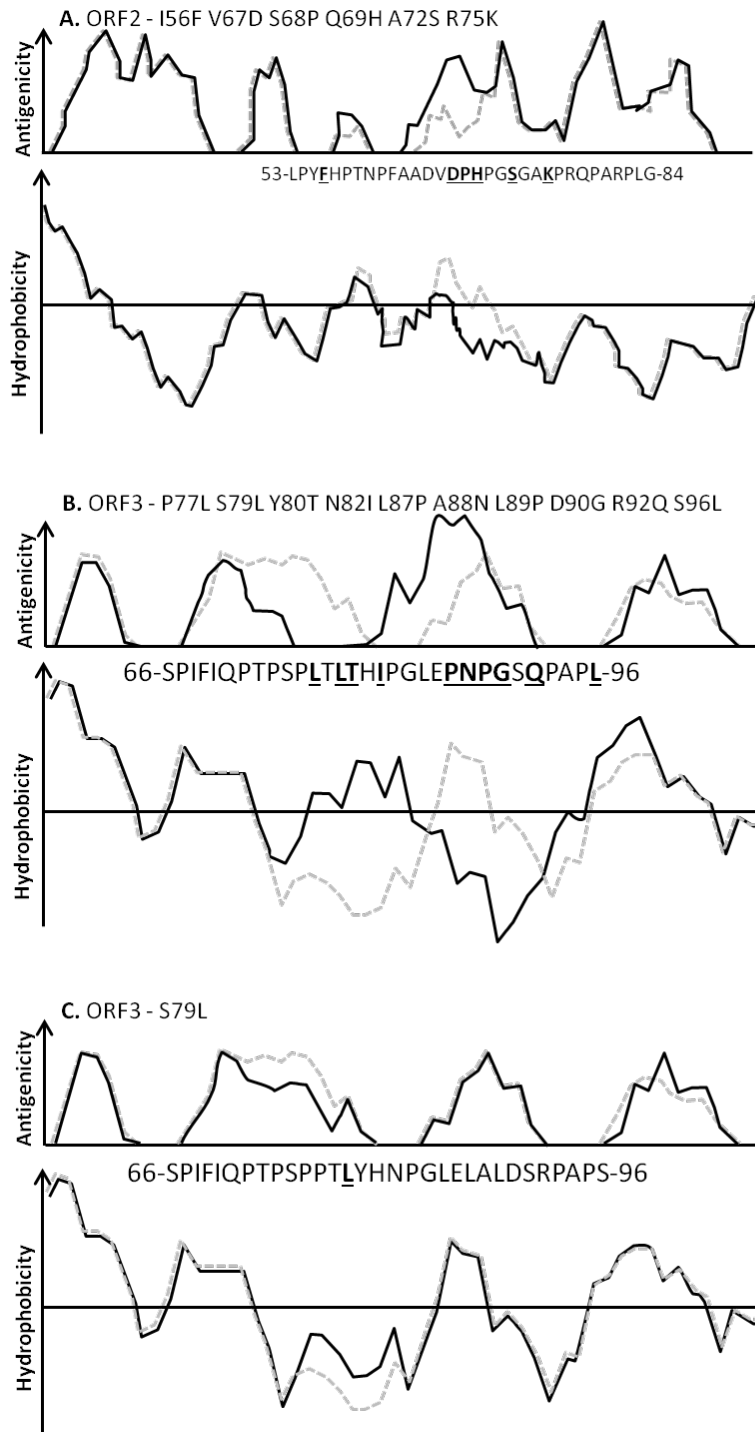
485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498

Figure 3: Amino acid differences between HEV strains circulating in environment and isolated from clinical samples. **A**, Two sample logo showing compositional differences between the 11 major variants isolated from environment (used as reference, *i.e.* enriched residues) and the 25 major variants isolated from humans (*i.e.* depleted residues), regarding ORF2 and ORF3. t-test, p-value <0.05. **B**, Covariance analysis: Network of optimal pairs separating environmental HEV strains from those isolated from humans. 15 correlated pairs separating environment samples were identified in 30 optimal solutions. Grey round, ORF2; black square, ORF3. Example: the M78 (ORF3) and Y80 (ORF3) combination was exclusively observed in environmental strains (n=2); the L68 (ORF2) and Y80 (ORF3) combination was exclusively observed in environmental strains (n=4).



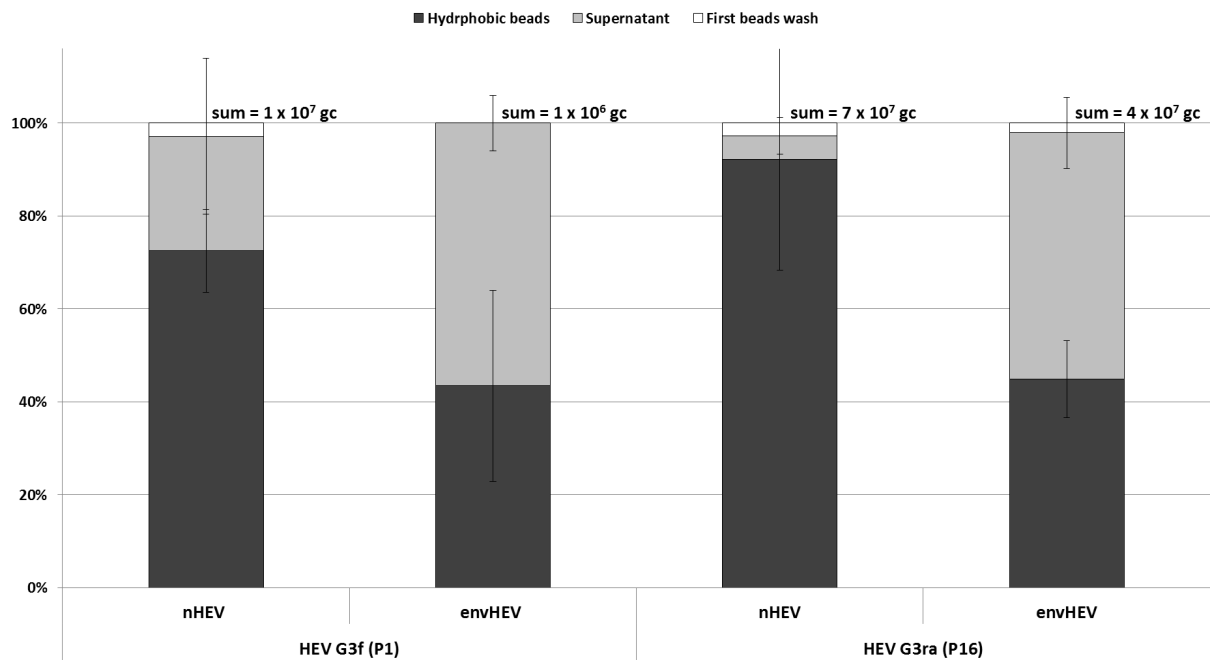
499

500 **Figure 4: Impact of aa substitutions regarding predicted antigenicity and hydrophobicity**
 501 **of HEV ORF2 and ORF3 proteins (AnTheProt software).** **A**, ORF2, P76L substitution
 502 identified in patient P4; antigenicity -38 % at the aa74 position, hydrophobicity +0.11 at the
 503 aa76 position. **B**, ORF3, P93L and A94V substitutions identified in patient P17; antigenicity -
 504 69 % at the aa90 position, hydrophobicity +0.160 at the aa92 position. **C**, ORF3, S96L
 505 substitution common in samples; antigenicity -44 % at the aa90 position, hydrophobicity
 506 +0.094 at the aa96 position. Grey dashes represent the reference profile of the HEV G3f
 507 AB369687, the commented positions are underlined.



508

509 **Figure 5: Impact of the aa substitutions identified in the HEV G3ra strain (patient P16)**
 510 **regarding predicted antigenicity and hydrophobicity, as well as the single S79L**
 511 **substitution (AnTheProt software). A, ORF2, antigenicity +52 % at the aa70 position,**
 512 **hydrophobicity -0.221 at the aa69 position. B, ORF3, antigenicity -95 % at the aa77 position**
 513 **and hydrophobicity +0.379 at the aa79 position, antigenicity +73 % and hydrophobicity -0.328**
 514 **at the aa86 position. C, ORF3, S79L mutation observed in patient P1, antigenicity -29 %, at the**
 515 **aa76 position, hydrophobicity +0.095 at the aa79 position. Grey dashes represent the reference**
 516 **profile of the HEV G3f AB369687, the commented position is underlined.**
 517



519

520 **Figure 6: Adhesion of HEV G3f (derived from P1) and G3ra strains (derived from P16)**
 521 **to hydrophobic beads.** nHEV: naked particles; envHEV: enveloped particles; gc: genome
 522 copies. Less than 3 % of the adhered particle's fraction is eliminated during the first beads wash.
 523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550 **Supplementary data**

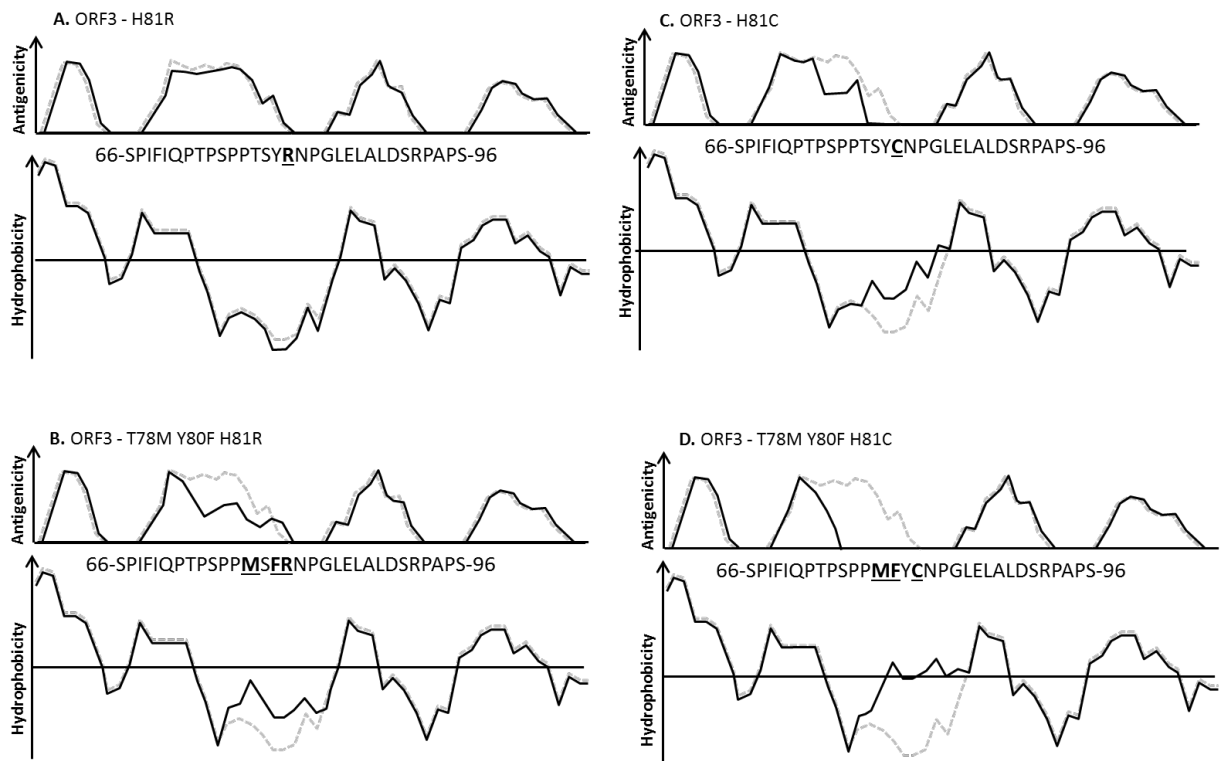
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565

Table 1: Main amino acid substitutions tested with the VESPA software and percentage of HEV UDS reads in which the substitution is present. *: significantly different percentage compared to other environmental samples.

| | Humans | Severe | Chronical | Acute non-severe | Environment | SH | UW | Animals |
|-------------|----------------|---------|-----------|------------------|----------------|---------|---------|----------|
| ORF2 | | | | | | | | |
| V67I | 34.14 % | 66.43 % | 0.00 % | 31.00 % | 55.87 % | 82.31 % | 0.19 % | 0.00 % |
| S68L | 0.36 % | 0.03 % | 0.00 % | 0.53 % | 21.44 % | 0.00 % | 0.18 % | 97.89 %* |
| S68P | 57.19 % | 70.29 % | 95.41 % | 46.27 % | 3.36 % | 0.31 % | 30.76 % | 0.00 % |
| P70S | 44.54 % | 33.60 % | 0.00 % | 55.99 % | 57.05 % | 44.01 % | 51.64 % | 100.00 % |
| A72S | 12.17 % | 0.00 % | 96.82 % | 0.05 % | 0.00 % | 0.00 % | 0.00 % | 0.00 % |
| A74V | 4.80 % | 0.00 % | 1.61 % | 6.80 % | 0.14 % | 0.14 % | 0.00 % | 0.20 % |
| A80P | 36.20 % | 69.73 % | 0.00 % | 33.08 % | 66.41 % | 62.63 % | 20.88 % | 99.47 % |
| ORF3 | | | | | | | | |
| S75L | 46.75 % | 99.68 % | 0.36 % | 39.75 % | 46.36 % | 52.73 % | 99.84 % | 0.00 % |
| T78M | 51.19 % | 66.06 % | 0.00 % | 56.36 % | 88.56 % | 95.53 % | 20.78 % | 99.97 % |
| S79L | 20.79 % | 0.03 % | 98.11 % | 12.49 % | 0.00 % | 0.00 % | 0.00 % | 0.00 % |
| Y80F | 51.29 % | 65.88 % | 1.89 % | 56.21 % | 65.62 % | 64.45 % | 3.92 % | 99.66 % |
| H81C | 0.29 % | 0.19 % | 0.00 % | 0.36 % | 21.17 % | 0.00 % | 0.16 % | 98.15 %* |
| H81R | 57.01 % | 69.66 % | 0.00 % | 63.91 % | 68.91 % | 97.76 % | 20.62 % | 1.85 % |
| R92H | 28.57 % | 69.51 % | 0.00 % | 21.79 % | 40.34 % | 24.58 % | 20.73 % | 99.59 % |
| A94V | 14.71 % | 65.82 % | 0.00 % | 2.33 % | 40.91 % | 28.67 % | 0.34 % | 99.40 % |
| S96L | 50.84 % | 0.13 % | 99.09 % | 56.83 % | 77.47 % | 73.25 % | 58.71 % | 100.00 % |

566
567
568
569
570
571
572
573

574
575
576
577
578
579
580
581
582



583
584
585
586

587 **Figure 1: Impact of the H81R/C (+/- T78M and Y80F) substitutions regarding predictive**
588 **antigenicity and hydrophobicity of HEV ORF3 protein.** **A**, ORF3 – H81R, minor impact
589 regarding antigenicity and hydrophobicity. **B**, ORF3 – T78M, Y80F, H81R, antigenicity -53%
590 at the aa74 position, hydrophobicity +0.136 at the aa77 position. **C**, ORF3 – H81C, antigenicity
591 -52% at the aa80 position, hydrophobicity +0.116 at the aa81 position. **D**, ORF3 – T78M, Y80F,
592 H81C, strain isolated from wild boars, antigenicity -95 % at the aa77 position, hydrophobicity
593 +0.253 at the aa80 position. Grey dashes represent the reference profile of the HEV3f
594 AB369687, the commented positions are underlined.

595

Discussion – Conclusion – Perspectives

Discussion

Au cours de ce travail, notre objectif était d'apporter un éclairage sur la circulation du VHE dans l'environnement dans une région appartenant à un pays industrialisé. Ceci a été réalisé par l'analyse génétique d'isolats de VHE provenant de différents types de prélèvements, humains et environnementaux. Les isolats de VHE ont été séquencés et les séquences ont été analysées en termes de répartition de la quasi-espèce, de recherche d'acides aminés spécifiques retrouvés de manière plus fréquente dans un type particulier de prélèvements et de prédictions d'antigénicité et d'hydrophobie, afin d'aborder le comportement du virus dans son environnement.

Dans un premier temps, nous discutons les prélèvements environnementaux, leur traitement ainsi que les difficultés techniques. Dans un deuxième temps, nous discutons des analyses génétiques effectuées dans les isolats, sur les différentes zones du génome séquencées.

La circulation du VHE dans l'environnement

Mise en évidence du VHE dans des prélèvements humains et environnementaux dans le Nord-Est de la France : estimation calculée du taux d'excréteurs

Le VHE est un virus très répandu dans le monde et actuellement considéré comme émergent dans les pays industrialisés. Sa fréquence et sa gravité potentielle en font un enjeu important de santé publique mais la circulation de ce virus dans l'environnement comporte encore des zones d'ombres.

Les génotypes 1 et 2 sont connus comme étant transmis principalement par voie hydrique tandis que les génotypes 3 et 4 sont principalement transmis par l'ingestion de viande (foie, notamment) d'animaux infectés. Cependant, pour ces deux derniers génotypes, des éléments laissent à penser qu'une transmission par voie hydrique existerait [217–220]. Diverses études portant sur des prélèvements hydriques dans des pays industrialisés ont permis de mettre en évidence le génome du VHE : en France [165,192], en Espagne [192,193], au Royaume-Uni [200], au Portugal [199] ou encore aux États-Unis [186].

Nous avons pu mettre en évidence le génome du VHE dans des prélèvements d'origine humaine, mais aussi dans des prélèvements d'origine animale et dans des prélèvements hydriques (sangliers sauvages, eaux usées d'un abattoir porcin et eaux usées urbaines), ce qui, à notre connaissance, n'avait pas été décrit dans la région.

Les charges virales observées dans les selles humaines étaient similaires à celles observées dans le foie et les selles de sanglier (de l'ordre de $7 \log_{10}$ UI/g). Les charges virales observées dans le sang des patients étaient de l'ordre de $5 \log_{10}$ UI/ml. Il existe un effet de dilution dans les prélèvements hydriques avec des charges virales observées de l'ordre de 1 à $2 \log_{10}$ UI/ml. Dans un prélèvement d'abattoir, la charge virale était de $6,4 \times 10^3$ UI/ml : ceci peut être à l'origine d'une pollution microbiologique importante de l'environnement [266].

Les infections par le VHE sont très fréquemment asymptomatiques et seuls les patients symptomatiques ont pu être pris en compte dans notre étude ; cependant les patients asymptomatiques excrètent du VHE dans leurs selles au moment de leur infection et ceci peut théoriquement être retrouvé dans les eaux usées urbaines. Les phages ARN F-spécifiques de génogroupes II et III sont excrétés par l'Homme [267] avec une concentration de 10^4 U/g de selles chez les excréteurs (environ 20% de la population humaine [268,269]) et sont retrouvés dans les eaux usées urbaines à une concentration de 10^6 U/l [270]. Le VHE est retrouvé à des concentrations de l'ordre de $7 \log_{10}$ UI/g dans les selles humaines [271] et $2 \log_{10}$ UI/l dans les eaux usées urbaines, ce qui donnerait, à un moment donné, un taux d'excréteurs de 2×10^{-6} % de la population de notre région.

Méthodes de concentration des particules virales dans les échantillons hydriques

L'effet de dilution rend plus difficile l'étude des échantillons hydriques. Afin de les concentrer, nous avons utilisé une méthode consistant en une acidification du milieu (afin de passer en dessous du point isoélectrique des particules virales et de les charger positivement), puis une mise en contact du prélèvement avec de la poudre de verre (chargée négativement) afin que les particules virales puissent y

adhérer. L'élu­tion des particules virales était ensuite réalisée avec du tampon extrait de bœuf – glycine (riche en protéines) ayant un pH alcalin (de façon à passer au-dessus du point isoélectrique des particules virales et ainsi les charger négativement). Les étapes de filtration permettaient de retirer des agrégats (présents notamment dans les prélèvements d'eaux usées de l'abattoir).

Nous avons utilisé, lors de la campagne de prélèvements hydriques de 2018, le FCV afin de mesurer le rendement du prétraitement. Dans la mesure où la concentration et la récupération de virus dans des prélèvements environnementaux est techniquement difficile, la norme considère un rendement comme acceptable à partir de 1% [81]. Le rendement calculé donnait des résultats faibles, cependant notre méthode de prétraitement nous a permis d'obtenir des résultats positifs en VHE. Des études réalisées étudiant le rendement de différentes méthodes montrent des résultats variables. Une étude a été réalisée pour comparer différentes méthodes de prétraitement : en ce qui concerne l'adénovirus, les méthodes d'adsorption filtration monolithique et de précipitation au polyéthylène glycol montraient des rendements de l'ordre de 10%, tandis que les méthodes de filtration sur laine de verre et de floculation au lait écrémé présentaient des rendements inférieurs à 1% [272]. Une autre étude portant sur une méthode de concentration par floculation au lait écrémé montrait des rendements de 66% pour les adénovirus humains, 24% pour le phage MS2, 28% pour les rotavirus et 15% pour le virus de la diarrhée virale bovine [273]. D'autres études montrent des rendements supérieurs à 10% [274,275].

La qualité de la poudre de verre peut avoir un impact sur ces étapes de prétraitement. Au cours des deux premières campagnes de collecte d'échantillons lors de nos travaux, nous avons utilisé la même poudre de verre sodocalcique, tandis que nous avons dû en utiliser une production différente pour la troisième campagne, chez un fournisseur différent – il s'agissait, cette fois, de poudre de verre boro-silicatée. Nous avons retrouvé plus de prélèvements positifs sur les deux premières campagnes qu'au cours de la troisième : cela pourrait s'expliquer par la différence de poudre de verre, la poudre boro-silicatée entraînant un prétraitement de moindre qualité et un rendement moindre ; il serait intéressant de refaire cette expérience avec une poudre de verre de type sodo-calcique lors d'éventuelles campagnes ultérieures.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection de virus dans des prélèvements hydriques environnementaux, il est possible d'utiliser des volumes de départ plus importants, cependant cela augmente également la concentration des inhibiteurs de PCR [276].

La méthode que nous avons utilisée, bien que présentant de faibles rendements et entraînant des inhibitions de PCR sur certains prélèvements nous a permis de mettre en évidence la présence du VHE dans plusieurs prélèvements. Nous devons encore améliorer nos méthodes de prétraitement et concentration des prélèvements hydriques.

Plusieurs techniques ont été décrites, dont une utilisant une floculation au lait écrémé. Celle-ci a été comparée à une méthode d'ultracentrifugation. Les deux méthodes donnent des résultats comparables mais la seconde méthode nécessite une ultracentrifugeuse, ce qui peut représenter un obstacle dans certains laboratoires [276].

De nombreuses techniques se basent sur l'adsorption des particules virales sur des filtres selon leur charge [277]. Cependant l'élution, étape nécessaire après l'adsorption pose des problèmes d'efficacité et de nécessité de grands volumes de tampon d'élution nécessitant donc ensuite une nouvelle étape de concentration. Une méthode intéressante a été décrite : une résine échangeuse d'anions est introduite dans le prélèvement puis, après incubation, les acides nucléiques sont extraits directement à partir de la résine. Cette méthode a été testée sur des adénovirus, VHA et rotavirus et montre de bons résultats [277]. Elle pourrait à l'avenir être testée sur le VHE.

Prélèvement de dreissènes comme approche de l'analyse d'eaux de surface

Nous avons souhaité rechercher la présence du VHE dans des eaux de rivière. Cependant, les virus étant très dilués dans ce type de milieu, il faut prélever de très grandes quantités afin d'effectuer une concentration des virus, ce qui est techniquement difficile et sujet à des rendements souvent insuffisants et peut générer des concentrations d'inhibiteurs de PCR. Les fruits de mer sont des animaux qui se nourrissent par filtration de l'eau dans laquelle ils se trouvent et sont connus

pour concentrer des particules virales qui seraient présentes dans le milieu [187,278,279]. De même, les dreissènes ont la capacité de concentrer des virus [280,281]. Nous avons donc utilisé des dreissènes afin de concentrer des particules virales éventuellement présentes dans les eaux douces de rivières. Une étude recherchant des phages a été réalisée dans notre équipe sur des dreissènes des mêmes sites et retrouve la présence de phages (non typés) allant de 3 à 275 UFP/g, indiquant une pollution d'origine fécale (Capizzi S, en cours d'écriture).

Nous avons obtenu un signal positif par PCR détectant l'ARN du VHE pour un prélèvement de dreissènes localisé à Petite-Rosselle. Ce signal était faible (39,95ct) ; nous avons retrouvé un signal en amplification pré-séquençage mais nous n'avons pas pu obtenir de séquence de VHE en séquençage direct (après deux tentatives sur deux extraits différents). La question qui se pose est celle d'une faible quantité de VHE *versus* une contamination de l'extrait et de l'amplification d'une séquence d'un autre prélèvement en séquençage haut débit. Il est possible que le prélèvement contienne une faible quantité de VHE, qui n'aurait pas été amplifiée dans toutes les PCR du fait de la sensibilité de la technique et qui aurait pu être retrouvée en séquençage haut débit mais pas en séquençage direct (le séquençage haut débit est plus sensible). Une répartition inhomogène des virions présents en faible quantité dans le prélèvement ne peut pas être exclue ; la même méthode d'extraction a été utilisée pour les deux extraits de ce prélèvement mais le rendement a pu varier entre les deux extractions entraînant une faible positivité dans un extrait et pas dans l'autre. Enfin, le premier extrait ayant été manipulé avec le témoin positif, une contamination n'est pas à exclure, d'autant plus que les variants majoritaires des deux prélèvements sont identiques à l'échelle nucléotidique.

Approche de la variabilité du VHE par séquençage nucléotidique et de son impact biologique

Génotype

Tous nos prélèvements positifs présentaient un VHE de génotype 3. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où le génotype 3 est le plus fréquemment décrit en France [260]. La détermination du sous-génotype est plus

compliquée, dans la mesure où de nombreuses séquences de la littérature sont citées sans leur sous-génotype, où les classifications sont modifiées et où une séquence peut correspondre à plusieurs sous-génotypes différents. Seul le génome complet peut répondre de façon systématique à la question du sous-type viral.

Répartition intra-échantillon

- Dans la STEP

Nous avons pu mettre en évidence une distribution particulière des variants dans les prélèvements de STEP, avec la coexistence de nombreux variants de différentes origines. Les eaux usées urbaines semblent donc être polluées par des souches de VHE de différentes origines et pas uniquement d'origine humaine : la STEP de Maxéville reçoit des eaux usées d'origine humaine mais des humains peuvent excréter du VHE d'origine animale après contamination par voie zoonotique. Les STEP peuvent être des sources de pollution microbiologique pour l'environnement en cas d'élimination virale non optimale lors du traitement des eaux usées ou en cas de fortes intempéries entraînant un débordement : tous ces isolats de différentes origines pourraient donc circuler dans l'environnement à partir de la STEP.

- Dans les prélèvements humains

Des études montrent que, dans les domaines P et M d'ORF2 ainsi que dans la région riche en proline et le macrodomaine d'ORF1, plus la variabilité est élevée et plus la probabilité de développer une infection chronique est élevée [87,149]. Nos analyses ont porté principalement sur la région de chevauchement ORF2/ORF3 et nous avons effectivement observé une répartition particulière (pas de variant majoritaire mais un mélange de nombreux variants) chez une patiente qui est connue comme étant infectée de manière chronique par le VHE. Chez le patient 14, probablement infecté chroniquement, la répartition intra-échantillon montrait des variants minoritaires surreprésentés par rapport à la plupart des autres patients (variants minoritaires représentés chez P14 à hauteur de 2-3%) : ce profil est également retrouvé chez des patients ayant guéri, et nous n'avons pas d'informations disponibles quant à la date de l'infection chez le patient 14.

Recherche de signatures moléculaires particulières

Nous avons pu mettre en évidence des signatures moléculaires particulières dans les prélèvements de sangliers mais aussi dans les prélèvements d'un patient infecté par un VHE de type lapin. Bien que des infections d'humains avec des VHE de type lapin aient été décrites [282–284], ces signatures n'ont pas été mises en évidence ; en revanche, une insertion dans le domaine X d'ORF1 a été mise en évidence [283–285]. Ces acides aminés particuliers peuvent entraîner, d'après les modèles de prédiction, des modifications d'antigénicité et d'hydrophobie à la surface du virus. Ceci pourrait avoir un impact sur l'interaction du VHE avec les surfaces de son environnement (augmentation ou diminution de l'adhésion), le système immunitaire de l'hôte (échappement immunitaire) et les récepteurs des cellules cibles.

Des tests fonctionnels doivent être menés afin de mesurer cet impact avec des virus sous forme non enveloppée et sous forme quasi-enveloppée mais aussi avec des virus présentant des substitutions d'acides aminés particulières.

Choix des systèmes d'amorces – Mise en évidence de substitutions d'acides aminés particulières

- ORF2

Sur le gène ORF2, nous avons pu séquencer un fragment en N-terminal (acides aminés 53 à 84) et un fragment au sein du domaine M (acides aminés 385 à 455). Cela ne nous permet pas d'avoir une vue d'ensemble des substitutions d'acides aminés sur la protéine de capsid des virus issus de nos prélèvements. Le fragment N-terminal a été choisi car le système d'amorces correspondant permet une détection de l'ARN du VHE avec une sensibilité élevée – ce qui nous a permis d'obtenir des séquences sur les prélèvements hydriques – et la zone de fixation des amorces est conservée [259]. De plus, les fonctions de la protéine ORF3 et de la portion N-terminale d'ORF2 sont de mieux en mieux connues.

Les substitutions T59A et S390L entraînent un virus atténué chez le cochon [127]. Nous ne retrouvons pas la substitution S390L dans nos prélèvements mais nous retrouvons la substitution T59A à hauteur de 0,6% dans les selles d'un de nos sangliers, pour lequel nous n'avons pas d'informations sur l'âge (et à hauteur de 0,1% dans le foie du même sanglier). Les substitutions T59A et S390L entraînent

une excrétion virale fécale d'apparition retardée et de durée plus faible, cependant nous ne pouvons pas mesurer l'impact sur ce sanglier dont nous n'avons qu'un seul prélèvement fécal.

Au niveau de la protéine de capsid, plusieurs sites antigéniques ont été décrits : un épitope immunodominant conformationnel entre les acides aminés 394 et 457 et un épitope neutralisant entre les acides aminés 452 et 617 [22]. Des épitopes linéaires ont également été décrits au niveau des acides aminés 410 à 415 et 426 à 429 [23] ainsi que 403 à 418 et 423 à 443 [286]. Nous avons mis en évidence des substitutions d'acides aminés dans et à proximité de ces zones, avec des modifications de l'antigénicité prédite, ce qui pourrait avoir un impact en termes d'échappement immunitaire ou de liaison du virus à son récepteur cellulaire. Les modifications d'antigénicité prédite s'accompagnent le plus souvent de modifications d'hydrophobie prédite : celles-ci peuvent avoir un impact sur l'hydrophobie globale du virus, sur son comportement dans l'environnement et donc sa transmission.

Il serait intéressant de séquencer la portion C-terminale de la protéine de capsid, qui est la plus exposée et au sein de laquelle les modifications d'acides aminés ont le plus d'impact sur les interactions du virus avec son environnement extérieur immédiat (surfaces, immunité de l'hôte).

- ORF3

Sur le gène ORF3, nous avons pu séquencer le fragment situé entre les acides aminés 66 et 96. Une zone de 25 acides aminés située entre les positions 57 et 81 a été décrite comme étant nécessaire pour l'interaction avec la protéine ORF2 [130]. Nous pouvons nous poser la question d'un impact sur cette interaction de la substitution H81C, que nous retrouvons dans le variant viral majoritaire des prélèvements de sangliers et dans divers variants moins représentés en STEP ou sur des échantillons humains. La substitution S79A (entraînant la substitution V66G dans le cadre ORF2) est décrite comme entraînant une diminution importante du pouvoir pathogène du virus, tandis que la substitution S79L (silencieuse dans le cadre ORF2) est décrite comme n'ayant que peu d'impact [34]. Dans nos séquences analysées, la substitution S79A est retrouvée dans 0,7% des séquences d'un prélèvement de STEP (de même que la substitution V66G dans le cadre ORF2). En revanche la substitution S79L est retrouvée dans 2,1% des séquences d'un

prélèvement de STEP et dans les prélèvements de plusieurs patients, jusqu'à 90% des variants (patiente 8). Ces patients présentent des tableaux cliniques variables : la patiente 8 (chez qui la substitution S79L est présente à hauteur de 90%) a présenté une hépatite E non sévère de résolution spontanée (cette patiente n'avait pas de terrain particulier) ; la patiente 9 (chez qui la substitution S79L est présente à hauteur de 0,7%) a eu une hépatite sévère et est décédée, probablement de son infection (il s'agissait d'une patiente traitée par chimiothérapie pour un cancer de l'estomac). Chez le patient 14 (probablement infecté de manière chronique, mais la date de l'infection demeure inconnue), la substitution S79L est présente à hauteur de 82 à 84% dans le sang et les selles tandis que chez le patient 13, n'ayant pas présenté d'hépatite sévère, la substitution S79L est présente dans le sang et dans les selles à hauteur de 86-87%. La patiente 4, traitée par une chimiothérapie dans le cadre d'un cancer du sein et ayant eu une hépatite E non sévère sans passage à la chronicité présente, dans son prélèvement de selles, la substitution S79L à un taux de 2,7%. La substitution S79L ne semble pas être corrélée à elle seule à la sévérité du tableau clinique chez nos patients ; il est cependant à noter que nous ne la retrouvons que dans des échantillons d'origine humaine et de STEP (mais l'effectif de nos autres types de prélèvements est faible).

Deux motifs PSAP importants pour la sortie du virion et l'acquisition de la quasi-enveloppe ont été décrits au sein de la protéine ORF3 entre les acides aminés 86 et 89 d'une part et entre les acides aminés 95 et 98 d'autre part. Le premier de ces deux motifs n'est présent que dans certains isolats de génotype 3 [131] ; il est absent de nos isolats. Le fragment que nous avons pu séquencer va jusqu'à l'acide aminé 96 inclus, donc nous n'avons que les deux premiers acides aminés du deuxième motif PSAP ; la substitution S96L est très fréquemment observée dans nos isolats, dans des proportions allant jusqu'à 100%. Une étude indienne a retrouvé une délétion de 246 nucléotides sur le gène ORF3 d'isolats, sans donner d'information particulière sur les conséquences [139] ; cette délétion ne se retrouve pas dans nos isolats. Cependant, le fragment amplifié par nos amorces (pour le séquençage et pour la PCR temps réel) se trouvant dans la zone décrite, il se pourrait que la présence de cette délétion soit associée à de faux négatifs dans les échantillons ainsi qu'à une impossibilité d'amplification et donc de séquençage.

Prédictions antigéniques

Nous avons réalisé les prédictions antigéniques avec le logiciel AnTheProt. Celui-ci utilise un modèle de prédiction décrit en 1986 et se basant, pour chaque acide aminé de la séquence, sur son hydrophobie, son accessibilité et sa flexibilité ainsi sur celles des trois acides aminés le précédant et le suivant [261]. Cependant, cette méthode ne prend pas en compte tous les facteurs pouvant impacter l'antigénicité d'une protéine, et notamment les modifications post-traductionnelles. La glycosylation de certains acides aminés pourrait influencer le repliement de la protéine et son antigénicité. Ceci n'est pas pris en compte dans les prévisions faites par le logiciel AnTheProt et pourrait mettre en défaut certaines prédictions antigéniques.

Conclusions et perspectives

Les résultats de notre étude apportent un éclairage supplémentaire sur la circulation du VHE dans l'environnement dans les pays développés. Nous avons pu mettre en évidence du VHE de différentes origines dans des prélèvements hydriques, corroborant l'hypothèse selon laquelle il existe une circulation du VHE dans l'eau dans les pays développés.

Nous aurions cependant besoin de collecter plus de prélèvements, afin d'avoir plus de séquences, notamment pour les animaux et les prélèvements de station d'épuration. Cela permettrait d'optimiser la mise en évidence des signatures moléculaires et d'analyser plus finement la répartition intra-échantillon des variants.

Nous avons pu identifier des substitutions d'acides aminés entraînant des modifications d'hydrophobie et d'antigénicité d'après notre modèle de prédiction. Nous allons mener des tests fonctionnels d'hydrophobie, en utilisant des virus purifiés de prélèvements sanguins et fécaux (présence ou non de quasi-enveloppe) et des billes hydrophobes en polystyrène afin de mesurer l'interaction entre les virus et ces particules. Ceci nous renseignera sur le comportement du virus selon la séquence et les substitutions présentes. Par ailleurs, nous allons également

synthétiser des pseudo-particules virales, dont certaines après mutagenèse dirigée, ce qui nous permettra d'effectuer des tests fonctionnels et de mesurer l'impact de certaines substitutions sur le comportement du virus et son interaction avec son environnement. Nous mettons en place un modèle de culture cellulaire du VHE sur des cellules HepaRG afin de pouvoir étudier les étapes d'entrée du virus dans la cellule cible. Ceci nous donnera des informations sur l'interaction du virus avec les cellules et les modifications virales pouvant entraîner un changement de ces interactions.

Valorisations scientifiques

Communications affichées :

- “Study of the Hepatitis E Virus Emergence in North Eastern France on Environmental and Human Samples”. **Fenaux H**, Eschlimann M, Jeulin H, Berger S, Bensenane M, Bronowicki JP, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Food and Environmental Virology conference, Kusatsu (Japon), 13 – 16 septembre 2016.
- « Émergence du virus de l'hépatite E chez l'Homme et dans l'environnement dans le Nord-Est de la France ». **Fenaux H**, Chassaing M, Blanger O, Jeulin H, Berger S, Eschlimann M, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Journées Francophones de Virologie, Paris, 30 – 31 mars 2017.
- « Émergence du virus de l'hépatite E chez l'Homme et dans l'environnement dans le Nord-Est de la France ». **Fenaux H**, Chassaing M, Gentilhomme A, Jeulin H, Berger S, Eschlimann M, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Journées Francophones de Virologie, Paris, 22 – 23 mars 2018.
- « Caractérisation moléculaire du génome du virus de l'hépatite E lors de manifestations cliniques polymorphes et voies potentielles de contamination ». Hartard C, **Fenaux H**, De Rougemont A, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Journées Francophones de Virologie, Paris, 28 – 29 mars 2019.

Communications orales :

- **Fenaux H**, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Bensenane M, Bronowicki J-P, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E (orateur). Hepatitis E virus emergence in North Eastern France. European Society for Clinical Virology, Stresa (Italie), 13 – 16 septembre 2017.
- Gentilhomme A (orateur), **Fenaux H**, Hartard C, Berger S, Jeulin H, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Circulation du virus de l'hépatite E entre l'Homme et l'environnement. Société française de microbiologie, Paris, 1 – 3 octobre 2018.
- **Fenaux H** (orateur), Gentilhomme A, Hartard C, Berger S, Jeulin H, Bronowicki JP, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Rôle de l'eau dans la circulation du virus de l'hépatite E, génotype 3. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 17 – 18 décembre 2018. **Prix RICAI dans la catégorie Virologie.**

Manuscripts :

Acceptés :

- Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. **Fenaux H**, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Gentilhomme A, Bensenane M, Bronowicki JP, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. J Clin Virol. 2018 Apr 5;103:63-70.
- Transmission of hepatitis E virus by water: an issue still pending in the industrialized countries. **Fenaux H**, Chassaing M, Berger S, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Water Res. 2019 Mar 15;151:144-157.

En préparation :

- Molecular features and surface properties of Hepatitis E Virus in human and environmental samples.

Références bibliographiques

1. Principaux repères sur l'hépatite E [Internet]. [cited 2019 Mar 10]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
2. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. **2014**; 34 Suppl 1:29–37.
3. Huraux J-M, Nicolas J-C, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale*. Editions Estem; 2003.
4. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res*. **2011**; 161(1):3–14.
5. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirol*. **1983**; 20(1):23–31.
6. Krawczynski K, Bradley DW. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis: Identification of Virus-Associated Antigen in Experimentally Infected *Cynomolgus* Macaques. *J Infect Dis*. **1989**; 159(6):1042–1049.
7. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*. **2016**; 97(3):537–542.
8. Sridhar S, Yip CCY, Wu S, et al. Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerg Infect Dis*. **2018**; 24(12):2241–2250.
9. Dalton HR, Izopet J. Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2018**; 8:a032144.
10. Cao D, Meng X-J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect*. **2012**; 1(8):e17.
11. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol*. **2006**; 80(12):5919–5926.
12. Kenney SP, Meng X-J. Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2019**; 9:a031724.
13. Kanade GD, Pingale KD, Karpe YA. Activities of Thrombin and Factor Xa Are Essential for Replication of Hepatitis E Virus and Are Possibly Implicated in ORF1 Polyprotein Processing. *J Virol*. **2018**; 92(6): e01853-17.
14. Panda SK, Varma SPK. Hepatitis e: molecular virology and pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol*. **2013**; 3(2):114–124.
15. Karpe YA, Lole KS. RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol*. **2010**; 84(18):9637–9641.
16. Nair VP, Anang S, Subramani C, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog*. **2016**; 12(4):e1005521.

17. Xing L, Li T-C, Mayazaki N, et al. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem.* **2010**; 285(43):33175–33183.
18. Mori Y, Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* **2011**; 161(1):59–64.
19. Behloul N, Wen J, Dai X, Dong C, Meng J. Antigenic composition and immunoreactivity differences between HEV recombinant capsid proteins generated from different genotypes. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* **2015**; 34:211–220.
20. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci.* **2009**; 106(31):12986–12991.
21. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J Hepatol.* **2016**; 65(1):200–212.
22. Meng J, Dai X, Chang JC, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology.* **2001**; 288(2):203–211.
23. Wang X, Zhao Q, Dang L, et al. Characterization of Two Novel Linear B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Avian Hepatitis E Virus (HEV) That Are Common to Avian, Swine, and Human HEVs. *J Virol.* **2015**; 89(10):5491–5501.
24. Chen Y, Liu B, Sun Y, et al. Characterization of Three Novel Linear Neutralizing B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Swine Hepatitis E Virus. *J Virol.* **2018**; 92(13): e00251-18.
25. [Cited 2018 Dec 1]. Available from: https://viralzone.expasy.org/806?outline=all_by_protein
26. Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep.* **2019**; 9(1):6243:1-15.
27. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, et al. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology.* **2018**; 154(1):211-223.e8.
28. Yin X, Li X, Feng Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. *Viruses.* **2016**; 8(8): E229.
29. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie.* **2017**; 141:70–79.
30. Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang Y-J. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J Virol.* **2009**; 83(13):6375–6382.
31. Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2017**; 114(5):1147–1152.
32. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol.* **2013**; 48(2):147–158.
33. Himmelsbach K, Bender D, Hildt E. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect.* **2018**; 7(1):196:1-12.

34. Graff J, Nguyen H, Yu C, et al. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol.* **2005**; 79(11):6680–6689.
35. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* **2007**; 127(2):216–228.
36. Zhang H, Dai X, Shan X, Meng J. Characterization of antigenic epitopes of the ORF2 protein from hepatitis E virus genotype 4. *Virus Res.* **2009**; 142(1–2):140–143.
37. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* **2016**; 90(8):4232–4242.
38. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic Cph Den.* **2015**; 16(4):398–416.
39. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, et al. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol.* **2012**; 86(10):5697–5707.
40. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* **2014**; 95(Pt 10):2166–2175.
41. Capelli N, Marion O, Dubois M, et al. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol.* **2019**; 93(4): e01207-18.
42. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* **2010**; 202(6):825–834.
43. Masuda J-I, Yano K, Tamada Y, et al. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* **2005**; 31(3):178–183.
44. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis.* **2003**; 188(6):944.
45. Meng X-J. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.* **2013**; 33(1):41–49.
46. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2018**; 15(2):96–110.
47. Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* **2016**; 150(2):355-357.e3.
48. Smith DB, Ijaz S, Tedder RS, et al. Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *J Gen Virol.* **2015**; 96(11):3255–3264.
49. Nelson KE, Labrique AB, Kmush BL. Epidemiology of Genotype 1 and 2 Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2019**; 9(6):a031732.

50. Rasche A, Saqib M, Liljander AM, et al. Hepatitis E Virus Infection in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983-2015. *Emerg Infect Dis.* **2016**; 22(7):1249–1252.
51. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries. *Viruses.* **2016**; 8(9):1-20.
52. Bouwknegt M, Engel B, Herremans MMPT, et al. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* **2008**; 136(4):567–576.
53. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis.* **2001**; 184(12):1594–1597.
54. Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, et al. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg.* **2007**; 77(5):893–896.
55. Howard CM, Handzel T, Hill VR, et al. Novel risk factors associated with hepatitis E virus infection in a large outbreak in northern Uganda: results from a case-control study and environmental analysis. *Am J Trop Med Hyg.* **2010**; 83(5):1170–1173.
56. Dalton HR, Seghatchian J. Hepatitis E virus: Emerging from the shadows in developed countries. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* **2016**; 55(3):271–274.
57. Renou C, Moreau X, Pariente A, et al. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment Pharmacol Ther.* **2008**; 27(11):1086–1093.
58. Guillaume M, Bensenane-Oussalah M, Peron JM, Bronowicki J-P. Les hépatites virales non-A, non-B, non-C, non-D. *Hépatogastro Oncol Dig.* **2018**; 25(1):52–69.
59. Donnelly MC, Scobie L, Crossan CL, Dalton H, Hayes PC, Simpson KJ. Review article: hepatitis E- a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* **2017**; 46(2):126–141.
60. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* **2014**; 27(1):116–138.
61. Sedhom D, D'Souza M, John E, Rustgi V. Viral Hepatitis and Acute Liver Failure: Still a Problem. *Clin Liver Dis.* **2018**; 22(2):289–300.
62. Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *J Hepatol.* **2017**; 66(5):1082–1095.
63. Kamar N, Bendall RP, Peron JM, et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis.* **2011**; 17(2):173–179.
64. Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* **2016**; 36(4):467–472.
65. Velay A, Kack-Kack W, Abravanel F, et al. Parsonage-Turner syndrome due to autochthonous acute genotype 3f hepatitis E virus infection in a nonimmunocompromised 55-year-old patient. *J Neurovirol.* **2017**; 23(4):615–620.

66. Pérez-Gracia MT, Suay-García B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Rev Med Virol.* **2017**; 27(3):e1929.
67. Gouilly J, Chen Q, Siewiera J, et al. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat Commun.* **2018**; 9(1):4748:1-13.
68. Yang C, Yu W, Bi Y, et al. Increased oestradiol in hepatitis E virus-infected pregnant women promotes viral replication. *J Viral Hepat.* **2018**; 25(6):742–751.
69. Zhou X, Wang Y, Metselaar HJ, Janssen HLA, Peppelenbosch MP, Pan Q. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *J Hepatol.* **2014**; 61(4):746–754.
70. Ankcorn MJ, Tedder RS. Hepatitis E: the current state of play. *Transfus Med Oxf Engl.* **2017**; 27(2):84–95.
71. Haute Autorité de Santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic et au suivi de l'hépatite E. 2017.
72. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* **2018**; 68(6):1256–1271.
73. Izopet J, Lhomme S, Abravanel F, Roque A-M, Kamar N. [Hepatitis E virus]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. **2015**; 44(3):328–332.
74. Van der Poel WHM, Dalton HR, Johne R, et al. Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection. *Transbound Emerg Dis.* **2018**; 65 Suppl 1:22–29.
75. Wang Y, Zhou X, Debing Y, et al. Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology.* **2014**; 146(7):1775–1783.
76. Krzowska-Firyck JM, Lucas C, Lucas G, Tomaszewicz K. Hepatitis E - A new era in understanding. *Ann Agric Environ Med AAEM.* **2018**; 25(2):250–254.
77. Todt D, Moeller N, Praditya D, et al. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* **2018**; 157:151–158.
78. Kaushik N, Anang S, Ganti KP, Surjit M. Zinc: A Potential Antiviral Against Hepatitis E Virus Infection? *DNA Cell Biol.* **2018**; 37(7):593–599.
79. WHO | Hepatitis E vaccine [Internet]. WHO. [cited 2018 Jul 30]. Available from: <http://www.who.int/hepatitis/publications/hepE-positionpaper/en/>
80. Li SW, Zhang J, Li YM, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine.* **2005**; 23(22):2893–2901.
81. NF EN ISO 15216. Association Française de Normalisation; 2017.
82. Schwartzbrod L, Prost A, Gerba CP. *Virologie des milieux hydriques.* Paris: Tec & Doc/Lavoisier; 1991.

83. Haramoto E, Kitajima M, Hata A, et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* **2018**; 135:168–186.
84. Xia J, Zeng H, Liu L, et al. Swine and rabbits are the main reservoirs of hepatitis E virus in China: detection of HEV RNA in feces of farmed and wild animals. *Arch Virol.* **2015**; 160(11):2791–2798.
85. Ramírez C, Gregori J, Buti M, et al. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res.* **2013**; 98(2):273–283.
86. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* **2012**; 13:341:1-13.
87. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol.* **2012**; 86(18):10006–10014.
88. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, et al. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol.* **2009**; 47(6):1906–1910.
89. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, et al. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011**; 108(6):2438–2443.
90. Nguyen HT, Torian U, Faulk K, et al. A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J Gen Virol.* **2012**; 93(Pt 3):526–530.
91. Owada T, Kaneko M, Matsumoto C, et al. Establishment of culture systems for Genotypes 3 and 4 hepatitis E virus (HEV) obtained from human blood and application of HEV inactivation using a pathogen reduction technology system. *Transfusion (Paris).* **2014**; 54(11):2820–2827.
92. Reynolds KA, Gerba CP, Abbaszadegan M, Pepper LL. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can J Microbiol.* **2001**; 47(2):153–157.
93. Schielke A, Filter M, Appel B, Johne R. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J.* **2011**; 8:487:1-9.
94. Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, et al. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* **2010**; 44(15):4325–4339.
95. Leifels M, Jurzik L, Wilhelm M, Hamza IA. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *Int J Hyg Environ Health.* **2015**; 218(8):686–693.
96. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol.* **2010**; 76(13):4318–4326.
97. Fritsch L, Schneider V. Variabilité génétique et virus. *Rev Fr Lab.* **1996**; (283):41–48.

98. La génétique des virus [Internet]. [cited 2019 Jan 29]. Available from: <http://www.microbiologybook.org/French-virology/virol-french5.htm>
99. Arnold ML, Kunte K. Adaptive Genetic Exchange: A Tangled History of Admixture and Evolutionary Innovation. *Trends Ecol Evol.* **2017**; 32(8):601–611.
100. Lokossou AG, Toudic C, Barbeau B. Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses.* **2014**; 6(11):4609–4627.
101. Koonin EV, Dolja VV. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr Opin Virol.* **2013**; 3(5):546–557.
102. LA MULTIPLICATION VIRALE [Internet]. [cited 2019 Feb 22]. Available from: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/multivirale.html>
103. Bursaux E. Dynamique du VIH-1 in vivo. *médecine/sciences.* **1996**; 12(6–7):820-821.
104. Soriano V, Perelson AS, Zoulim F. Why are there different dynamics in the selection of drug resistance in HIV and hepatitis B and C viruses? *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 62(1):1–4.
105. Quasi-espèce virale [Internet]. Wikipédia. 2013 [cited 2019 Feb 18]. Available from: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Quasi-esp%C3%A8ce_virale&oldid=90377187
106. Luring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* **2010**; 6(7):e1001005.
107. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature.* **2006**; 439(7074):344–348.
108. Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E. Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries. *Water Res.* **2018**; 151:144–157.
109. Chevaliez S. Hépatite C Virus et marqueurs.pdf [Internet]. 07:25:17 UTC [cited 2019 Feb 23]. Available from: <https://fr.slideshare.net/odeckmyn/hpatite-c-virus-et-marqueurspdf>
110. Wilke CO. Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol Biol.* **2005**; 5:44:1-8.
111. Aggarwal R, McCaustland KA, Dilawari JB, Sinha SD, Robertson BH. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Res.* **1999**; 59(1):35–48.
112. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol.* **2013**; 87(8):4161–4169.
113. Purdy MA, Khudyakov YE. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* **2011**; 161(1):31–39.
114. Purdy MA, Khudyakov YE. Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PLoS One.* **2010**; 5(12):e14376.

115. Chen X, Zhang Q, He C, et al. Recombination and natural selection in hepatitis E virus genotypes. *J Med Virol.* **2012**; 84(9):1396–1407.
116. Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, et al. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol.* **2005**; 76(3):341–349.
117. Brayne AB, Dearlove BL, Lester JS, Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. Genotype-Specific Evolution of Hepatitis E Virus. *J Virol.* **2017**; 91(9): e02241-16.
118. Parvez MK. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. *Virus Res.* **2013**; 178(2):553–556.
119. van Tong H, Hoan NX, Wang B, Wedemeyer H, Bock C-T, Velavan TP. Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance. *EBioMedicine.* **2016**; 11:31–42.
120. Pudupakam RS, Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Pierson FW, Meng XJ. Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J Virol.* **2009**; 83(1):384–395.
121. Debing Y, Ramière C, Dallmeier K, et al. Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. *J Hepatol.* **2016**; 65(3):499–508.
122. Cao D, Ni Y-Y, Meng X-J. Substitution of amino acid residue V1213 in the helicase domain of the genotype 3 hepatitis E virus reduces virus replication. *Virol J.* **2018**; 15(1):32:1-8.
123. Cao D, Huang Y-W, Meng X-J. The nucleotides on the stem-loop RNA structure in the junction region of the hepatitis E virus genome are critical for virus replication. *J Virol.* **2010**; 84(24):13040–13044.
124. Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J Virol.* **2007**; 81(6):3018–3026.
125. Tige-boucle [Internet]. Wikipédia. 2018 [cited 2019 Feb 23]. Available from: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Tige-boucle&oldid=152741159>
126. Huang YW, Haqshenas G, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Emerson SU, Meng XJ. Capped RNA transcripts of full-length cDNA clones of swine hepatitis E virus are replication competent when transfected into Huh7 cells and infectious when intrahepatically inoculated into pigs. *J Virol.* **2005**; 79(3):1552–1558.
127. Córdoba L, Huang Y-W, Opriessnig T, et al. Three amino acid mutations (F51L, T59A, and S390L) in the capsid protein of the hepatitis E virus collectively contribute to virus attenuation. *J Virol.* **2011**; 85(11):5338–5349.
128. Graff J, Zhou Y-H, Torian U, et al. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol.* **2008**; 82(3):1185–1194.

129. Xu M, Behloul N, Wen J, Zhang J, Meng J. Role of asparagine at position 562 in dimerization and immunogenicity of the hepatitis E virus capsid protein. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* **2016**; 37:99–107.
130. Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem.* **2002**; 277(25):22759–22767.
131. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai null, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol.* **2011**; 92(Pt 2):269–278.
132. Devhare P, Sharma K, Mhaindarkar V, Arankalle V, Lole K. Analysis of helicase domain mutations in the hepatitis E virus derived from patients with fulminant hepatic failure: effects on enzymatic activities and virus replication. *Virus Res.* **2014**; 184:103–110.
133. Takahashi K, Okamoto H, Abe N, et al. Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis.* **2009**; 15(5):704–709.
134. Mishra N, Walimbe AM, Arankalle VA. Hepatitis E virus from India exhibits significant amino acid mutations in fulminant hepatic failure patients. *Virus Genes.* **2013**; 46(1):47–53.
135. Borkakoti J, Ahmed G, Kar P. Report of a novel C1483W mutation in the hepatitis E virus polymerase in patients with acute liver failure. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* **2016**; 44:51–54.
136. Borkakoti J, Ahmed G, Hussain SA, Rai A, Kar P. Novel molecular alterations in the ORF 2 capsid gene of hepatitis E virus in patients with acute liver failure in North India. *Arch Virol.* **2014**; 159(12):3391–3394.
137. Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J Med Virol.* **2006**; 78(4):476–484.
138. Inoue J, Takahashi M, Mizuo H, et al. Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity. *Tohoku J Exp Med.* **2009**; 218(4):279–284.
139. Ray R, Jameel S, Manivel V, Ray R. Indian hepatitis E virus shows a major deletion in the small open reading frame. *Virology.* **1992**; 189(1):359–362.
140. Debing Y, Gisa A, Dallmeier K, et al. A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology.* **2014**; 147(5):1008-1011.e7; quiz e15-16.
141. Lhomme S, Kamar N, Nicot F, et al. Mutation in the Hepatitis E Virus Polymerase and Outcome of Ribavirin Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **2015**; 60(3):1608–1614.
142. Todt D, Gisa A, Radonic A, et al. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut.* **2016**; 65(10):1733–1743.
143. van Cuyck H, Fan J, Robertson DL, Roques P. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J Virol.* **2005**; 79(14):9306–9314.

144. Fan J. Open reading frame structure analysis as a novel genotyping tool for hepatitis E virus and the subsequent discovery of an inter-genotype recombinant. *J Gen Virol.* **2009**; 90(Pt 6):1353–1358.
145. Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, et al. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J Gen Virol.* **2002**; 83(Pt 8):1931–1940.
146. Wang H, Zhang W, Ni B, et al. Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virol J.* **2010**; 7:129:1-6.
147. Grandadam M, Tebbal S, Caron M, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol.* **2004**; 85(Pt 11):3189–3194.
148. Kamar N, Izopet J, Cintas P, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* **2010**; 10(5):1321–1324.
149. Lhomme S, Garrouste C, Kamar N, et al. Influence of polyproline region and macro domain genetic heterogeneity on HEV persistence in immunocompromised patients. *J Infect Dis.* **2014**; 209(2):300–303.
150. Salines M, Andraud M, Rose N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res.* **2017**; 48(1):31:1-15.
151. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, et al. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **2011**; 34(5):419–427.
152. Crossan C, Grierson S, Thomson J, et al. Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect.* **2015**; 143(10):2237–2240.
153. Walachowski S, Dorenlor V, Lefevre J, et al. Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect.* **2014**; 142(9):1934–1944.
154. Jinshan null, Jirintai null, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol.* **2010**; 155(8):1217–1226.
155. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, et al. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol.* **2008**; 132(1–2):47–55.
156. Hinjoy S, Nelson KE, Gibbons RV, et al. A cross-sectional study of hepatitis E virus infection in pigs in different-sized farms in northern Thailand. *Foodborne Pathog Dis.* **2013**; 10(8):698–704.
157. Li W, She R, Wei H, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol.* **2009**; 133(1–2):75–83.
158. Rutjes SA, Bouwknegt M, Giessen JW van der, Roda Husman AM de, Reusken CBEM. Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in The Netherlands. *J Food Prot.* **2014**; 77(4):640–642.

159. Jori F, Laval M, Maestrini O, Casabianca F, Charrier F, Pavio N. Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. *Viruses*. **2016**; 8(8):236:1-11.
160. Andraud M, Casas M, Pavio N, Rose N. Early-life hepatitis e infection in pigs: the importance of maternally-derived antibodies. *PLoS One*. **2014**; 9(8):e105527.
161. Salines M, Barnaud E, Andraud M, et al. Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res*. **2015**; 46:55:1-10.
162. Salines M, Demange A, Stéphan G, et al. Persistent viremia and presence of hepatitis E virus RNA in pig muscle meat after experimental co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Int J Food Microbiol*. **2018**; 292:144–149.
163. Bouwknecht M, Rutjes SA, Reusken CBEM, et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res*. **2009**; 5:7:1-12.
164. Andraud M, Dumarest M, Cariolet R, et al. Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet Res*. **2013**; 44:102:1-11.
165. Miura T, Lhomme S, Le Saux J-C, et al. Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island. *Food Environ Virol*. **2016**; 8(3):194–199.
166. Moor D, Liniger M, Baumgartner A, Felleisen R. Screening of Ready-to-Eat Meat Products for Hepatitis E Virus in Switzerland. *Food Environ Virol*. **2018**; 10(3):263–271.
167. Pavio N, Merbah T, Thébault A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis*. **2014**; 20(11):1925–1927.
168. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*. **2003**; 84(Pt 9):2351–2357.
169. Mykityczuk O, Harlow J, Bidawid S, Corneau N, Nasheri N. Prevalence and Molecular Characterization of the Hepatitis E Virus in Retail Pork Products Marketed in Canada. *Food Environ Virol*. **2017**; 9(2):208–218.
170. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. **2008**; 8(11):698–709.
171. Teo CG. Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr Opin Infect Dis*. **2006**; 19(5):460–466.
172. Toyoda K, Furusyo N, Takeoka H, Murata M, Sawayama Y, Hayashi J. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in the general population of Okinawa, Kyushu, Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. **2008**; 23(12):1885–1890.
173. Huang X, Huang Y, Wagner AL, Chen X, Lu Y. Hepatitis E virus infection in swine workers: A meta-analysis. *Zoonoses Public Health*. **2019**; 66(1):155–163.
174. Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*. **2015**; 15:440:1-8.

175. Lhomme S, Top S, Bertagnoli S, Dubois M, Guerin J-L, Izopet J. Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus, Southwestern France. *Emerg Infect Dis.* **2015**; 21(7):1224–1226.
176. Feurer C, Le Roux A, Rossel R, et al. High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* **2018**; 264:25–30.
177. Boxman ILA, Jansen CCC, Hägele G, et al. Porcine blood used as ingredient in meat productions may serve as a vehicle for hepatitis E virus transmission. *Int J Food Microbiol.* **2017**; 257:225–231.
178. Amany G, Kizito S, Nabukenya I, et al. Risk factors, person, place and time characteristics associated with Hepatitis E Virus outbreak in Napak District, Uganda. *BMC Infect Dis.* **2017**; 17(1):451:1-8.
179. Haque F, Banu SS, Ara K, et al. An outbreak of hepatitis E in an urban area of Bangladesh. *J Viral Hepat.* **2015**; 22(11):948–956.
180. Maila HT, Bowyer SM, Swanepoel R. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J Gen Virol.* **2004**; 85(Pt 1):89–95.
181. Singh MP, Majumdar M, Goyal K, Lakshmi PVM, Bhatia D, Ratho RK. Investigation of suspected viral hepatitis outbreaks in North West India. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2016**; 84(4):309–314.
182. Hakim MS, Wang W, Bramer WM, et al. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* **2017**; 37(1):19–31.
183. Gentry-Shields J, Myers K, Pisanic N, Heaney C, Stewart J. Hepatitis E virus and coliphages in waters proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Sci Total Environ.* **2015**; 505:487–493.
184. Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschuur F, et al. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* **2009**; 15(3):381–387.
185. D’Ugo E, Marcheggiani S, Fioramonti I, et al. Detection of Human Enteric Viruses in Freshwater from European Countries. *Food Environ Virol.* **2016**; 8(3):206–214.
186. Givens CE, Kolpin DW, Borchardt MA, Duris JW, Moorman TB, Spencer SK. Detection of hepatitis E virus and other livestock-related pathogens in Iowa streams. *Sci Total Environ.* **2016**; 566–567:1042–1051.
187. Grodzki M, Schaeffer J, Piquet J-C, et al. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl Environ Microbiol.* **2014**; 80(14):4269–4276.
188. Maunula L, Kaupke A, Vasickova P, et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol.* **2013**; 167(2):177–185.
189. Terio V, Bottaro M, Pavoni E, et al. Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *Int J Food Microbiol.* **2017**; 249:61–65.
190. Brassard J, Gagné M-J, Généreux M, Côté C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol.* **2012**; 78(10):3763–3766.

191. Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol.* **2012**; 4(4):179–191.
192. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis.* **2003**; 9(4):448–454.
193. Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, et al. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health.* **2010**; 8(2):346–354.
194. Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, et al. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. *J Environ Manage.* **2015**; 159:58–67.
195. Kokkinos PA, Ziros PG, Mpalasopoulou A, Galanis A, Vantarakis A. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virol J.* **2011**; 8:195:1-7.
196. La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Vennarucci VS, Muscillo M. Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* **2010**; 76(17):5870–5873.
197. Iaconelli M, Purpari G, Della Libera S, et al. Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food Environ Virol.* **2015**; 7(4):316–324.
198. Myrmel M, Lange H, Rimstad E. A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. *Food Environ Virol.* **2015**; 7(3):213–223.
199. Matos A, Mesquita J, Gonçalves D, Abreu Silva J, Luxo C, Nascimento M. Hepatitis E virus subgenotypes 3i and 3f in wastewater of treatment plants of Portugal. *J Clin Virol.* **2016**; 82:S71.
200. Smith DB, Paddy JO, Simmonds P. The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK. *J Med Virol.* **2016**; 88(5):915–918.
201. Wang H, Sikora P, Rutgersson C, et al. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int J Hyg Environ Health.* **2018**; 221(3):479–488.
202. Masclaux FG, Hotz P, Friedli D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* **2013**; 47(14):5101–5109.
203. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, et al. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: environmental and serological survey. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* **2014**; 61(3):334–339.
204. Baez PA, Lopez MC, Duque-Jaramillo A, Pelaez D, Molina F, Navas M-C. First evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PloS One.* **2017**; 12(5):e0177525.
205. Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, et al. Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* **2011**; 17(8):1182–1185.

206. El-Senousy WM, Abou-Elela SI. Assessment and Evaluation of an Integrated Hybrid Anaerobic-Aerobic Sewage Treatment System for the Removal of Enteric Viruses. *Food Environ Virol.* **2017**; 9(3):287–303.
207. Ram D, Manor Y, Gozlan Y, et al. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Sewage and Genotype 1 in Acute Hepatitis Cases, Israel. *Am J Trop Med Hyg.* **2016**; 95(1):216–220.
208. Hmaied F, Keskes S, Jebri S, et al. Removal of Rotavirus and Bacteriophages by Membrane Bioreactor Technology from Sewage. *Curr Microbiol.* **2015**; 71(5):540–545.
209. Li H, Li W, She R, et al. Hepatitis E Virus Genotype 4 Sequences Detected in Sewage from Treatment Plants of China. *Food Environ Virol.* **2017**; 9(2):230–233.
210. Jothikumar N, Aparna K, Kamatchiammal S, Paulmurugan R, Saravanadevi S, Khanna P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* **1993**; 59(8):2558–2562.
211. Vaidya SR, Chitambar SD, Arankalle VA. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol.* **2002**; 37(1):131–136.
212. Ippagunta SK, Naik S, Sharma B, Aggarwal R. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol.* **2007**; 79(12):1827–1831.
213. Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, et al. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch Virol.* **2012**; 157(12):2363–2368.
214. Kobayashi N, Oshiki M, Ito T, et al. Removal of human pathogenic viruses in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor treating municipal wastewater and health risks associated with utilization of the effluent for agricultural irrigation. *Water Res.* **2017**; 110:389–398.
215. Kaas L, Ogorzaly L, Lecellier G, Berteaux-Lecellier V, Cauchie H-M, Langlet J. Detection of Human Enteric Viruses in French Polynesian Wastewaters, Environmental Waters and Giant Clams. *Food Environ Virol.* **2019**; 11(1):52–64.
216. Iaconelli M, Muscillo M, Della Libera S, et al. One-year Surveillance of Human Enteric Viruses in Raw and Treated Wastewaters, Downstream River Waters, and Drinking Waters. *Food Environ Virol.* **2017**; 9(1):79–88.
217. Mansuy JM, Saune K, Rech H, et al. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* **2015**; 20(19):27–34.
218. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, et al. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatol Baltim Md.* **2016**; 63(4):1145–1154.
219. Said B, Ijaz S, Kafatos G, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis.* **2009**; 15(11):1738–1744.
220. Hunter JG, Madden RG, Stone AM, et al. Coastal clustering of HEV; Cornwall, UK. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2016**; 28(3):323–327.

221. Chen YJ, Cao NX, Xie RH, et al. Epidemiological investigation of a tap water-mediated hepatitis E virus genotype 4 outbreak in Zhejiang Province, China. *Epidemiol Infect.* **2016**; 144(16):3387–3399.
222. Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* **2012**; 18(12):2085–2087.
223. O’Hara Z, Crossan C, Craft J, Scobie L. First Report of the Presence of Hepatitis E Virus in Scottish-Harvested Shellfish Purchased at Retail Level. *Food Environ Virol.* **2018**; 10(2):217–221.
224. Diez-Valcarce M, Kokkinos P, Söderberg K, et al. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ Virol.* **2012**; 4(2):73–80.
225. Mesquita JR, Oliveira D, Rivadulla E, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol.* **2016**; 58:13–15.
226. Donia D, Dell’Amico MC, Petrinca AR, et al. Presence of hepatitis E RNA in mussels used as bio-monitors of viral marine pollution. *J Virol Methods.* **2012**; 186(1–2):198–202.
227. La Rosa G, Proroga YTR, De Medici D, et al. First Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish and in Seawater from Production Areas in Southern Italy. *Food Environ Virol.* **2018**; 10(1):127–131.
228. La Rosa G, Fratini M, Spuri Vennarucci V, Guercio A, Purpari G, Muscillo M. GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiol.* **2012**; 35(1):27–34.
229. Fusco G, Di Bartolo I, Cioffi B, et al. Prevalence of Foodborne Viruses in Mussels in Southern Italy. *Food Environ Virol.* **2017**; 9(2):187–194.
230. Gao S, Li D, Zha E, Zhou T, Wang S, Yue X. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int J Environ Res Public Health.* **2015**; 12(2):2026–2036.
231. Li T-C, Miyamura T, Takeda N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* **2007**; 76(1):170–172.
232. Song Y-J, Jeong H-J, Kim Y-J, et al. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol.* **2010**; 82(4):583–591.
233. Namsai A, Louisirootchakul S, Wongchinda N, et al. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. *Lett Appl Microbiol.* **2011**; 53(6):608–613.
234. Yunoki M, Yamamoto S, Tanaka H, et al. Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters. *Vox Sang.* **2008**; 95(2):94–100.
235. Girones R, Carratalà A, Calgua B, Calvo M, Rodriguez-Manzano J, Emerson S. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *J Water Health.* **2014**; 12(3):436–442.

236. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol.* **2008**; 123(1–2):32–37.
237. Barnaud E, Rogée S, Garry P, Rose N, Pavo N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol.* **2012**; 78(15):5153–5159.
238. Imagawa T, Sugiyama R, Shiota T, et al. Evaluation of Heating Conditions for Inactivation of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4. *J Food Prot.* **2018**; 81(6):947–952.
239. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis.* **2005**; 192(5):930–933.
240. Bertrand I, Schijven JF, Sánchez G, et al. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl Microbiol.* **2012**; 112(6):1059–1074.
241. Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J. Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Appl Environ Microbiol.* **2016**; 82(14):4225–4231.
242. Song H, Li J, Shi S, Yan L, Zhuang H, Li K. Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture. *Virology.* **2010**; 7:40:1-12.
243. Guerrero-Latorre L, Gonzales-Gustavson E, Hundesa A, Sommer R, Rosina G. UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *Int J Hyg Environ Health.* **2016**; 219(4–5):405–411.
244. Hijnen W a. M, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* **2006**; 40(1):3–22.
245. Simonet J, Gantzer C. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl Environ Microbiol.* **2006**; 72(12):7671–7677.
246. Gravemann U, Handke W, Lambrecht B, Schmidt J-P, Müller TH, Seltsam A. Ultraviolet C light efficiently inactivates nonenveloped hepatitis A virus and feline calicivirus in platelet concentrates. *Transfusion (Paris).* **2018**; 58(11):2669–2674.
247. Cook N, Poel WHM van der. Survival and Elimination of Hepatitis E Virus: A Review. *Food Environ Virol.* **2015**; 7(3):189–194.
248. Sobsey MD, Fuji T, Shields PA. Inactivation of Hepatitis a Virus and Model Viruses in Water by Free Chlorine and Monochloramine. *Water Sci Technol.* **1988**; 20(11–12):385–391.
249. Facteurs qui ont une influence sur la désinfection de l'eau [Internet]. [cited 2019 Jan 24]. Available from: <https://www.lennotech.fr/desinfection/facteurs-desinfection-eau.htm>
250. Ali SI, Ali SS, Fesselet JF. Study Report: Evidence Based FRC Targets for Centralized Chlorination in Emergencies. **2016** [cited 2019 Jan 24]; . Available from: <http://fieldresearch.msf.org/msf/handle/10144/618836>
251. Fiche technique Intercept [Internet]. [cited 2019 Jan 26]. Available from: https://interceptbloodsystem.com/sites/default/files/resources/prd-tds_00121-fr_v7.0_secured.pdf

252. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* **2011**; 158(1–2):116–123.
253. Genus: Piscihepevirus - Hepeviridae - Positive-sense RNA Viruses [Internet]. *Int. Comm. Taxon. Viruses ICTV*. [cited 2019 Jun 10]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/hepeviridae/727/genus-piscihepevirus
254. Kozlowski LP. Proteome- *pl* : proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* **2017**; 45(D1):D1112–D1116.
255. Squidonium. English: a Qiagen mini spin column. Silica on a minicolumn with water and with DNA sample in chaotropic buffer. [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 1]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=23065458>
256. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy J-M, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol.* **2012**; 50(3):897–902.
257. Khalvati Fahlyani B, Behzad-Behbahani A, Taghavi SA, et al. Development of an In-House TaqMan Real Time RT-PCR Assay to Quantify Hepatitis C Virus RNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepat Mon.* **2015**; 15(8):e28895.
258. Burt SA, Veltman J, Hakze-van der Honing R, Schmitt H, Poel WHM van der. Hepatitis E Virus in Farmed Rabbits, Wild Rabbits and Petting Farm Rabbits in the Netherlands. *Food Environ Virol.* **2016**; 8(3):227–229.
259. Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods.* **2006**; 137(2):325–333.
260. Nicot F, Jeanne N, Roulet A, et al. Diversity of hepatitis E virus genotype 3. *Rev Med Virol.* **2018**; 28(5):e1987.
261. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.* **1986**; 25(19):5425–5432.
262. Deléage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C. ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med.* **2001**; 31(4):259–267.
263. Bourgeault A, Gourlay-Francé C, Vincent-Hubert F, et al. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environ Toxicol.* **2010**; 25(5):468–478.
264. Cadieu Y. La théorie des quasi-espèces : concepts, application à la dynamique des populations de virus à ARN, implications biologiques et limites. Université de Toulouse; 2016.
265. Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res.* **2011**; 161(1):65–77.
266. Fenaux H, Chassaing M, Berger S, et al. Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* **2018**; 103:63–70.

267. Hata A, Hanamoto S, Shirasaka Y, Yamashita N, Tanaka H. Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters. *Appl Environ Microbiol.* **2016**; 82(14):4244–4252.
268. Grabow WOK, Neubrech TE, Holtzhausen CS, Jofre J. Bacteroides fragilis and Escherichia coli bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Sci Technol.* **1995**; 31(5):223–230.
269. Schaper M, Jofre J, Uys M, Grabow WOK. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J Appl Microbiol.* **2002**; 92(4):657–667.
270. Lucena F, Duran AE, Morón A, et al. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J Appl Microbiol.* **2004**; 97(5):1069–1076.
271. Geng Y, Zhao C, Huang W, et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol.* **2016**; 64(1):37–43.
272. Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, et al. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PloS One.* **2017**; 12(1):e0170199.
273. Gonzales-Gustavson E, Cárdenas-Youngs Y, Calvo M, et al. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. *J Microbiol Methods.* **2017**; 134:46–53.
274. Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, et al. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods.* **2013**; 187(2):215–221.
275. Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, et al. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res.* **2013**; 47(8):2797–2810.
276. Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Martínez-Puchol S, et al. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci Total Environ.* **2018**; 618:870–880.
277. Pérez-Méndez A, Chandler JC, Bisha B, Goodridge LD. Concentration of enteric viruses from tap water using an anion exchange resin-based method. *J Virol Methods.* **2014**; 206:95–98.
278. Olalemi A, Baker-Austin C, Ebdon J, Taylor H. Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*. *Int J Hyg Environ Health.* **2016**; 219(7 Pt A):592–598.
279. Hartard C, Banas S, Loutreul J, et al. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. *Appl Environ Microbiol.* **2016**; 82(18):5709–5719.
280. Stumpf P, Failing K, Papp T, Nazir J, Böhm R, Marschang RE. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Avian Dis.* **2010**; 54(4):1183–1190.

281. Mezzanotte V, Marazzi F, Bissa M, et al. Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci Total Environ.* **2016**; 539:395–400.
282. Abranavel F, Lhomme S, El Costa H, et al. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerg Infect Dis.* **2017**; 23(7):1191–1193.
283. Kaiser M, Delaune D, Chazouillères O, Blümel J, Roque-Afonso A-M, Baylis SA. A World Health Organization Human Hepatitis E Virus Reference Strain Related to Similar Strains Isolated from Rabbits. *Genome Announc.* **2018**; 6(16): e00292-18.
284. Sahli R, Fraga M, Semela D, Moradpour D, Gouttenoire J. Rabbit HEV in immunosuppressed patients with hepatitis E acquired in Switzerland. *J Hepatol.* **2019**; 70(5):1023–1025.
285. Ahn H-S, Park B-J, Han S-H, et al. Prevalence and genetic features of rabbit hepatitis E virus in Korea. *J Med Virol.* **2017**; 89(11):1995–2002.
286. He S, Miao J, Zheng Z, et al. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J Gen Virol.* **2008**; 89(Pt 1):245–249.

Résumé : Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'hépatites chez l'Homme, le plus souvent aiguës, avec des formes chroniques décrites chez des sujets immunodéprimés. Parmi les quatre génotypes majeurs, les génotypes 1 et 2 circulent dans les pays à faibles ressources où ils infectent l'Homme par transmission hydrique. Les génotypes 3 et 4 circulent plutôt dans les pays industrialisés, où ils peuvent infecter l'Homme et des animaux (cochons, sangliers, cerfs...), se transmettent à l'Homme par l'ingestion de viande peu cuite d'un animal infecté. Cependant les voies de transmission du VHE dans les pays industrialisés ne sont pas encore complètement connues et une voie de contamination hydrique est suspectée. L'objectif de ce travail était d'explorer la circulation du VHE dans le nord-est de la France (exemple de pays industrialisé). Nous avons étudié des prélèvements humains, de sangliers, de cochons de ferme, ainsi que des effluents d'un abattoir porcin, des eaux d'entrée d'une station d'épuration (STEP) et des moules d'eau douce. Le VHE de génotype 3 a été retrouvé dans des prélèvements humains, de sangliers, d'effluents d'abattoir et d'entrée de STEP. Plusieurs substitutions d'acides aminés ont été mises en évidence. Certaines sont de possibles signatures d'origine du prélèvement. Elles peuvent entraîner des modifications d'antigénicité et d'hydrophobie, avec de possibles conséquences sur la biologie et la transmission du virus. Les prélèvements de STEP comportaient un mélange de variants viraux d'origines diverses, en faveur d'un rôle de l'eau dans la circulation du VHE. Des tests fonctionnels sont prévus afin de mesurer l'impact des substitutions d'acides aminés.

Mots clés : virus de l'hépatite E (VHE), environnement, patients, variabilité, transmission virale, biologie moléculaire.

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) causes hepatitis in humans, mainly self-limiting hepatitis, and also chronic forms observed in immunocompromised patients. Among the four major genotypes, genotypes 1 and 2 circulate in developing countries where they only infect humans by a waterborne transmission. Genotypes 3 and 4 mainly circulate in industrialised countries where they infect humans and animals (pigs, wild boars, deer...), are transmitted to humans through consumption of undercooked meat from infected animals. However, HEV transmission paths are still unclear in industrialised countries and a waterborne transmission is suspected. The aim of this work was to investigate HEV circulation in North-Eastern France (as a model of an industrialised country). We have studied human, wild boar, farm pig samples, effluent water from a pig slaughterhouse, incoming water of a wastewater treatment plant (WWTP) and little pure water mussels from rivers. Genotype 3 HEV has been recovered from human, wild boars, slaughterhouse and WWTP samples. Several amino acid substitutions have been highlighted. Some are possible signatures of sample origin. Some can lead to modifications in predicted antigenicity and hydrophobicity, with possible consequences on the virus' behaviour and circulation. Finally, the WWTP samples showed a mixture of variants from different origins, in favour of a role of water in HEV circulation. Functional tests are in progress to measure the impact of the substitutions.

Key words: hepatitis E virus (HEV), environment, patients, variability, viral transmission, molecular biology.