



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Sébastien LHOMME

le jeudi 12 décembre 2013

Titre :

Pathogénèse et adaptation du virus de l'hépatite E chez l'immunodéprimé

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1043 Equipe 8 Davrinche/Izopet

Directeur(s) de Thèse :

Professeur Jacques IZOPET, PU-PH, INSERM U1043, Toulouse

Jury :

Rapporteurs:

Dr Nicole PAVIO, Directeur de Recherche, ANSES, Maisons-Alfort
Dr Francis DELPEYROUX, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

Examineurs:

Dr Soizick LE GUYADER, Directeur de Recherche, IFREMER, Nantes
Dr Florence ABRAVANEL, MCU-PH, INSERM U1043, Toulouse

Remerciements

AUX MEMBRES DU JURY

**A Madame le Docteur Nicole PAVIO,
Directeur de Recherche, ANSES, Maisons-Alfort**

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteur, et de me faire bénéficier de votre expertise dans le domaine du virus de l'hépatite E.

**A Monsieur le Docteur Francis DELPEYROUX,
Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris**

Je vous remercie d'avoir accepté la charge d'être rapporteur de mon travail de thèse et de me faire partager vos connaissances dans le domaine des virus à transmission entérique.

**A Madame le Docteur Soizick LE GUYADER,
Directeur de Recherche, IFREMER, Nantes**

Vous avez accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur. Soyez assurée de mes sincères remerciements.

**A Madame le Docteur Florence ABRAVANEL,
MCU-PH, INSERM U1043, Toulouse**

Florence, je te remercie pour ta disponibilité, ton aide et tes conseils tout au long de ce travail. La perspective de continuer à travailler avec toi est un grand plaisir.

**A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET,
PU-PH, INSERM U1043, Toulouse**

Jacques, vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre laboratoire et de m'avoir confié ce travail passionnant sur le virus de l'hépatite E. Votre enthousiasme, votre rigueur et votre perfectionnisme sont des modèles à suivre. La perspective de pouvoir continuer à travailler dans votre équipe est pour moi un grand honneur.

AU PERSONNEL DU PTI

A *Florence A, Florence N, Karine, Sabine, Stéphanie, Catherine, Jean-Michel, Christophe et Marcel*, pour votre aide dans l'apprentissage de la vie hospitalière !

A *Martine et Michelle* qui m'ont guidé tout au long de cette thèse et qui m'ont appris tant de choses ! *Martine*, tu m'as aidé à prendre mes repères au labo. J'ai pu apprécier ta gentillesse, ton dynamisme et ta rigueur. Merci pour ton aide et tes précieux conseils. C'est un réel plaisir de travailler avec toi. *Michelle*, merci pour ton aide et toutes nos discussions constructives.

A *Mary, Agnès, Marie Pierre, Stéphanie, Caroline, Marine, Patrick, Romain, Nicolas, ...* et à tous les technicien(ne)s du labo, pour votre gentillesse et votre bonne humeur quotidienne.

Aux M2, thésards et post doctorants dont j'ai croisé la route : *Maud, Adrien, Claire, Gaëlle, Hugo, Wissam, Jérôme, Sokunthea, ...* pour tous les bons moments passés ensemble.

A *Eliane et Laurence*, merci pour votre gentillesse et votre aide, notamment quand il s'agit de rechercher des publiés introuvables !

A MES PROCHEs

A mes parents,

Qui m'ont permis de réaliser ces études. L'occasion m'est donnée ici de vous témoigner toute ma gratitude et mon amour. Merci pour votre soutien tout au long de ces années d'études et la relecture des différents travaux. Promis, c'est la dernière thèse que vous avez eu à relire !

A Emilie,

Merci pour ta compréhension et ton amour.

A tous ces moments inoubliables passés à tes côtés et à cette nouvelle étape qui nous attend début 2014...

A mon frère, Eric et à Magali,

Pour tous les bons moments passés ensemble et à venir.

A ma famille,

Merci d'être présente en ce jour particulier.

A mes amis de longue date,

Ticolás, Alice, D, Greg, Manue, F, Xr, Tourist, Sarah, Lola et Max. Pour tous les bons moments passés ensemble à « Jacam » puis à Dijon. En espérant que nos vies respectives ne nous éloignent pas.

A mes amis rencontrés durant ces longues années d'études, de Dijon à Toulouse en passant par Clermont. *Sophie(s), Marie, Hélène, Michal, Louis, Mimine, Max, Florence(s), Rithy, Laura, Sandra, Albertine, David, Céline, Amandine, Florent, Cédric, Gavin, Caro, Laurent, Johan...* sans oublier la team des poneys clermontois : *Anne, Claire, Steeve, Tiphany, Marion, Lucie...* Ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous !

Table des matières

Table des illustrations.....	4
Abréviations.....	5
Introduction.....	7
1^{ère} partie : le virus de l'hépatite E	8
I. Découverte et caractérisation.....	9
II. Caractéristiques virologiques.	10
A. Taxonomie.....	10
B. Caractéristiques générales.....	10
C. Les protéines virales.....	11
1. ORF1.....	11
2. ORF2.....	13
3. ORF3.....	14
D. Variabilité génétique du VHE.....	16
1. Génotypes et sous-génotypes.....	16
2. Les virus recombinants.....	18
3. Quasi-espèce.....	20
E. Etude du cycle de réplication.....	21
1. Culture cellulaire.....	21
2. Le cycle réplicatif.....	23
III. Epidémiologie.....	25
A. Mode de contamination.....	25
1. Transmission féco-orale interhumaine.....	25
2. Transmission zoonotique.....	25
3. Transmission materno-fœtale.....	26
4. Transmission parentérale.....	27
5. Transmission nosocomiale.....	27
B. Répartition géographique et prévalence.....	27
1. Pays en développement.....	27
2. Pays industrialisés.....	28

IV. Physiopathologie.	30
A. Réponse immune au stade aigu de l'hépatite.	31
1. Réponse immunitaire innée.	31
2. Réponse immunitaire adaptative.	32
B. Réponse immune et sévérité de l'infection par le VHE.	33
1. Le cas des hépatites fulminantes.	33
2. Le cas particulier de la femme enceinte.	34
V. Clinique.	35
A. Hépatite aiguë.	35
B. Hépatite chronique.	36
C. Manifestations extra-hépatiques.	37
VI. Diagnostic.	38
VII. Traitement.	40
VIII. Prévention.	40
A. Prévention non spécifique.	40
1. Hygiène collective.	40
2. Hygiène individuelle.	41
B. Vaccin.	41
2ème partie : la quasi-espèce virale.	42
I. Théorie de la quasi-espèce.	43
A. Définition.	43
B. Mécanismes à l'origine de la variabilité génétique.	43
1. Mutations générées lors de la réplication.	44
2. Mutations générées en dehors de la réplication.	45
3. Recombinaisons.	45
C. Limites de la quasi-espèce : seuil d'erreur et erreur catastrophique.	46
D. Sélection des variants de la quasi-espèce.	47
1. L'effet goulot d'étranglement.	47
2. Sélection lors de l'adaptation à un nouvel hôte.	47
II. Principales caractéristiques de la quasi-espèce virale.	49
A. Survie de la quasi-espèce.	49
B. Mémoire virale de la quasi-espèce.	50
C. Notion de coopération.	50

D.	Complémentation et défection : la quasi-espèce comme unité de sélection.	51
III.	Conséquences physiopathologiques de la distribution en quasi-espèce.	52
A.	Compartimentation.	52
B.	Mutants d'échappement.	52
C.	Quasi-espèce et persistance virale.	53
D.	Quasi-espèce et progression de la maladie.	53
E.	Induction de l'erreur catastrophique comme stratégie antivirale.	54
IV.	Etude de la quasi-espèce.	55
A.	Méthodes d'analyse.	55
1.	Méthodes ne reposant pas sur le séquençage.	55
2.	Séquençage par la méthode de Sanger après clonage ou dilutions limites.	55
3.	Séquençage haut-débit.	56
B.	Analyses bioinformatiques des séquences de la quasi-espèce.	56
1.	Complexité.	56
2.	Diversité.	56
3.	Mutations synonymes, non synonymes et étude de la pression de sélection.	57
	Objectifs du travail	58
	Résultats.....	60
	Partie I : étude de la quasi-espèce et de la sécrétion de cytokines/chimiokines lors de la phase aiguë et impact sur la fibrose hépatique.	61
	Publication n°1: J. Virol., 2012	
	Publication n°2: J. Infect. Dis, 2013	
	Partie II : étude longitudinale de l'évolution du génome du VHE chez un patient chroniquement infecté.	80
	Publication n°3: soumis	
	Discussion	82
	Synthèse et perspectives	95
	Bibliographie	98
	Annexes	132

Table des illustrations

Figure 1 : Organisation du génome du VHE pour les génotypes 1 à 4.....	10
Figure 2 : Structure de la protéine de capsid codée par ORF2, constituée de 3 domaines : S, M et P.....	13
Figure 3 : Photographie de microscopie électronique des particules virales recombinantes ayant une triangulation $T=3$	14
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine codée par ORF3.	15
Figure 5 : Arbre phylogénétique basé sur les génomes complets disponibles.	17
Figure 6 : Schéma du cycle de réplication du virus de l'hépatite E.....	24
Figure 7 : Répartition géographique des différents génotypes du VHE.	29
Figure 8 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution des alanine aminotransférases (ALAT) lors de l'infection par le VHE.....	38
Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'une quasi-espèce virale à partir d'un génome matrice.	44
Figure 10 : Illustration du phénomène de changement de matrice.	46
Figure 11 : Représentation schématique de la sélection d'une mutation conférant un avantage répliatif.	48
Figure 12 : Représentation schématique d'une quasi-espèce en fonction de son hétérogénéité et de sa capacité adaptative.	49
Figure 13 : Illustration du phénomène de coopération dans la quasi-espèce.....	51

Abréviations

aa	Acide(s) aminé(s).
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ADP	Adénosine diphosphate.
ALAT	Alanine aminotransférase.
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G.
ARN	Acide ribonucléique.
ARN-	Acide ribonucléique de polarité négative.
ARN+	Acide ribonucléique de polarité positive.
ASAT	Aspartate aminotransférase.
CD	Cluster of differentiation.
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (également connu sous le nom de CD152).
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay.
ERK	Extracellular signal-regulated kinases.
FoxP3	Forkhead box P3.
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor.
HSP	Heat shock protein.
HVR-1	Région hypervariable 1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2.
IFN- α	Interféron α .
IFN- γ	Interféron γ .
Ig	Immunoglobuline.
IL	Interleukine.
IL-1Ra	Antagoniste du récepteur à l'interleukine 1.
IP-10	Interferon inducible protein-10.
ITI-H2	Chaîne lourde de l'inter α trypsine inhibiteur 2.
Ka	Nombre de substitutions non synonymes par site de substitution non synonyme.
kb	kilo bases.
Ks	Nombre de substitutions synonymes par site de substitution synonyme.
MAPK	Mitogen-activated protein kinase.
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1.
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α .

MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 β .
MxA	Myxovirus resistance A.
NF- κ B	Nuclear factor- <i>kappa</i> B.
NK	Natural killer.
NKT	Natural killer T.
ORF	Open reading frame.
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells.
PD-1	Programmed cell death protein 1.
PIBF	Progesterone induced blocking factor.
pORF3	Protéine code par ORF3.
PPR	Région riche en proline.
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted.
RdRp	ARN polymérase dépendante de l'ARN.
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction.
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience humaine.
sIL-2R	Récepteur soluble à l'Interleukine 2.
SNC	Système nerveux central.
STAT	Signal transducers and activators of transcription.
TNF- α	Tumor necrosis factor α .
T reg	Lymphocytes T régulateurs.
VHC	Virus de l'hépatite C.
VHE	Virus de l'hépatite E.
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine.
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse.

Introduction

1^{ère} partie : le virus de l'hépatite E

I. Découverte et caractérisation.

Les hépatites sont des entités cliniques connues depuis le 8^{ème} siècle avant Jésus-Christ. Au Moyen Âge, les épidémies étaient fréquentes lors des guerres, des périodes de famine et des tremblements de terre (Schmid, 2001). L'origine infectieuse des épidémies a été suspectée dès la fin du 19^{ème} siècle puis établie dans la 2^{ème} moitié du 20^{ème} siècle. Deux modes distincts de transmission ont été objectivés: entérique et sanguin. Les agents responsables ont été identifiés dans les années 1970 et furent nommés virus de l'hépatite A et virus de l'hépatite B (MacCallum, 1972).

L'analyse rétrospective de sérums de patients a permis de mettre hors de cause ces 2 virus lors d'une épidémie survenue à New Delhi en 1955-1956. Cette épidémie a suivi une période de crue de la rivière Yamuna, en novembre 1955, conduisant à la contamination des réserves d'eau de la ville. Au total, 29000 personnes ont été touchées. Peu de patients présentaient des marqueurs d'hépatite A ou B, suggérant l'existence d'un agent entéro-transmissible non A non B (Vishwanathan, 1957). Lors d'une épidémie en Inde entre novembre 1978 et avril 1979, 275 hépatites cliniques ont été recensées. La plupart des cas étaient des personnes âgées entre 11 et 40 ans partageant le même point d'eau (Khuroo, 1980). Parmi les 31 patients ayant bénéficié d'analyses biologiques, un seul patient présentait des marqueurs d'hépatite A et aucun patient ne possédait de marqueur pour l'hépatite B.

La confirmation de l'existence d'un nouvel agent responsable d'hépatite allait être apportée en 1983 par Balayan et al. (Balayan et al., 1983) qui ingéra des extraits de selles de patients déjà immunisés contre l'hépatite A mais présentant une hépatite. Balayan développa une hépatite clinique au bout de 36 jours. Le recueil de ses selles permit de mettre en évidence par microscopie électronique des particules virales de 27-30 nm de diamètre. Ces particules agglutinaient avec les sérums de patients convalescents ayant eu une hépatite non A non B. A l'inverse, aucune agglutination n'était observée avec les sérums de patients ayant eu une hépatite A ou B.

Une partie de l'ADN complémentaire de ce nouvel agent a été isolé 7 ans plus tard par l'équipe de Reyes (Reyes et al., 1990). Cette découverte a rapidement été suivie par le séquençage du génome complet des souches isolées en Asie et au Mexique (Huang et al., 1992; Tam et al., 1991). C'est à ce moment que le virus a été baptisé virus de l'hépatite E, pour Endémique et Epidémique.

II. Caractéristiques virologiques.

A. Taxonomie.

Initialement classé dans la famille des *Caliciviridae* sur des bases morphologiques en microscopie électronique, le virus de l'hépatite E (VHE) a été individualisé dans la famille des *Hepeviridae*, genre *Hepevirus* dont il est le seul représentant (Meng et al., 2012).

B. Caractéristiques générales.

Le VHE est un virus non enveloppé, à capsid de symétrie icosaédrique, d'environ 27-34 nm de diamètre. Il présente à sa surface des spicules et des indentations visibles en microscopie électronique (Xing et al., 1999). Le génome est un ARN simple brin de polarité positive (ARN+) d'environ 7,2kb. Il est coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Les extrémités 3' et 5' sont non codantes (Reyes et al., 1990; Tam et al., 1991).

Il existe 3 cadres ouverts de lecture (Open Reading Frames, ORF): ORF1, ORF2 et ORF3. ORF1, d'une taille approximative de 5kb, est situé à l'extrémité 5' et code une polyprotéine non structurale d'environ 1693 acides aminés (aa). Les protéines codées par ORF2 et ORF3 sont issues du même ARN messager bicistronique sous-génomique (Graff et al., 2006). ORF2, d'environ 2kb, code la protéine de capsid de 660 aa. Enfin, ORF3 code une protéine de 113 aa pour le génotype 3 ou 114 aa pour les génotypes 1, 2 et 4. Elle intervient dans le bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées (figure 1) (Emerson et al., 2010; Holla et al., 2013).

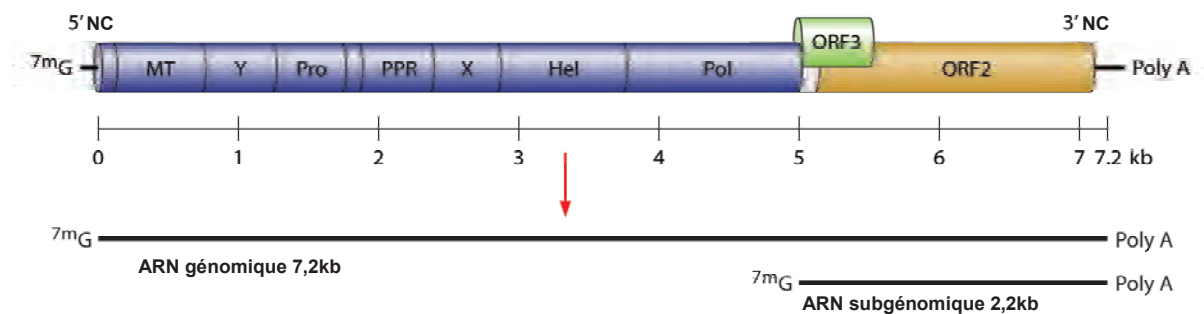


Figure 1 : Organisation du génome du VHE pour les génotypes 1 à 4.

7mG : coiffe ; MT : méthyltransférase ; Y : domaine Y ; Pro : cystéine protéase ; PPR : région riche en proline ; X : domaine X ou macro domaine; Hel : hélicase ; Pol : ARN polymérase dépendante de l'ARN ; polyA : queue polyadénylée ; NC : région non codante.

C. Les protéines virales.

1. ORF1.

ORF1 code une polyprotéine non structurale de 1693 aa comportant plusieurs domaines (Koonin et al., 1992). Les activités enzymatiques correspondant à ces domaines (à partir de l'extrémité N-terminale) sont :

- ✓ méthyltransférase,
- ✓ cystéine protéase similaire à la papaïne,
- ✓ hélicase,
- ✓ ARN polymérase dépendante de l'ARN.

D'autres domaines ont été identifiés par analogie à ceux retrouvés chez les virus à ARN⁺ de plantes ou d'animaux : le domaine Y, le domaine X désormais appelé macro domaine et une région riche en proline (PPR). Il semblerait que la polyprotéine codée par ORF1 ne soit pas clivée à l'issue de sa traduction (Perttila et al., 2013). Cette absence de clivage est inhabituelle pour les virus à ARN⁺ infectant les animaux, mais courante pour les virus infectant les plantes (van der Heijden et al., 2002).

La méthyltransférase catalyse le coiffage en 5' de l'ARN génomique et subgénomique par une 7-méthylguanosine (Koonin et al., 1992). Cette activité catalytique a été confirmée *in vitro* (Magden et al., 2001).

La cystéine protéase similaire à la papaïne est généralement impliquée dans le clivage de la polyprotéine virale (Gorbalenya et al., 1991). La fonction de clivage n'a pas été démontrée. Cette protéine est capable d'interférer avec les défenses antivirales de la cellule infectée (Karpe et al., 2011). En effet, cette protéine possède la capacité de cliver l'interferon stimulated-gene 15 (ISG-15) de la protéine à laquelle elle est conjuguée. L'ISG-15 est une protéine homologue à l'ubiquitine.

L'hélicase est une protéine essentielle pour la réplication virale en participant à la séparation des ARN doubles brins et en déroulant les structures secondaires (Kadare et al., 1997). ORF1 contient les 7 motifs caractéristiques de la superfamille 1 des hélicases, des sites

pour le clivage des nucléotides triphosphates et un domaine de fixation de l'ARN (Koonin et al., 1992). L'activité hélicase a récemment été confirmée *in vitro* (Karpe et al., 2010). L'hélicase semble également posséder une activité 5' triphosphatase. Cette activité pourrait catalyser la 1^{ère} étape du coiffage de l'ARN (Karpe et al., 2010).

L'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) est une enzyme indispensable à la réplication du génome des virus à ARN (Fry et al., 1992). La région d'ORF1 codant les aa 1207-1693 présente une grande homologie de séquence avec la RdRp du virus rubéole et de la rhizomanie de la betterave (Koonin et al., 1992). *In vitro*, la protéine recombinante est capable de fixer l'extrémité 3' de l'ARN du VHE et de l'utiliser comme matrice pour la synthèse du brin complémentaire (Agrawal et al., 2001).

Aucune fonction n'est actuellement prêtée au domaine Y.

Le domaine X, maintenant appelé macro domaine, présente une homologie avec le domaine non histone des histones macroH2A retrouvées dans de nombreux organismes vivants et certains virus comme le virus de la rubéole (Salonen et al., 2005). Ce domaine intervient dans le métabolisme de l'ADP-ribose en hydrolysant l'ADP-ribose-1''-phosphate (Aguiar et al., 2005). Il pourrait donc jouer un rôle dans la réplication virale et/ou la transcription (Egloff et al., 2006). Il s'associe également à la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) (Snijder et al., 2003), suggérant un rôle dans l'apoptose cellulaire.

La région riche en proline (PPR), également appelée région hypervariable, possède une taille et une séquence en acides aminés qui varient en fonction de la souche étudiée. La PPR semble être une région intrinsèquement désordonnée, c'est-à-dire une région dépourvue de structure tridimensionnelle à l'état natif mais caractérisée par sa richesse en aa polaires ou chargés (Purdy et al., 2012). Cette région pourrait jouer un rôle dans la réplication virale, notamment au niveau de l'adaptation du virus. Les études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que la délétion de la PPR n'abolissait pas l'infectivité mais produisait des souches atténuées (Pudupakam et al., 2009; Pudupakam et al., 2011). Les délétions situées à l'extrémité N-terminale et dans la région centrale affectent davantage la réplication virale par rapport à celles situées à l'extrémité C-terminale de cette région. L'analyse des séquences a permis l'identification de motifs Sarcoma Homology 3 (SH3) dans la PPR. Bien que ces motifs SH3 soient facultatifs pour la réplication ou l'infectivité, ils semblent jouer un rôle important dans

l'efficacité de la réplication et l'infectivité comme cela a été montré chez d'autres virus (Bliska, 1996; Macdonald et al., 2005; Saksela et al., 1995). Ainsi dans le cas du VHE, ces motifs favoriseraient des interactions améliorant la réplication et/ou de l'infectivité.

2. ORF2.

ORF2 code la protéine de capsid de 660 aa et participe à l'encapsulation du génome viral (Surjit et al., 2004). L'extrémité N-terminale de la protéine de capsid contient un motif d'adressage au réticulum endoplasmique où la protéine subit des N-glycosylations sur les résidus asparagines en positions 137, 310 et 562 (Jameel et al., 1996; Zafrullah et al., 1999).

La structure cristallographique de la protéine de capsid a récemment été décrite grâce à des particules pseudo-virales tronquées de 111 aa à l'extrémité N-terminale et de 52 aa à l'extrémité C-terminale : le domaine S (pour Shell) (aa 129 à 319) constitue la coque du virus. Le domaine M (pour Middle) (aa 320 à 455) est le domaine intermédiaire. Enfin, le domaine P (pour Protruding) (aa 456 à 606) est le domaine protubérant (Yamashita et al., 2009) (figure 2). Le domaine P présente 2 boucles (aa 550-566 et 583-593) contenant des acides aminés non conservés. Ces aa pourraient être impliqués dans la reconnaissance immunitaire (Guu et al., 2009). Plusieurs études ont montré que les épitopes reconnus par les anticorps neutralisants sont localisés au niveau du domaine P (Zhou et al., 2005). Les épitopes T seraient quant à eux localisés au niveau du domaine M (Aggarwal et al., 2007).

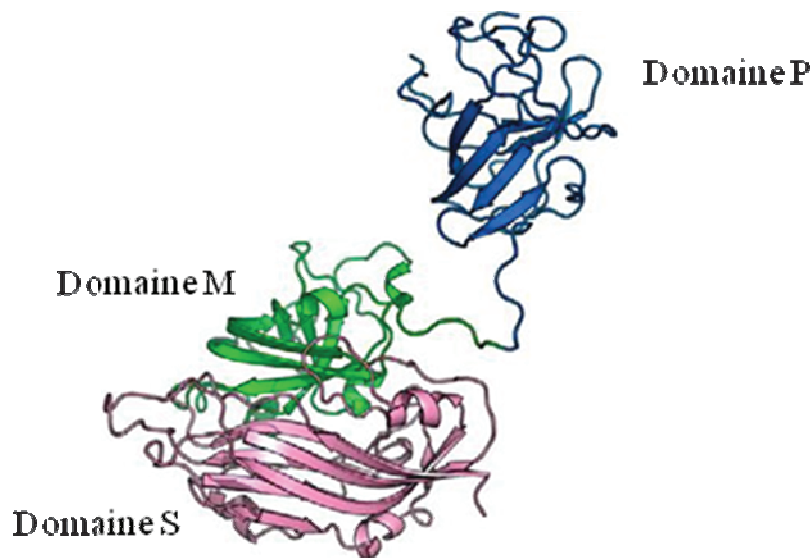


Figure 2 : Structure de la protéine de capsid codée par ORF2, constituée de 3 domaines : S, M et P. D'après Mori et al., 2011.

L'expression récente d'une protéine de capsid ne présentant pas la délétion de 111 aa à l'extrémité N-terminale mais une délétion de 52 aa à l'extrémité C-terminale a permis de montrer que la triangulation de la capsid serait de 3 et non pas de 1 comme initialement proposé, portant ainsi la taille théorique du virus à 40nm de diamètre (figure 3) (Xing et al., 2010). La capsid est composée de 30 unités morphologiques avec 60 monomères du fait de l'homodimérisation de la protéine de capsid (Tyagi et al., 2001). L'homodimérisation se fait au niveau d'une région hydrophobe de l'extrémité C-terminale (aa 585 à 610) (Xiaofang et al., 2001). Les résidus impliqués dans cette homodimérisation sont les aa alanine 597, valine 598, alanine 599, leucine 601 et alanine 602. Les acides aminés 368 à 394 semblent également nécessaires à la formation des particules virales (Li et al., 2005).

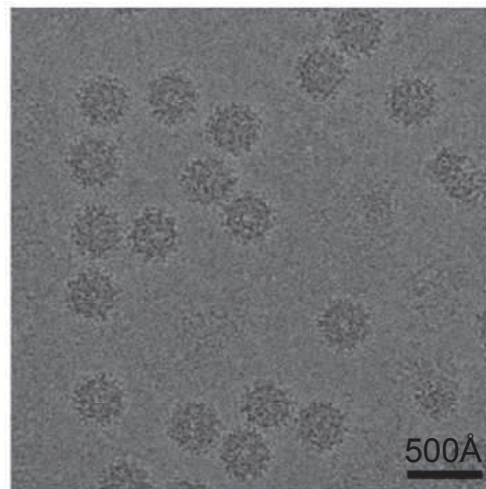


Figure 3 : Photographie de microscopie électronique des particules virales recombinantes ayant une triangulation T=3. D'après Xing et al., 2010.

On suppose que la protéine de capsid est capable d'interagir avec le récepteur cellulaire, bien que celui-ci soit inconnu. Cette interaction se ferait via le domaine M qui contient des aa hautement conservés entre les différents génotypes (Guu et al., 2009). Ce domaine pourrait également être impliqué dans les interactions avec les héparanes sulfates présentes à la surface des cellules (Kalia et al., 2009). Enfin, ORF2 semble interférer avec l'activité de NF- κ B, pouvant créer un environnement favorable au bon déroulement du cycle viral (Surjit et al., 2012).

3. ORF3.

ORF3 code une petite protéine de 113 aa pour le génotype 3 et le génotype lapin ou 114 aa pour les génotypes 1, 2 et 4 (Graff et al., 2006). Cette protéine contient 2 domaines N-terminaux hydrophobes (D1 et D2) et 2 domaines riches en proline (P1 et P2) (figure 4).

L'analyse de la séquence primaire n'a montré aucune homologie avec les protéines décrites à ce jour. Cette protéine est phosphorylée sur un seul résidu sérine de la région P1 (Holla et al., 2013).

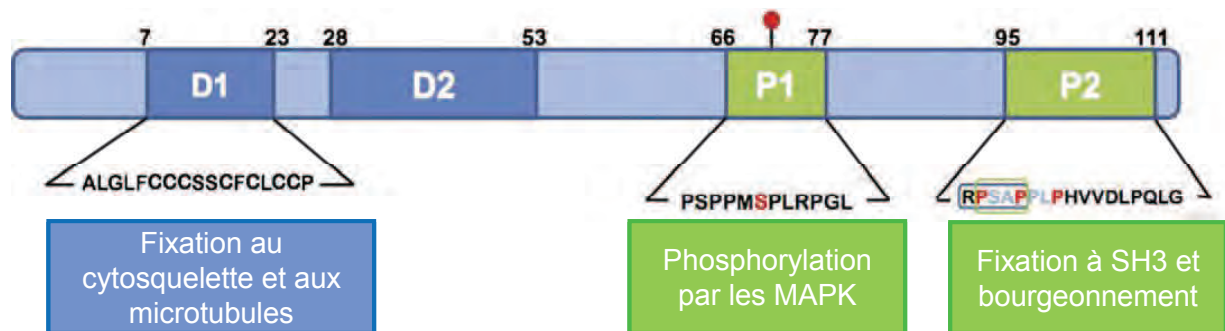


Figure 4 : Représentation schématique de la protéine codée par ORF3.
D'après Ahmad et al., 2011.

pORF3 semble interagir avec de nombreuses cibles. Dans des cellules de mammifères, cette protéine est localisée au niveau endosomal et au niveau des microtubules.

pORF3 permet le bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées en s'associant aux lipides (Emerson et al., 2010; Yamada et al., 2009). pORF3, grâce à son motif PSAP présent dans le domaine P2, interagit avec le gène de susceptibilité tumorale 101 (Tsg101), une protéine impliquée dans le bourgeonnement de virus enveloppés comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou Ebola (Martin-Serrano et al., 2001).

pORF3 semble moduler les voies de signalisations cellulaires. Il a été montré que son expression dans les cellules infectées augmentait la translocation nucléaire et l'activité d'ERK, une protéine de la famille des MAPK favorisant la survie et la prolifération cellulaire (Korkaya et al., 2001). pORF3 semble capable d'allonger la durée de vie des hépatocytes infectés en maintenant le signal de transduction médié par le récepteur aux facteurs de croissance des hépatocytes (HGFR) (Chandra et al., 2011) et en protégeant les cellules de l'apoptose par dépolérisation mitochondriale (Moin et al., 2007). pORF3 diminue la translocation nucléaire de l'hépatocyte nuclear factor 4 (HNF4), diminuant ainsi l'expression des gènes régulés par HNF4, comme par exemple CD72 (Chandra et al., 2011).

Cette protéine semble posséder des propriétés immuno-modulatrices, créant un environnement favorable à la réplication virale. Elle favorise une immunodépression locale autour des hépatocytes infectés en augmentant la sécrétion d' α 1-microglobuline (Tyagi et al., 2004). De plus, pORF3 retarde la transcription des protéines de l'inflammation en interférant avec la translocation de la forme phosphorylée de STAT3 (Chandra et al., 2008). pORF3 peut

également inhiber la phosphorylation de STAT1, réduisant l'expression des gènes stimulés par l'interféron α (IFN- α) (Dong et al., 2012).

D. Variabilité génétique du VHE.

1. Génotypes et sous-génotypes.

Alors qu'il n'existe qu'un seul sérotype pour le VHE (Emerson et al., 2001), la classification actuelle distingue 4 génotypes principaux (notés de 1 à 4). En se basant sur les génomes complets, le degré de divergence des séquences des différents génotypes varie entre 22 et 27% (Emerson et al., 2004). Il a été proposé de distinguer au sein de chaque génotype plusieurs sous-génotypes : 5 pour le génotype 1 (1a à 1e), 2 pour le génotype 2 (2a et 2b), 10 pour le génotype 3 (3a à 3j) et 7 pour le génotype 4 (4a à 4g) (Lu et al., 2006). Les séquences nucléotidiques des sous-génotypes diffèrent les unes des autres d'environ 6% à 14% pour les génotypes 1 et 2 et 12% à 20% pour les sous-génotypes 3 et 4 (Lu et al., 2006).

Les génotypes 1 et 2 sont strictement humains tandis que les génotypes 3 et 4 possèdent un réservoir animal. Des souches de VHE isolées du porc ont initialement été décrites et génétiquement caractérisées aux Etats-Unis en 1997 (Meng et al., 1997). Des souches de VHE ont par la suite été isolées chez le sanglier (Takahashi et al., 2004), le cerf (Reuter et al., 2009; Takahashi et al., 2004), le rat (Johns et al., 2010), le lapin (Zhao et al., 2009), le furet (Raj et al., 2012), la mangouste (Nakamura et al., 2006) et la chauve-souris (Drexler et al., 2012). Les porcs d'élevage et les sangliers constituent les principaux réservoirs animaux des génotypes 3 et 4 dans le monde (Meng, 2009). La grande identité génétique des souches isolées chez l'homme et l'animal a fait suspecter une transmission zoonotique.

A côté des souches de mammifères ont été décrites des souches aviaires appartenant à 3 génotypes distincts (aHEV 1, 2 et 3) (Haqshenas et al., 2001; Payne et al., 1999; Peralta et al., 2009; Sun et al., 2004). Compte tenu de l'existence de différents génotypes et d'une homologie de séquence de seulement 50% entre les souches aviaires et les souches mammifères de VHE, la classification de ces souches dans un nouveau genre semble pertinente. Il en est de même pour des souches de VHE récemment caractérisées chez la truite (figure 5) (Batts et al., 2011; Debing et al., 2013).

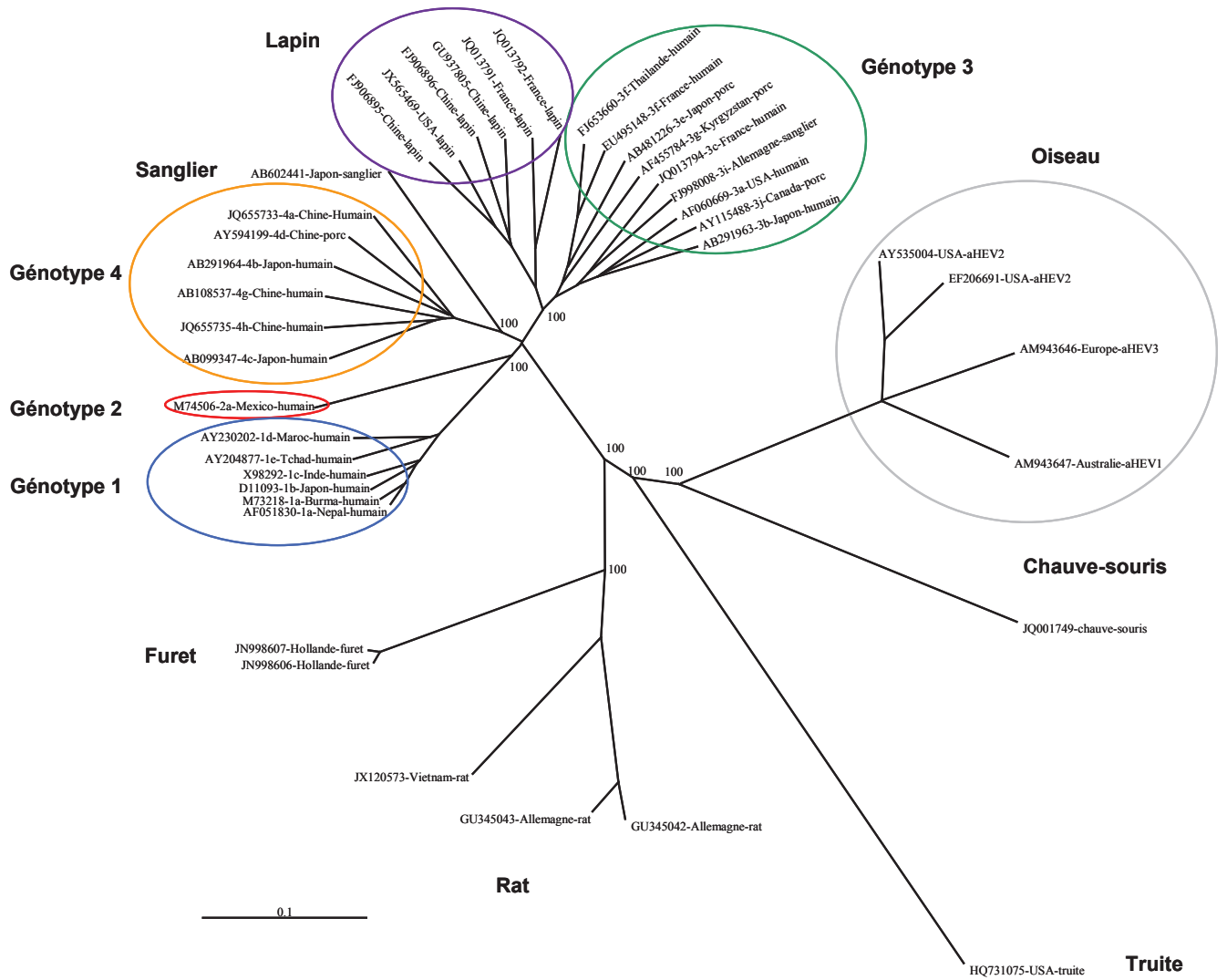


Figure 5 : Arbre phylogénétique basé sur les génomes complets disponibles.

De nouvelles classifications ont été récemment proposées sur la base d'analyses phylogénétiques des séquences en nucléotides des génomes complets et les séquences en aa des régions ORF1/2. L'étude de Smith et al. suggère une classification en 3 groupes (Smith et al., 2013). Le premier groupe rassemble les virus infectant l'homme, le porc, le sanglier, le cerf et le lapin. Ce groupe inclut les 4 génotypes majeurs du VHE et les nouveaux génotypes isolés chez le sanglier et le lapin. Le deuxième groupe correspond aux virus infectant le rat et le furet. Le troisième groupe correspond au virus infectant la chauve-souris. Les virus infectant les oiseaux pourraient constituer un genre à part, tout comme la souche isolée chez la truite.

Une autre étude basée sur les analyses phylogénétiques de génomes complets conduit à l'individualisation de 5 génotypes (Oliveira-Filho et al., 2013) : les 4 génotypes décrits par Lu associé à un 5^{ème} génotype correspondant à l'individualisation des souches isolées chez le sanglier au Japon (Takahashi et al., 2011b). Le génotype 3, quant à lui, est divisé en 3 sous-

groupes : le groupe 3.1 qui contient les souches isolées d'hommes et d'animaux en Asie, en Amérique du Nord et en Allemagne (3a, 3b, 3c, 3j). Le 3.2 qui contient les séquences de souches isolées en Europe, au Japon, en Thaïlande et au Kirgizstan (3e, 3f, 3g, 3i). Enfin, le groupe 3.3 contient les séquences des souches VHE de lapins. Cette classification réduit les divergences nucléotidiques maximales entre les sous-groupes : 19,2% pour le 3.1, 20,1% pour le 3.2 et 18,0% pour le 3.3. Ces valeurs sont comparables aux distances observées au sein des génotypes 1 (13,2%) et 4 (20,0%). Les génomes VHE de rats, chauves-souris et furets qui présentent un fort degré de divergence (66,5% à 83,0%) quand on les compare à celles des 4 génotypes établis pourraient constituer de nouveaux genres, tout comme les souches aviaires. La souche isolée chez la truite ne montre pas de lien de parenté suffisant avec les souches décrites de VHE ou les autres membres de la famille des *Hepeviridae*, remettant en cause son appartenance à cette famille. Enfin, cette étude suggère que les critères permettant la distinction en sous-génotype ne sont pas uniformes et que cette approche n'est pas contributive pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie du VHE. Néanmoins, des études menées sur des génomes complets ont montré que les souches 3a et 3b circulant aux USA et au Japon sont clairement distinctes des souches 3f, 3c et 3e isolées en Europe (Izopet et al., 2012; Legrand-Abravanel et al., 2009a).

Meng a proposé l'individualisation de plusieurs genres : le genre *Orthohepevirus* comprenant les 4 génotypes majeurs ainsi que les génotypes isolés chez le lapin, le sanglier, le rat et le furet, le genre *Avihepevirus* pour les souches aviaires, le genre *Piscihepevirus* pour les souches isolées chez la truite et le genre *Chiropteranhepevirus* pour les souches isolées chez la chauve-souris (Meng, 2013). Tous ces travaux suggèrent qu'il est encore nécessaire d'améliorer la classification du VHE grâce à l'accumulation de séquences génomiques complètes.

2. Les virus recombinants.

Différents travaux ont montré l'existence de souches recombinantes (tableau 1). Les virus recombinants actuellement décrits sont issus de recombinaisons intergénomiques et intragénomiques (Chen et al., 2012; van Cuyck et al., 2005; Wang et al., 2010). La souche 1-11092 est issue d'une recombinaison entre 2 souches de génotype 1. La souche 4-450072 isolée chez le porc est issue de 2 événements de recombinaison distincts entre un génotype 4 porcine et un génotype 4 humain d'une part, et d'un génotype 3 humain d'autre part (Wang et al., 2010).

Le macro domaine, la région codant pour l'hélicase et l'ARN polymérase sont les sites préférentiels de recombinaison. Des événements de recombinaisons peuvent également survenir au niveau de la région ORF2 (Chen et al., 2012).

A côté des virus issus de ces recombinaisons inter et intragénotypiques, des virus ayant intégré des fragments de gènes humains ont récemment été décrits. Ces fragments ont pour origine des gènes codant les fractions ribosomiques S17 ou S19 (Nguyen et al., 2012; Shukla et al., 2011). Dans les 2 cas, l'insertion a eu lieu dans la région riche en proline.

Tableau 1 : Souches de VHE recombinantes ayant été caractérisées.

Souche (génotype-n° Genbank)	Pays	Site(s) de recombinaison	Type de recombinaison	source
1-076239	Japon	X H R	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
1-11092	Japon	X H	intragénotype	Wang et al., Virol. J., 2010
1-11093	Japon	Y P	intragénotype	Wang et al., Virol. J., 2010 Van Cuyck et al., J. Virol., 2005
1-211244	Japon	X H R	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
1-211247	Japon	X H R	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
1-457024	Japon	Y P X H	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
1-051830	Népal	Y P	intragénotype	Van Cuyck et al., J. Virol., 2005
3-291954	Japon	H P	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
3-426403	Japon	M Y P X	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
3-723513	Espagne	ORF2/3	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
4-450072	Chine	X H	intragénotype	Wang et al., Virol. J., 2010
		R ORF2/3	<u>intergénotype</u>	
4-481227	Japon	H R ORF2/3	intragénotype	Chen et al., J. Med. Virol., 2012
3-709170	Royaume Uni	PPR	gène humain (S17)	Shukla et al., PNAS, 2011
3-564006	Etats-Unis	PPR	gène humain (S19)	Nguyen et al., J. Virol., 2012

M : méthyltransférase ; Y domaine Y ; P : Protéase ; X : domaine X ou macro domaine ; H : hélicase ; R : ARN polymérase ; ORF2/3 : ORF 2 et 3.

3. Quasi-espèce.

Le VHE, comme la plupart des virus à ARN, est présent chez l'hôte sous forme d'une quasi-espèce virale (Grandadam et al., 2004; Kamar et al., 2010b), c'est-à-dire un mélange complexe et en équilibre de variants génétiquement distincts mais apparentés (Lauring et al., 2010). La présence simultanée de variants viraux permet la sélection rapide et continue des variants les mieux adaptés à l'environnement dans lequel le virus se réplique. La capacité d'adaptation de la quasi-espèce virale aux modifications de l'environnement joue un rôle important dans la physiopathologie de l'infection et probablement dans les mécanismes de persistance virale chez les immunodéprimés.

E. Etude du cycle de réplication.

1. Culture cellulaire.

Le VHE a longtemps été considéré comme un virus très difficile à cultiver *in vitro* (Tam et al., 1996).

Une souche de génotype 3 (souche JE03-1760F) isolée de selles ayant un titre de $2 \cdot 10^7$ copies/mL a pu cependant être cultivée sur la lignée cellulaire PLC/PRF/5 dérivant de cellules d'hépatocarcinome, et sur la lignée A549 dérivant de cellules de cancer du poumon. Ces deux systèmes ont permis d'atteindre des titres viraux de l'ordre de 10^8 et 10^7 copies/mL respectivement, au bout de 50 jours de culture (Tanaka et al., 2007). Il avait été suggéré que le titre élevé de l'inoculum initial augmentait la probabilité d'introduire des variants capables de s'adapter. Les passages successifs des souches ont conduit à une augmentation des titres atteignant 10^8 - 10^9 et 10^9 - 10^{10} copies/mL respectivement après 53 passages. L'adaptation d'une souche de génotype 4 (souche HE-JF5/15F) a ensuite été réalisée sur les mêmes lignées cellulaires (Tanaka et al., 2009) et le passage de cette souche a permis d'atteindre des titres de l'ordre de 10^9 - 10^{10} copies/mL après 33 passages.

Plus récemment, la souche Kernow-C1, une souche de génotype 3 isolée de selles d'un patient chroniquement infecté par le VHE, a été adaptée sur la lignée HepG2/C3A. Les passages successifs ont permis la sélection d'un virus recombinant contenant une insertion de 58 aa dans la PPR. Cette insertion avait pour origine un gène humain codant la protéine ribosomale S17 (Shukla et al., 2011).

Des souches de génotype 1, 3 et 4 isolées du sérum de patients virémiques ont ensuite été adaptées en culture cellulaire sur PLC/PRF/5 et A549. La propagation des souches issues de sérum nécessite une charge virale au moins égale à $3,5 \cdot 10^5$ copies/mL. La présence d'anticorps anti-VHE ne semble pas interférer dans l'établissement de l'infection cellulaire (Takahashi et al., 2010).

Plus récemment, il a été montré que des virus de génotype 3 pouvaient être cultivés sur des lignées cellulaires dérivant de cellules humaines d'hépatocarcinome HepaRG et sur la lignée PCM-19, dérivant de cellules souches embryonnaires de porc (Rogee et al., 2013). Ces 2 lignées, pouvant exprimer les gènes d'hépatocytes primaires humains ou porcins, pourraient

permettre d'étudier au mieux l'histoire naturelle de l'infection cellulaire à VHE. Cependant, les titres actuellement obtenus ne sont pas très élevés (10^3 copies/mL).

Shukla a montré que les souches de génotype 3 infectaient plus efficacement les lignées cellulaires dérivant de porc (LLC-PK1) comparativement à la lignée humaine HepG2/C3A (Shukla et al., 2011). Inversement, des souches de génotypes 3 et 4 isolées de porcs et de sangliers sont capables de se répliquer sur les lignées humaines A549 et PLC/PRF/5 quand la quantité de virus était au moins égale à 2.10^4 copies par puits d'une plaque 6 puits. Les souches avaient été isolées de foie, de fèces ou de sérum (Takahashi et al., 2011a). Plusieurs souches de lapin isolées de sérum et de foie ont également été adaptées sur ces lignées (Jirintai et al., 2012). Ces données renforcent le caractère zoonotique du VHE.

Les virus présents dans le surnageant de culture présentaient une densité de 1,15-1,16 g/mL sur gradient de sucrose, densité identique à celle des particules virales isolées dans le sérum mais inférieure à celle des virus isolés dans les selles (1,27-1,28 g/mL). Le traitement des virus présents dans le surnageant de culture ou le sérum par un détergent comme le NP40 conduit à l'obtention de particules virales présentant une densité identique à celle des virus isolés des selles, renforçant l'idée que les virus isolés du surnageant de culture ou du sérum sont associés à des lipides.

Enfin, la transfection de génomes de VHE peut également être utile pour disséquer le cycle de réplication du VHE. La lignée hépatique Huh7 ainsi que la lignée cellulaire de carcinome de colon Caco-2 peuvent être utilisées (Emerson et al., 2010).

2. Le cycle répliatif.

La mise au point de ces systèmes de culture étant récente, le modèle proposé pour le cycle viral du VHE est basé sur l'analyse du génome et les analogies avec les autres virus à ARN⁺ (figure 6). Cependant, des études récentes d'expression *in vitro* et les études de répliatons ont mis en évidence de nouveaux éléments.

Le site principal de répliatation du virus est l'hépatocyte. Le récepteur cellulaire n'est pas connu à ce jour. Néanmoins, la présence d'héparanes sulfates à la surface des cellules à infecter semble un prérequis nécessaire pour la fixation du virus (figure 6, étapes 1 et 2) (Kalia et al., 2009). Elles permettent la fixation non spécifique du virus à la surface des cellules avant la fixation au récepteur. Une étude récente suggère que l'entrée du VHE serait clathrine-dépendante (figure 6, étape 3) (Kapur et al., 2012).

Le trafic cellulaire suivant l'entrée du virus est peu connu. La protéine de choc thermique ou Heat Shock Protein 90 (HSP 90) et la tubuline semblent jouer un rôle dans ce processus (Zheng et al., 2010). La localisation ainsi que les mécanismes aboutissant à la décapsidation de l'ARN dans le cytoplasme sont inconnus (figure 6, étapes 4 et 5).

Une fois l'ARN viral libéré dans le cytosol de la cellule, le génome est traduit grâce à sa coiffe en polyprotéine non structurale codant pour les différents domaines ayant les activités méthyltransférase, protéase, hélicase, ARN polymérase dépendante de l'ARN. Ces activités permettent la synthèse du brin d'ARN⁻ (figure 6, étape 6). Il a été montré que l'extrémité 3' du génome se fixe spécifiquement à la répliatase virale située à la surface du réticulum endoplasmique (Rehman et al., 2008). Dans le foie, on peut détecter de l'ARN⁺ et de l'ARN⁻ alors que dans le sérum, la bile et les cellules mononuclées périphériques (PBMC), seul l'ARN⁺ est détecté (Nanda et al., 1994). Le brin d'ARN⁻, par analogie aux *Alphavirus*, sert vraisemblablement de matrice pour la synthèse d'ARN génomique et subgénomique (Purdy et al., 1993) (figure 6, étapes 7a et 7b).

In vitro, un système de répliatation a montré que les protéines ORF2 et 3 étaient traduites à partir d'un ARN subgénomique bicistronique (Graff et al., 2006). Le brin d'ARN subgénomique sert de matrice pour la traduction de la protéine de capsid codée par ORF2 et la phosphoprotéine codée par ORF3 (figure 6, étape 8). Les protéines de capsid s'assemblent ensuite en intégrant l'ARN viral pour former de nouvelles particules virales (figure 6, étape 9). *In vitro*, les protéines codées par ORF 2 et 3 interagissent, suggérant un rôle d'ORF3 dans

l'assemblage des particules virales (Tyagi et al., 2002). De même, la protéine glucose-regulated protein 78 ou Grp78, membre de la famille des protéines de choc thermique 70 (HSP70), pourrait intervenir dans le repliement/assemblage des protéines de capsid (Yu et al., 2011).

Les mécanismes aboutissant à la libération du virus dans le sang et la bile sont encore inconnus. ORF3 intervient dans le phénomène de bourgeonnement (Yamada et al., 2009) (figure 6, étape 10a, 10b et 11). *In vitro*, la protéine codée par ORF3 n'est pas indispensable au bon déroulement du cycle viral (Emerson et al., 2006) alors qu'elle l'est *in vivo* pour l'infection des macaques (Graff et al., 2005). Bien qu'il s'agisse d'un virus non enveloppé, l'association aux lipides, la localisation endosomale de pORF3 et la présence du motif PSAP requise pour le bourgeonnement des virus suggèrent que le VHE suit la voie des corps multivésiculaires pour sa libération hors des cellules infectées (Nagashima et al., 2011). De plus, il a été *montré in vitro* que le VHE n'était pas cytolytique (Tanaka et al., 2007).

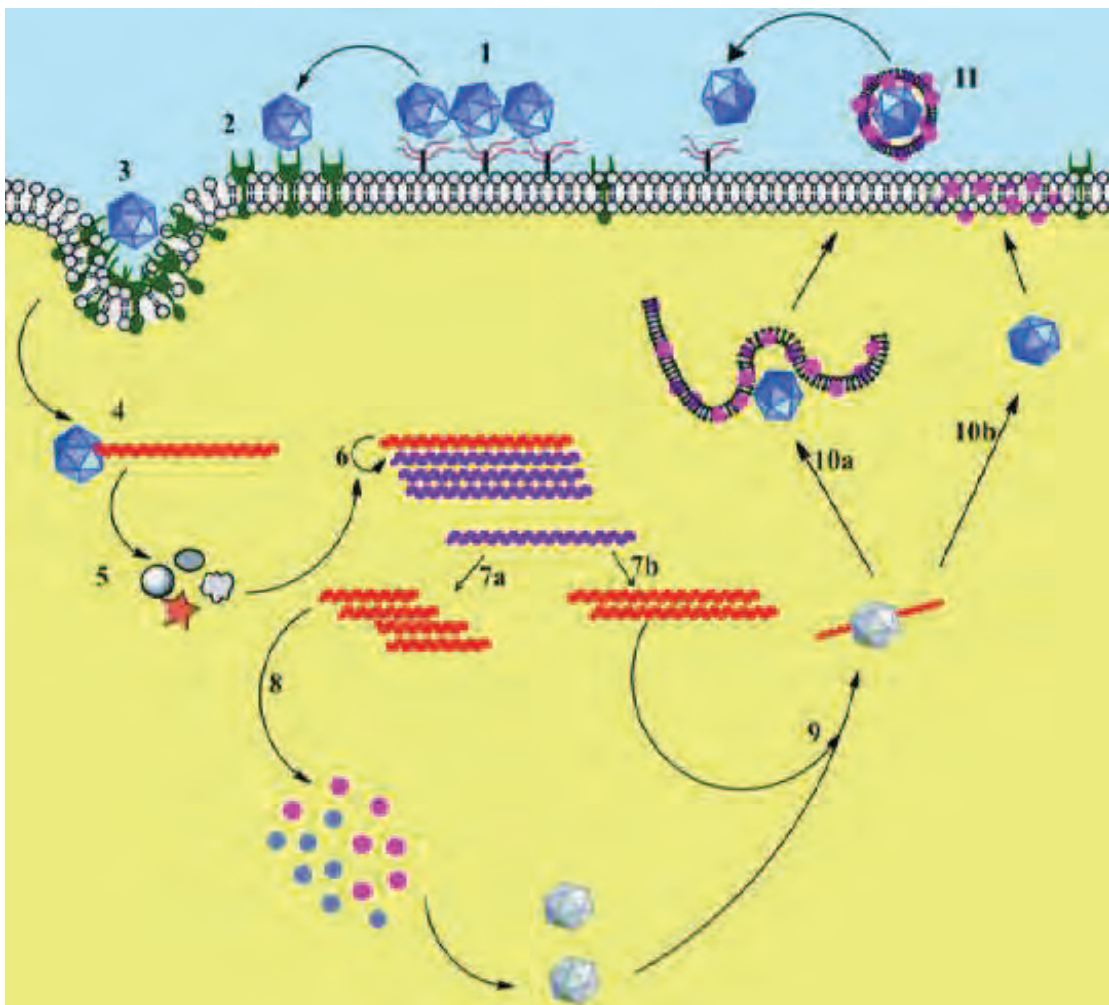


Figure 6 : Schéma du cycle de réplication du virus de l'hépatite E.
D'après Ahmad et al., 2011.

III. Epidémiologie.

A. Mode de contamination.

1. Transmission féco-orale interhumaine.

La transmission féco-orale est le principal mode de transmission de l'hépatite E dans les pays où l'hygiène collective et les dispositifs d'assainissement de l'eau sont insuffisants. Les épidémies dans les pays en développement sont liées à une eau contaminée et sont plus importantes lors de la saison des pluies (Naik et al., 1992; Ray et al., 1991).

Dans les pays industrialisés, la contamination par voie hydrique ne peut être exclue. En effet, le VHE a été détecté dans les eaux de rivière aux Pays-Bas (Rutjes et al., 2009), en Slovénie (Steyer et al., 2011), dans les eaux usées (Clemente-Casares et al., 2003; La Rosa et al., 2010) ou bien encore dans les fruits de mer (Li et al., 2007; Said et al., 2009).

La transmission interhumaine directe semble possible mais reste mineure (Aggarwal, 2010; Teshale et al., 2010). Des facteurs associés à l'habitation comme la présence d'un bassin commun pourrait favoriser la contamination lors des épidémies.

2. Transmission zoonotique.

Le VHE est le seul virus des hépatites possédant un réservoir animal. Dans les pays industrialisés, les réservoirs animaux représentent le principal facteur de risque de contamination. Le franchissement de la barrière d'espèce a été démontré à partir de modèle animal. Il est expérimentalement possible d'infecter des macaques à partir de souches de VHE de génotype 3 ou 4 d'origine porcine (Arankalle et al., 2006; Meng et al., 1998). Cette infection se traduisait par une légère augmentation des transaminases, une séroconversion ainsi qu'une excrétion fécale du virus (Arankalle et al., 2006). De la même façon, des souches de génotype 3 ou 4 isolées chez l'homme peuvent infecter le porc (Feagins et al., 2008; Halbur et al., 2001). En revanche, les souches strictement humaines (génotype 1 ou 2) sont incapables d'infecter le porc (Meng et al., 1998). Les souches de VHE de lapin sont capables d'infecter le porc (Cossaboom et al., 2012b). Une souche de VHE de lapin a récemment été retrouvée chez un

patient, suggérant que la transmission à l'homme est possible (Izopet et al., 2012). Les souches aviaires ne semblent pas capables d'infecter le macaque (Huang et al., 2004) ou le porc (Pavio et al., 2010), suggérant l'absence de risque de transmission des souches aviaires à l'homme. Enfin, les souches isolées chez le rat semblent également incapables d'infecter le macaque (Purcell et al., 2011) ou le porc (Cossaboom et al., 2012b). Cependant, les souches aviaires et de rat étant génétiquement plus distantes des souches infectant l'homme, les outils moléculaires actuellement utilisés ne permettent peut être pas leur détection.

De nombreux cas d'hépatite E ont été décrits en Europe et au Japon après consommation de viande contaminée. La consommation de figatelli (Colson et al., 2010), d'abats et de viande de sanglier (Meng, 2011) est également associée à la transmission du VHE. Ces cas sont vraisemblablement liés à une transmission zoonotique à partir d'animaux d'élevage ou domestiques ainsi qu'à la consommation de viande de porc contaminée. La contamination par contact direct avec le réservoir animal a été documentée. Une étude américaine a mis en évidence une plus forte séroprévalence des Immunoglobulines G (IgG) anti-VHE chez les vétérinaires par rapport à la population générale (27% vs 16%) (Meng et al., 2002). De même, une plus grande prévalence des IgG anti-VHE a été rapportée chez les personnes étant en contact régulier avec des porcs (Drobeniuc et al., 2001; Olsen et al., 2006; Withers et al., 2002). L'origine de cette contamination pourrait être le fumier ou les excréments d'animaux (Kasorndorkbua et al., 2005). Enfin, ont été rapportées les contaminations d'un homme par son cochon de compagnie (Renou et al., 2007) et d'un chirurgien s'entraînant sur des porcelets (Colson et al., 2007b).

3. Transmission materno-foetale.

La transmission verticale du VHE de la mère à l'enfant est possible et varie de 33 à 100% selon les études (Khuroo et al., 1995; Kumar et al., 2004). La détection du virus dans le sang de cordon serait en faveur d'un mode de contamination transplacentaire (Khuroo et al., 1995).

4. Transmission parentérale.

Il a été montré que des patients pouvaient être contaminés suite à une transfusion sanguine aussi bien dans les pays en voie de développement (Bortoliero et al., 2006; Khuroo et al., 2004) que dans les pays industrialisés (Boxall et al., 2006; Colson et al., 2007a; Matsubayashi et al., 2004).

La transmission par injection d'héparine, un médicament dérivant de la muqueuse intestinale de porc, a été évoquée sans avoir été prouvée (Crossan et al., 2013).

5. Transmission nosocomiale.

La transmission du VHE dans un contexte nosocomial est également possible. Il a été rapporté un cas d'épidémie hospitalière où le personnel s'est contaminé lors de la prise en charge d'un patient souffrant d'une hépatite E (Robson et al., 1992). La transmission entre deux patients d'hématologie clinique a également été suggérée (Mansuy et al., 2009b).

B. Répartition géographique et prévalence.

1. Pays en développement.

Les géotypes 1 et 2, strictement humains, sont responsables d'épidémies dans les pays en développement. Le géotype 1 est retrouvé en Asie et en Afrique, tandis que le géotype 2 est retrouvé au Mexique ainsi que dans certains pays d'Afrique (Nigéria, Tchad) (figure 7) (Lu et al., 2006). Des épidémies ont été fréquemment rapportées en Chine, en Asie du Sud-est, en Asie centrale et en Afrique. La séroprévalence dans ces pays est élevée et varie de 30 à 80% (Abdel Hady et al., 1998; Gad et al., 2011; Labrique et al., 2009).

2. Pays industrialisés.

Initialement, on pensait que la plupart des cas étaient liés à un voyage en zone d'endémie. Cependant, ces dernières années, il est apparu que des cas autochtones étaient possibles et probablement fréquents (Dalton et al., 2011; Kwo et al., 1997; Mansuy et al., 2004), remettant ainsi en cause l'origine supposée médicamenteuse de certaines hépatites aiguës (Dalton et al., 2007a; Davern et al., 2011). Dans les pays industrialisés, les génotypes 3 et 4 sont retrouvés aussi bien chez l'homme que l'animal et sont responsables de cas sporadiques (Dalton et al., 2008a). Le génotype 3 présente une répartition mondiale (figure 7) (Dalton et al., 2008a). En France, le sous-génotype le plus fréquemment retrouvé est le 3f, mais les sous-génotypes 3c et 3e sont également fréquemment retrouvés (Bouquet et al., 2011; Legrand-Abrevanel et al., 2009a). Le génotype 4 est retrouvé en Asie, notamment en Chine, à Taiwan, au Japon et au Viêt Nam (Lu et al., 2006). La présence de ce génotype a récemment été signalée chez l'homme en Europe (Colson et al., 2012; Garbuglia et al., 2013; Jebbloui et al., 2013) et en Belgique chez le porc (Hakze-van der Honing et al., 2011). Ce génotype aurait été introduit dans ces régions par des voyageurs de retour de zones d'endémies, par des porcs domestiques ou des denrées alimentaires originaires d'Asie. Dans les pays industrialisés, le VHE est responsable de cas sporadiques.

En Europe, la séroprévalence chez les donneurs de sang est de 16,0% dans le sud-ouest de l'Angleterre (Dalton et al., 2008b), 12,0% pour le reste de l'Angleterre (Beale et al., 2011) et 29,5% en Allemagne (Wenzel et al., 2013). En France, dans la région Midi-Pyrénées, elle atteint 52,5%, suggérant que cette région est hyperendémique pour le VHE (Mansuy et al., 2011).

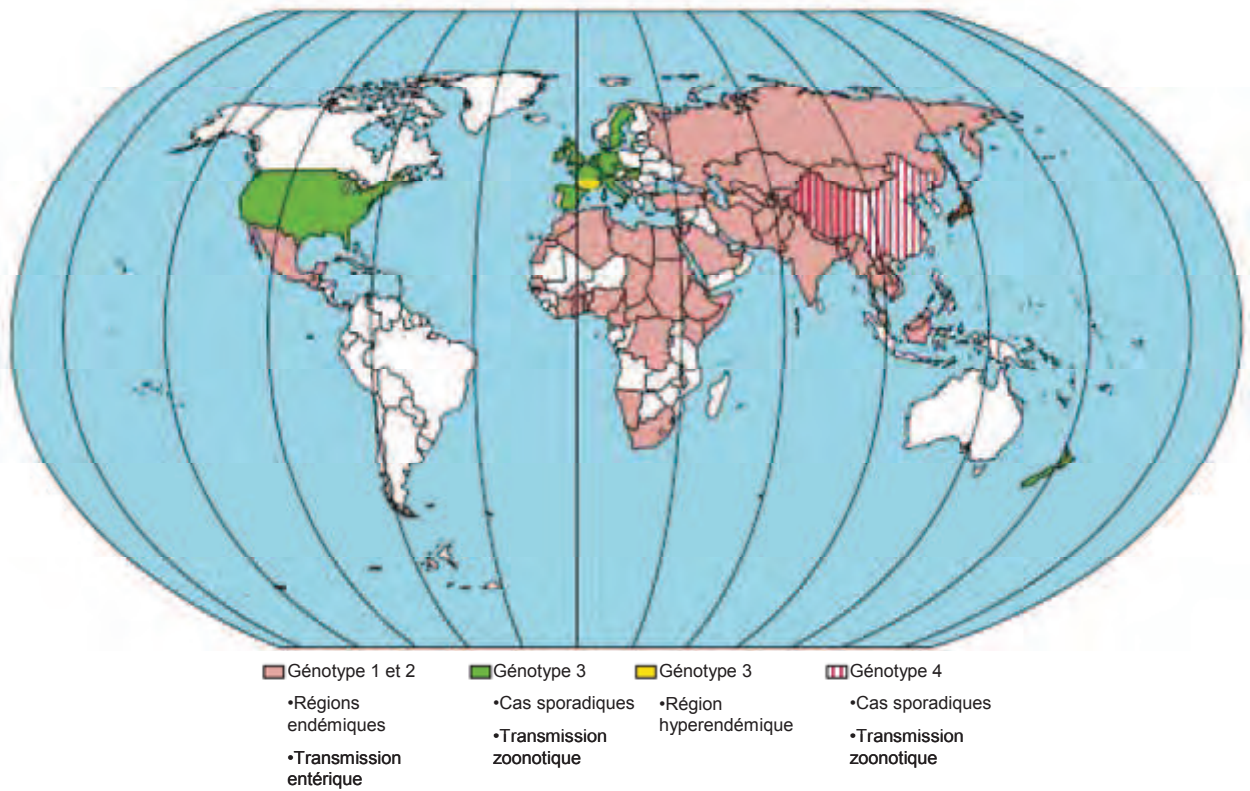


Figure 7 : Répartition géographique des différents génotypes du VHE.
D'après Kamar et al., 2012a.

IV. Physiopathologie.

La physiopathologie du VHE est encore mal connue à ce jour. Comme pour le virus de l'hépatite A, le virus pénètre dans l'organisme par voie orale via l'eau de boisson ou des aliments contaminés. Le site initial de réplication n'est pas connu mais il pourrait s'agir du tractus intestinal. Le virus atteindrait dans un second temps le foie par la circulation portale et se répliquerait dans les hépatocytes. Le colon et les ganglions lymphatiques ont été décrits comme des sites potentiels de réplication chez le porc (Williams et al., 2001). Leur rôle exact dans la physiopathologie n'est pas encore connu. L'ARN viral a également été détecté dans les PBMC sans qu'une activité répliquative n'ait été mise en évidence (Ippagunta et al., 2010).

La mise en place de la réponse antivirale fait intervenir de nombreux facteurs solubles, cellulaires et intracellulaires. La mise en place d'une réponse immunitaire appropriée au niveau hépatique est d'autant plus complexe qu'elle doit prendre place dans un environnement tolérogène. En effet, certaines populations cellulaires hépatiques comme les cellules endothéliales sinusoidales, l'environnement cytokinique et l'architecture du foie contribuent à la diminution de la réponse immunitaire (Protzer et al., 2012).

Les caractéristiques phénotypiques des cellules immunitaires présentes dans le foie sont différentes de celles rencontrées en périphérie. Le rapport CD4+/CD8+, de l'ordre de 3/2 en périphérie, est inversé dans le foie qui contient 60 à 90% de cellules CD8+ (Norris et al., 1998). Le foie contient également de nombreuses cellules de l'immunité innée. Par exemple, les cellules natural killer (NK) représentent plus de 40% des cellules immunes présentes au niveau hépatique contre 10 à 15% des PBMC (Lunemann et al., 2012). Les cellules NK jouent un rôle majeur dans le contrôle des infections virales hépatiques, en permettant la destruction des cellules infectées par reconnaissance directe (Stegmann et al., 2012) ou en jouant le rôle de cellule régulatrice en interférant avec les cellules T spécifiques (Peppia et al., 2013).

A. Réponse immunitaire au stade aigu de l'hépatite.

Les études s'intéressant à la réponse immunitaire anti-VHE sont encore peu nombreuses.

1. Réponse immunitaire innée.

Lors d'une hépatite E aiguë, il a été montré que le nombre de cellules NK et natural killer T (NKT) présentes dans le sang périphérique était diminué par rapport au nombre observé chez des témoins sains. La plupart des NK exprimaient CD69+, un marqueur d'activation. Le recrutement des NK au niveau hépatique pourrait expliquer leur nombre plus faible en périphérie (Srivastava et al., 2008). L'interleukine (IL)-1 α et la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α) présentent des concentrations sériques plus élevées lors de la phase inflammatoire chez les patients ayant une hépatite E aiguë, suggérant leur implication dans la pathogénèse (Tripathy et al., 2012). Chez les patients greffés rénaux infectés par le VHE, il a été suggéré qu'une expression plus importante des gènes stimulés par les interférons de type I pourrait favoriser la persistance du VHE en induisant un état réfractaire à la voie de signalisation médiée par les interférons de type I (Moal et al., 2013).

Une étude transcriptomique a été réalisée par biopuce sur une série de biopsies obtenues à partir de chimpanzés infectés par le VHE ou le virus de l'hépatite C (VHC). Il a été montré que le VHE est plus sensible à la réponse induite par l'IFN- α et que la réponse adaptative joue un rôle moins important pour l'élimination du virus. La plus faible expression des gènes normalement exprimés lors de la réponse adaptative vient appuyer cette hypothèse. Cependant, le VHE a su développer des mécanismes pour supprimer les voies de signalisation de l'IFN- α (Dong et al., 2012). En effet, pORF3 est capable d'inhiber la phosphorylation de STAT1 médiée par l'IFN- α . Ceci entraîne une diminution de l'expression des gènes stimulés par l'IFN- α , notamment la protéine kinase R (PKR), la 2'-5' oligoadénylate synthase (2'-5'OAS) et la protéine Myxovirus resistance A (MxA).

2. Réponse immunitaire adaptative.

a) Réponse humorale.

La réponse humorale anti-VHE est détectable dès l'apparition des symptômes. Les IgM apparaissent précocement au début de la maladie (Favorov et al., 1992). Les IgG sont détectées peu de temps après les IgM. Leur titre augmente lors de la phase aiguë et de la convalescence. Les anticorps sécrétés sont dirigés contre les protéines codées par ORF1 (Kaur et al., 1992), la protéine de capsid codée par ORF2 (Li et al., 2005; Schofield et al., 2000; Zhou et al., 2005) et la protéine codée par ORF3 (Osterman et al., 2012). Plusieurs études montrent que la protéine de capsid contient des épitopes neutralisants (Schofield et al., 2000; Zhou et al., 2005).

b) Réponse cellulaire.

La réponse cellulaire anti-VHE joue probablement un rôle important dans le contrôle de l'infection par le VHE, comme cela a déjà pu être montré lors des infections par le virus de l'hépatite B (VHB) et le VHC (Guidotti et al., 2006).

Le profil d'expression des gènes des cellules T de patients ayant une hépatite E aiguë a montré une augmentation d'expression des intégrines (CD11a ou Lymphocyte function-associated antigen 1 : LFA-1) et des récepteurs d'adressage (notamment CCR5) à la surface des CD8+. Ces cellules étaient également plus activées que celles issues de patients sains ou de patients rétablis. Ces éléments suggèrent que les cellules T détectables dans le sang périphérique sont adressées au site primaire de l'infection pour assurer leurs fonctions effectrices (TrehanPati et al., 2011). Le recrutement hépatique des lymphocytes T CD8+ lors d'une hépatite E aiguë a été montré par l'étude de biopsies de foie de patients infectés (Prabhu et al., 2011). Ainsi, la réponse immune à médiation cellulaire apparaît primordiale pour l'éradication du virus. Chez les patients immunodéprimés, l'altération de cette réponse T conduit à la persistance du VHE. Le blocage des récepteurs inhibiteurs PD-1 et/ou CTLA-4 permet de rétablir une réponse T efficace (Suneetha et al., 2011). Enfin, le virus de l'hépatite E n'étant pas cytolytique (Tanaka et al., 2007), l'atteinte hépatique pourrait être liée à la réponse immunitaire comme cela a été montré pour d'autres virus des hépatites (Bertoletti et al., 1991; Vallbracht et al., 1986).

Lors d'une hépatite E aiguë, la proportion de cellules CD4⁺ augmente en périphérie. Ces cellules ne sont ni de type Th1 ni Th2 : il pourrait donc s'agir de cellules NK ou de lymphocytes T régulateurs (T reg) (Srivastava et al., 2007). *In vitro*, la stimulation des PBMC par des peptides dérivant d'ORF2 est capable d'induire la sécrétion d'IFN- γ , suggérant que la population CD4⁺ pourrait effectivement correspondre aux NK. Cependant, cette étude n'exclut pas l'expansion de la population T reg étant donné que la sécrétion d'IL-10 n'a pas été étudiée (Srivastava et al., 2007). L'expansion de la population T régulatrice CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ dans le sang périphérique a récemment été montrée lors d'une hépatite E aiguë (Tripathy et al., 2011). Une augmentation d'IL-10 circulant a également été décrite, suggérant un rôle immunomodulateur de cette population lymphocytaire lors de l'infection. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour déterminer leur implication dans la régulation de la réponse immunitaire.

B. Réponse immunitaire et sévérité de l'infection par le VHE.

1. Le cas des hépatites fulminantes.

Dans le cas d'une hépatite E fulminante, les taux sériques d'IgM/IgG anti-VHE sont plus élevés que ceux observés lors d'une hépatite E non compliquée (Saravanabalaji et al., 2009). Une plus grande fréquence de cellules T CD4⁺ a été retrouvée dans le foie de patients présentant une hépatite fulminante. La présence de cellules T CD8⁺ a également été retrouvée (Agrawal et al., 2012; Prabhu et al., 2011). La stimulation des PBMC par des peptides dérivant d'ORF2 et ORF3 conduit à une plus forte prolifération de la population lymphocytaire B chez les patients présentant une hépatite fulminante comparativement aux patients ayant une hépatite E aiguë non compliquée. Une faible sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α chez ces patients est également retrouvée (Srivastava et al., 2010). Lors du suivi d'une hépatite fulminante, une plus forte sécrétion d'IFN- γ et d'IL-12 par les PBMC stimulés est associée à la survie à l'hépatite fulminante (Saravanabalaji et al., 2009). Ainsi, une réponse de type Th2 associée à des taux faibles d'IFN- γ semblent favoriser l'apparition d'une hépatite fulminante et le décès du patient.

2. Le cas particulier de la femme enceinte.

La grossesse représente une situation physiologique au cours de laquelle la réponse immunitaire est polarisée vers un type Th2 (Pal et al., 2005). Lors d'une hépatite E chez la femme enceinte, il a été montré que des mutations dans les gènes des récepteurs à la progestérone, une expression réduite de ces récepteurs ainsi que du facteur bloquant induit par la progestérone (PIBF) et un rapport IL-12/IL-10 plus élevé étaient associés à une issue plus péjorative de la grossesse (Bose et al., 2011). Un polymorphisme dans la région promotrice du gène du TNF- α à la position 308 (G/A) a été associé à la susceptibilité à l'infection par le VHE. Le polymorphisme du promoteur du TNF- α (308 G/A) et de l'interféron γ (874 TA) semble contribuer à la sévérité de l'infection (Mishra et al., 2011). Ainsi, la régulation de la sécrétion de cytokines semble importante pour l'évolution clinique de l'infection à VHE.

A côté des facteurs immunologiques, des facteurs virologiques pourraient également intervenir. Des charges virales plus élevées sont retrouvées chez les femmes enceintes présentant une hépatite fulminante comparativement aux femmes enceintes présentant une hépatite E non compliquée. Les virus isolés appartenant tous au génotype 1, l'influence du génotype n'a pas pu être étudiée (Bose et al., 2011; Kar et al., 2008). Cependant, il semblerait que le génotype 1 soit plus pathogène pour l'homme comparativement aux génotypes 3 et 4 (Emerson et al., 2003; Mizuo et al., 2005). Enfin, certaines mutations répertoriées au niveau de l'hélicase (notamment la substitution V1213A) pourraient influencer l'évolution vers une forme fulminante (Mishra et al., 2013).

Des études complémentaires sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une hépatite fulminante et dans la survie des patientes.

V. Clinique.

A. Hépatite aiguë.

Le VHE est souvent responsable d'infections asymptomatiques, mais les formes ictériques ou fulminantes sont possibles (Aggarwal, 2011). Durant les épidémies, la mortalité varie de 0,5 à 4,0% (Khuroo, 1980).

La présentation clinique est similaire entre les pays en développement et les pays industrialisés (Aggarwal, 2011). La durée d'incubation varie de 15 à 60 jours. La phase pré-ictérique dure de 1 à 27 jours et est marquée par une symptomatologie principalement digestive (douleurs abdominales, nausées, vomissements). Le début de la phase ictérique, brutal, est marqué par l'apparition d'un ictère, des urines foncées et des selles décolorées. Cette phase dure de 10 à 24 jours (Vishwanathan et al., 1957). L'évolution est ensuite spontanément favorable.

Dans les pays à ressources limitées, les cas d'hépatite E aiguë concernent plutôt l'adolescent et l'adulte jeune, avec une prédominance masculine. Plusieurs études ont décrit une fréquence et une gravité supérieures de l'infection par le VHE chez la femme enceinte. La létalité atteint 30% lorsque l'infection survient au cours du 3^{ème} trimestre (Beniwal et al., 2003; Kumar et al., 2004). Une étude menée en Inde suggère que le taux de mortalité observé en cas d'hépatite fulminante à VHE chez la femme enceinte est similaire à celui observé pour d'autres agents étiologiques. Cependant, l'incidence plus élevée des formes fulminantes chez la femme enceinte implique une mortalité globale plus élevée dans cette population par rapport aux femmes non enceintes et aux hommes (Bhatia et al., 2008). L'infection par le VHE lors de la grossesse est associée à des avortements spontanés plus fréquents, une plus grande mortalité intra-utérine, une prématurité des enfants, un petit poids de naissance et une plus grande mortalité périnatale (Khuroo et al., 2009; Patra et al., 2007). La surinfection par le VHE sur une hépatopathie existante peut entraîner une décompensation sévère se manifestant par une ascite et une encéphalopathie hépatique plus ou moins prononcée (Aggarwal, 2011). La surinfection conduit à une plus forte morbidité et mortalité (Hamid et al., 2002).

Dans les pays industrialisés, le VHE touche préférentiellement les hommes, à un âge plus avancé (>55 ans) (Mansuy et al., 2009a). Les formes sévères n'ont pas été décrites chez la femme enceinte. Comme dans les pays à ressources limitées, la surinfection par le VHE sur une hépatopathie existante peut conduire à une décompensation sévère avec un risque plus élevé de morbi-mortalité (Dalton et al., 2007b; Peron et al., 2007).

B. Hépatite chronique.

Des cas d'hépatite E chronique ont été décrits chez les patients immunodéprimés, notamment les patients transplantés d'organes solides (Gerolami et al., 2008; Kamar et al., 2008b), les patients infectés par le VIH avec un faible nombre de lymphocytes T CD4+ (Colson et al., 2011; Dalton et al., 2009; Kenfak-Foguena et al., 2011) ou les patients d'hématologie recevant une chimiothérapie (Ollier et al., 2009; Tavitian et al., 2010). Le passage à la chronicité est défini par la persistance du génome viral dans les prélèvements sanguins pendant plus de six mois. Cette durée pourrait être raccourcie à 3 mois étant donné qu'aucune éradication virale n'a été observée entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois post-infection (Kamar et al., 2013).

Chez les patients transplantés d'organes, environ 60% des patients infectés par le VHE développent une hépatite E chronique (Kamar et al., 2011). Dans une étude multicentrique, les 2 principaux facteurs de risques associés à l'évolution vers une hépatite chronique étaient l'utilisation du tacrolimus par rapport à la ciclosporine A et une numération plaquettaire plus faible (Kamar et al., 2011). Il semblerait également que l'utilisation du mycophénolate mofétil favorise l'élimination spontanée du virus chez les transplantés cardiaques (Pischke et al., 2012).

La persistance du VHE peut conduire à une progression plus rapide de la fibrose hépatique par rapport au VHC dans la même population (Gerolami et al., 2008; Kamar et al., 2008a; Legrand-Abrevanel et al., 2010). La transmission du virus via un greffon hépatique a récemment été rapportée. Elle a conduit à une hépatite chronique chez le receveur, une fibrose hépatique et à la mort du patient (Schlosser et al., 2011).

La réactivation du VHE a été suggérée par les équipes de le Coutre (le Coutre et al., 2009) et Versluis (Versluis et al., 2013). Dans l'étude de le Coutre et al., une virémie est réapparue 14 semaines après l'allogreffe chez un patient atteint d'une leucémie aiguë lymphoïde. Dans l'étude de Versluis, la virémie est réapparue 53 jours après l'allogreffe chez un

patient atteint d'une leucémie aiguë myéloïde. Les analyses phylogénétiques ont montré que les souches isolées au moment de la réactivation étaient identiques à celles identifiées avant l'allogreffe. Ces 2 études ne mentionnent cependant pas si le virus était encore détectable dans les selles au moment de la guérison apparente. De plus, les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur des fragments de taille restreinte (242 nt et 321 nt respectivement). Une étude menée sur 88 patients d'hématologie clinique n'a pas mis en évidence de réactivation dans les 6 mois suivant la greffe (Abravanel et al., 2012b). De même, aucune réactivation n'a été décrite dans l'année suivant la greffe hépatique ou rénale de 99 patients possédant des IgG anti-VHE en pré-greffe (Legrand-Abravanel et al., 2011). Si le phénomène de réactivation se confirme, il reste néanmoins exceptionnel et semble survenir peu de temps après la greffe. Les ré-infections semblent par contre plus fréquentes (Abravanel et al., 2012a).

C. Manifestations extra-hépatiques.

Des manifestations extra-hépatiques ont été décrites au cours d'une infection aiguë par le VHE, comme des thrombopénies (Colson et al., 2008; Singh et al., 2007; Thapa et al., 2009), des anémies hémolytiques (Abid et al., 2002), des polyarthrites (Serratrice et al., 2007), des pancréatites (Bhagat et al., 2008; Jain et al., 2007; Jaroszewicz et al., 2005) ou des glomérulonéphrites (Kamar et al., 2012). Des manifestations neurologiques ont également été décrites, comme un syndrome de Guillain-Barré (Kamani et al., 2005), une méningo-encéphalite (Loly et al., 2009) ou des névrites. Un syndrome pyramidal bilatéral associé à des neuropathies périphériques a été décrit chez un patient greffé rénal atteint d'une hépatite E chronique (Kamar et al., 2010b). Dans cette étude, l'analyse des séquences du virus dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien a montré une compartimentation de la quasi-espèce, suggérant l'émergence d'un variant neurotrope chez ce patient.

VI. Diagnostic.

Une hépatite aiguë doit être suspectée devant une élévation importante des transaminases associée ou non à la présence d'un ictère (Myara et al., 1998). Les tests sérologiques et moléculaires permettent de poser le diagnostic d'hépatite E. Compte tenu des connaissances épidémiologiques actuelles, la recherche des marqueurs du VHE doit être réalisée au même titre que celle des marqueurs du virus de l'hépatite A, du VHB ou du VHC.

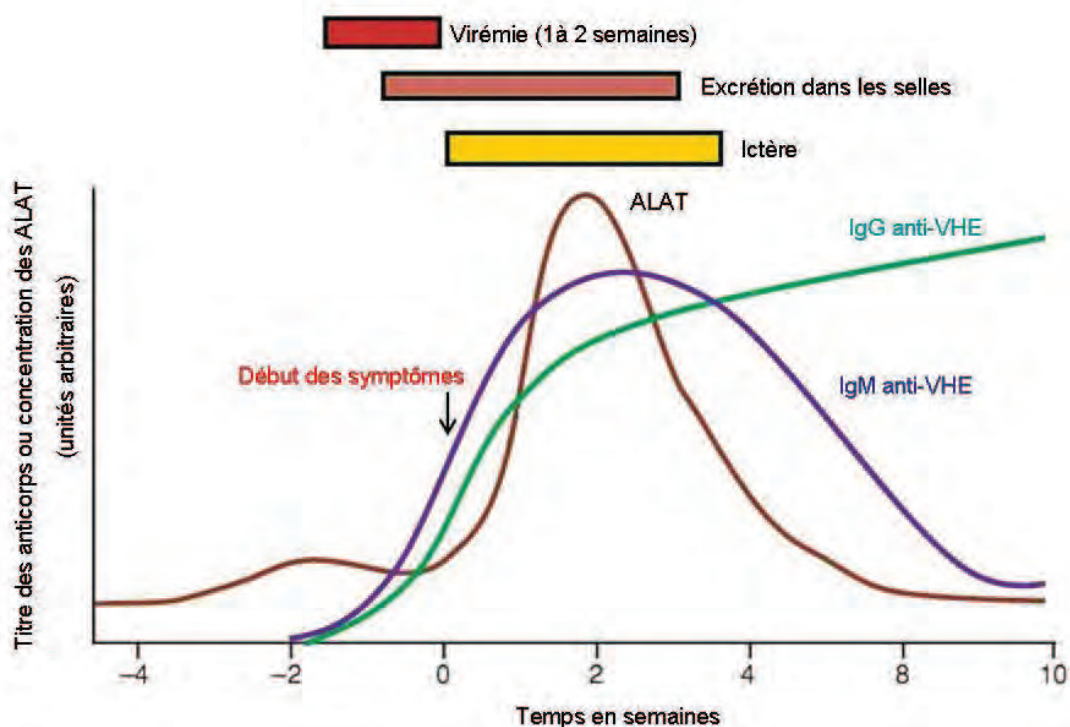


Figure 8 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution des alanine aminotransférases (ALAT) lors de l'infection par le VHE.

D'après Aggarwal et al., 2011.

La figure 8 présente la cinétique des marqueurs du VHE au cours de l'infection aiguë. Les IgM apparaissent précocement au début de la maladie et peuvent persister jusqu'à 32 semaines (Huang et al., 2010). Les IgG apparaissent peu de temps après les IgM et persistent habituellement plusieurs années (Khuroo et al., 1993). L'existence d'un seul sérotype permet l'utilisation de protéines isolées des génotypes 1 et 2 pour la recherche des anticorps anti-VHE (Emerson et al., 2001). Les antigènes utilisés sont issus d'ORF2 et ORF3. Une étude récente a comparé les performances de différentes trousse de détection des IgM : EIAgen HEV IgM

assay (Adaltis), HEV IgM ELISA 3.0 et Assure HEV IgM rapid test (MP Diagnostics). La sensibilité de ces 3 trousse était bonne (>82%) et la spécificité excellente (>99.5%) (Legrand-Abravanel et al., 2009b). La comparaison de la sensibilité et de la spécificité de 6 trousse de détection des IgM a montré de grandes disparités entre ces différents tests (Drobeniuc et al., 2001). Chez l'immunodéprimé, la concordance entre 2 trousse de détection (Adaltis et Wantai) était bonne (Rossi-Tamisier et al., 2013).

Plusieurs trousse permettent la détection des IgG avec des sensibilités inégales (Bendall et al., 2010; Wenzel et al., 2013). Les études réalisées indiquent une meilleure sensibilité de la trousse Wantai en raison d'une limite de détection des anticorps IgG plus faible (0,25 unité OMS/L contre 2,5 unités OMS/L pour les autres). Chez les donneurs de sang de Midi-Pyrénées, la séroprévalence était de 16,6% avec la trousse Genlabs Diagnostics ® HEV IgG ELISA (Mansuy et al., 2008) et de 52,5% avec la trousse Wantai (Mansuy et al., 2011).

L'ARN viral est présent dans le plasma et les selles des patients infectés. La phase virémique est généralement brève après le début des symptômes (en moyenne 2 semaines) mais peut atteindre 45 jours (Aggarwal et al., 2000). L'excrétion virale dans les selles peut durer 4 semaines après le début des symptômes (Aggarwal et al., 2000). La détection de l'ARN viral dans le plasma et les selles des patients infectés lors de la phase aiguë peut être réalisée par RT-PCR conventionnelle ou en temps réel. Une étude comparative incluant 20 laboratoires de 10 pays a montré que les performances étaient très différentes d'une technique à une autre, avec des variations de sensibilité d'un facteur 100 à 1000 (Baylis et al., 2011).

Une étude récente recommande l'usage de protocoles de RT-PCR ciblant la région ORF3 plutôt que la région ORF2 pour la quantification de l'ARN viral des souches de géotype 3 (Abravanel et al., 2012c). Des trousse commerciales de détection du VHE ciblant la région ORF3 sont désormais disponibles (Ceeram, Altona). Leurs performances sont tout à fait satisfaisantes (Abravanel et al., 2013).

Chez l'immunocompétent, la mise en évidence des IgM anti-VHE permet habituellement de poser le diagnostic d'hépatite E aiguë. La sensibilité des tests sérologiques étant moins bonne chez l'immunodéprimé, la recherche de l'ARN viral dans le plasma ou les selles est indispensable.

VII. Traitement.

Chez les patients développant une infection chronique, l'allègement du traitement immunosuppresseur, lorsque cela est possible, doit être envisagé en première intention. Il permet à lui seul l'éradication du virus dans 32% des cas (Kamar et al., 2010a). L'effet antiviral de l'IFN- α (Haagsma et al., 2010; Kamar et al., 2010c) et celui de la ribavirine (Kamar et al., 2010d) sur le VHE ont été démontrés. Cependant, l'IFN ne peut pas être utilisé après une transplantation de rein, de cœur ou de poumon car il augmente le risque de rejet aigu (Rostaing et al., 1995). Ainsi, compte tenu de son administration par voie orale, la ribavirine, administrée en monothérapie pendant 3 mois, apparaît comme la molécule de choix pour le traitement d'une hépatite E chronique. Le suivi virologique 3 mois après l'arrêt du traitement permet d'objectiver l'éradication du virus qui survient dans plus de 80% des cas. La ribavirine pourrait s'avérer utile au stade aigu en cas d'hépatite E sévère (Gerolami et al., 2011) ou en cas d'hépatopathie pré-existante (Peron et al., 2011).

VIII. Prévention.

A. Prévention non spécifique.

L'eau contaminée est à l'origine des épidémies liées au VHE dans les pays en développement. De même, il est reconnu que les porcs et d'autres animaux excrètent de grandes quantités de virus dans leurs fèces, posant ainsi un problème environnemental et de sécurité alimentaire.

1. Hygiène collective.

L'approvisionnement des réseaux hydriques avec une eau exempte de pathogènes devrait être mis en place pour limiter le risque d'exposition. De même, un système efficace de traitement des eaux usées contribuerait à limiter le risque d'épidémie dans les zones où le VHE est endémique.

2. Hygiène individuelle.

Les infections peuvent être réduites en améliorant les conditions sanitaires. Le lavage efficace des mains est la première mesure préventive à l'échelle individuelle. Limiter la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite constitue une autre mesure efficace. Une cuisson suffisante des aliments à risque ($>70^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 20 minutes) est conseillée (Barnaud et al., 2012; Colson et al., 2010; Emerson et al., 2005). Cette mesure s'adresse plus particulièrement aux personnes immunodéprimées et aux personnes ayant une hépatopathie sous-jacente.

B. Vaccin.

Un essai de phase II basé sur le vaccin candidat de la firme GSK a été conduit sur environ 2000 personnes (majoritairement des hommes) de l'armée népalaise (Shrestha et al., 2007). Le vaccin correspondait à une protéine tronquée de capsid. Après injection des 3 doses du vaccin, 3 personnes sur les 989 vaccinées ont présenté une hépatite E aiguë.

Une très grande étude de phase III basée sur le vaccin candidat VHE 239 (acides aminés 368 à 660 de la protéine de capsid) a été conduite chez plus de 100.000 individus des 2 sexes âgés de 16 à 65 ans, dans 11 villes d'une province de Chine entre août 2007 et juin 2009 (Zhu et al., 2010). La moitié a reçu 3 doses du vaccin à M0, M1 et M6 et l'autre moitié a reçu 3 doses du vaccin anti-VHB. Le vaccin anti-VHE a été bien toléré et aucun effet secondaire majeur n'a été noté. La protection a été de 100% après les 3 injections. Aucun cas d'hépatite E n'a été rapporté chez les patients vaccinés après 13 mois de suivi. Ce vaccin est actuellement commercialisé et disponible en Chine.

2ème partie : la quasi-espèce virale

I. Théorie de la quasi-espèce.

A. Définition.

Le concept de quasi-espèce a été introduit en virologie par Eigen et Schuster pour expliquer les capacités adaptatives des virus à ARN (Eigen, 1971). La quasi-espèce désigne une population de variants viraux présente chez un individu ou dans un environnement donné à un instant t . La quasi-espèce virale comprend un ou plusieurs variants majeurs, c'est-à-dire quantitativement prédominants, ainsi que des variants mineurs, représentant une proportion variable par rapport à l'ensemble de la population virale. Par définition, les variants viraux d'une quasi-espèce présentent entre eux au moins 90 % d'identité de séquence (Zein, 2000).

B. Mécanismes à l'origine de la variabilité génétique.

La grande variété de variants observée au cours de la réplication est principalement due aux erreurs commises par l'enzyme responsable de la réplication du génome des virus, la polymérase. Ainsi, un clone moléculairement bien défini utilisé comme matrice générera de nombreux variants suite à l'infection d'une cellule permissive. Cet ensemble représente la quasi-espèce et s'organise autour d'une séquence maîtresse (Biebricher et al., 2006). Les réplications successives donneront une distribution évolutive de mutants avec des variants plus éloignés les uns des autres dans l'espace des séquences (figure 9). La séquence consensus désigne la séquence dans laquelle chaque position représente la base ou l'acide aminé le plus fréquemment rencontré dans les variants composant la quasi-espèce.

Du fait de la redondance du code génétique, les mutations seront synonymes si elles n'entraînent pas de modification de l'acide aminé dans la séquence protéique. Les mutations non synonymes entraînent une modification de l'acide aminé et donc de la séquence protéique. Dans les 2 cas, le changement de nucléotide peut avoir un impact sur la structure secondaire de l'ADN ou de l'ARN génomique.

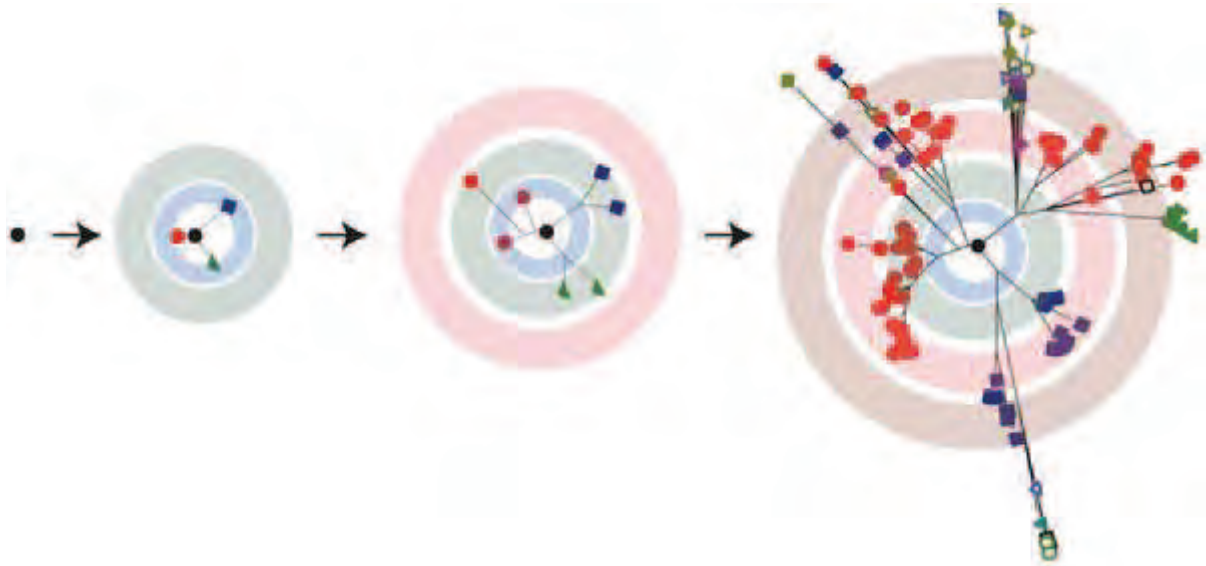


Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'une quasi-espèce virale à partir d'un génome matrice.

Le variant initial (rond noir), du fait des erreurs commises lors des cycles de réplication successifs, est à l'origine d'une quasi-espèce virale complexe après plusieurs cycles réplcatifs. Chaque branche représente deux variants liés par un point de mutation. Les cercles concentriques représentent les cycles de réplication successifs. Du fait de diverses contraintes, la quasi-espèce ne peut croître à l'infini. D'après Luring et al., 2010.

1. Mutations générées lors de la réplication.

Les ARN polymérases caractérisées jusqu'à présent ne possèdent pas d'activité exonucléase 3'-5', c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables d'exciser les nucléotides incorporés par erreur, entraînant un mésappariement à l'extrémité 3' en cours d'élongation. Le taux d'erreur intrinsèque, ou fidélité, de cette enzyme détermine le taux de mutation pour le virus. La polymérase des virus à ARN montre généralement un faible taux de fidélité avec un taux de mutation allant de 10^{-3} à 10^{-5} mutations par nucléotide copié, ce qui est plus élevé que celui observé pour les virus à ADN (10^{-5} à 10^{-8} mutations par nucléotide copié) (Drake et al., 1999; Holland et al., 1982).

2. Mutations générées en dehors de la réplication.

Il existe en marge des mutations répliquatives des mutations ne survenant pas lors de la réplication du génome. Par exemple, les protéines de la famille des cytidines déaminases sont connues pour leur fonction d'édition des acides nucléiques (Schaub et al., 2002), et constituent une partie des mécanismes innés de défense antivirale (Mangeat et al., 2003). Ainsi, la cytidine déaminase APOBEC3G catalyse la déamination de la cytidine en uridine sur le brin d'ADN négatif néosynthétisé au cours de la réplication du VIH (Lecossier et al., 2003). Cela conduit finalement à l'apparition de mutations de type G→A sur le brin d'ADN positif.

3. Recombinaisons.

Les phénomènes de recombinaisons constituent un mécanisme très répandu à l'origine des modifications du génome. Il en existe plusieurs types : homologue, non homologue, lors de la réplication ou en dehors (Chetverin et al., 2005; Gmyl et al., 2003). Dans les recombinaisons homologues, il existe une forte identité de séquence autour du site de recombinaison entre les 2 génomes, contrairement aux recombinaisons non homologues. Une forme commune de recombinaison homologue survenant lors de la réplication des virus à ADN ou ARN est le choix de copie (copy choice) ou le changement de matrice (template switching) : ce mécanisme implique le détachement de la polymérase associée au brin matrice en cours de synthèse vers la même position d'une autre matrice (figure 10). Ce mécanisme est caractérisé par la processivité de la polymérase (Nagy et al., 1997).

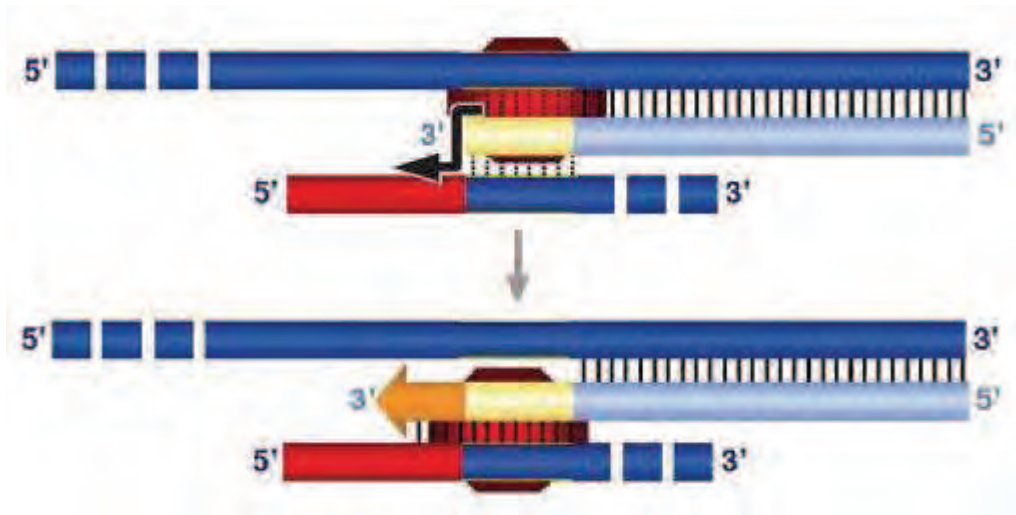


Figure 10 : Illustration du phénomène de changement de matrice.

La polymérase (hexagone rouge) se détache de la matrice initiale (brin du haut) pour s'attacher à une nouvelle matrice (brin du bas) et poursuivre l'élongation. D'après Enjuanes et al., 2006.

C. Limites de la quasi-espèce : seuil d'erreur et erreur catastrophique.

Les virus à ARN, du fait des erreurs commises lors de la réplication, présentent une grande variabilité. Cependant, les zones du génome correspondant à des fonctions essentielles pour le virus (domaines impliqués dans la traduction ou la réplication) ou présentant des contraintes structurales importantes (extrémités 5' et 3' non codantes) doivent être conservées (Bukh et al., 1992). La notion de seuil d'erreur traduit le fait qu'il existe un taux d'erreur maximum compatible avec le maintien de l'information génétique (Swetina et al., 1982). L'augmentation du taux d'erreur conduit à une plus grande production de particules défectives, entraînant une diminution brutale de la viabilité de la population : c'est l'erreur catastrophique (Eigen, 1971). Au delà du seuil d'erreur, l'équilibre de la quasi-espèce est bouleversé et l'information génétique disparaît.

Le taux d'erreur lors de la réplication est proche de ce seuil. Des études menées sur le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ont montré que des mutations chimiques réduisaient généralement l'infectivité (Lee et al., 1997). D'autres études menées sur le poliovirus ont montré que les analogues nucléosidiques mutagènes conduisaient à l'extinction de la population virale (Holland et al., 1990). Une augmentation du taux de mutation d'un facteur 4 conduit à une réduction de 95% du titre viral.

D. Sélection des variants de la quasi-espèce.

Les nouveaux variants générés sont ensuite sélectionnés en fonction de leur tropisme cellulaire, de leur capacité répliquative, ainsi que de la pression de sélection exercée par le système immunitaire et les éventuels traitements antiviraux. La fréquence d'un variant donné dans une population est donc étroitement liée à sa capacité à s'adapter à son environnement et à se reproduire, ce qui correspond à sa capacité adaptative.

1. L'effet goulot d'étranglement.

L'effet goulot d'étranglement (bottleneck effect) correspond à des événements entraînant une réduction du nombre de variants génétiques composant la quasi-espèce du fait de la disparition d'un grand nombre de variants. Par exemple, il a été montré que lors de la transmission du VHC à un nouvel hôte, seuls quelques variants parvenaient à coloniser le nouvel environnement (Bull et al., 2011).

2. Sélection lors de l'adaptation à un nouvel hôte.

À un instant donné, la quasi-espèce d'un patient infecté est en équilibre transitoire. La quasi-espèce se modifie en permanence pour s'adapter à l'environnement sous l'influence de pressions de sélection. Ces pressions induisent des modifications plus ou moins brutales de la composition de la quasi-espèce.

La sélection positive (ou évolution) est le processus au cours duquel une mutation devient dominante dans une population car elle confère un avantage (réplicatif, échappement...) aux variants qui la possèdent. La quasi-espèce s'enrichit donc des variants présentant cette mutation (figure 11).

La sélection négative (ou purificatrice) est le processus par lequel une mutation tend à être éliminée dans une population car elle confère un désavantage (perte de capacité répliquative...) aux variants qui la possèdent. Cependant, ce mode de sélection peut permettre le maintien de variants à un taux très minoritaire alors que l'on pourrait s'attendre à leur disparition complète (Perales et al., 2005).

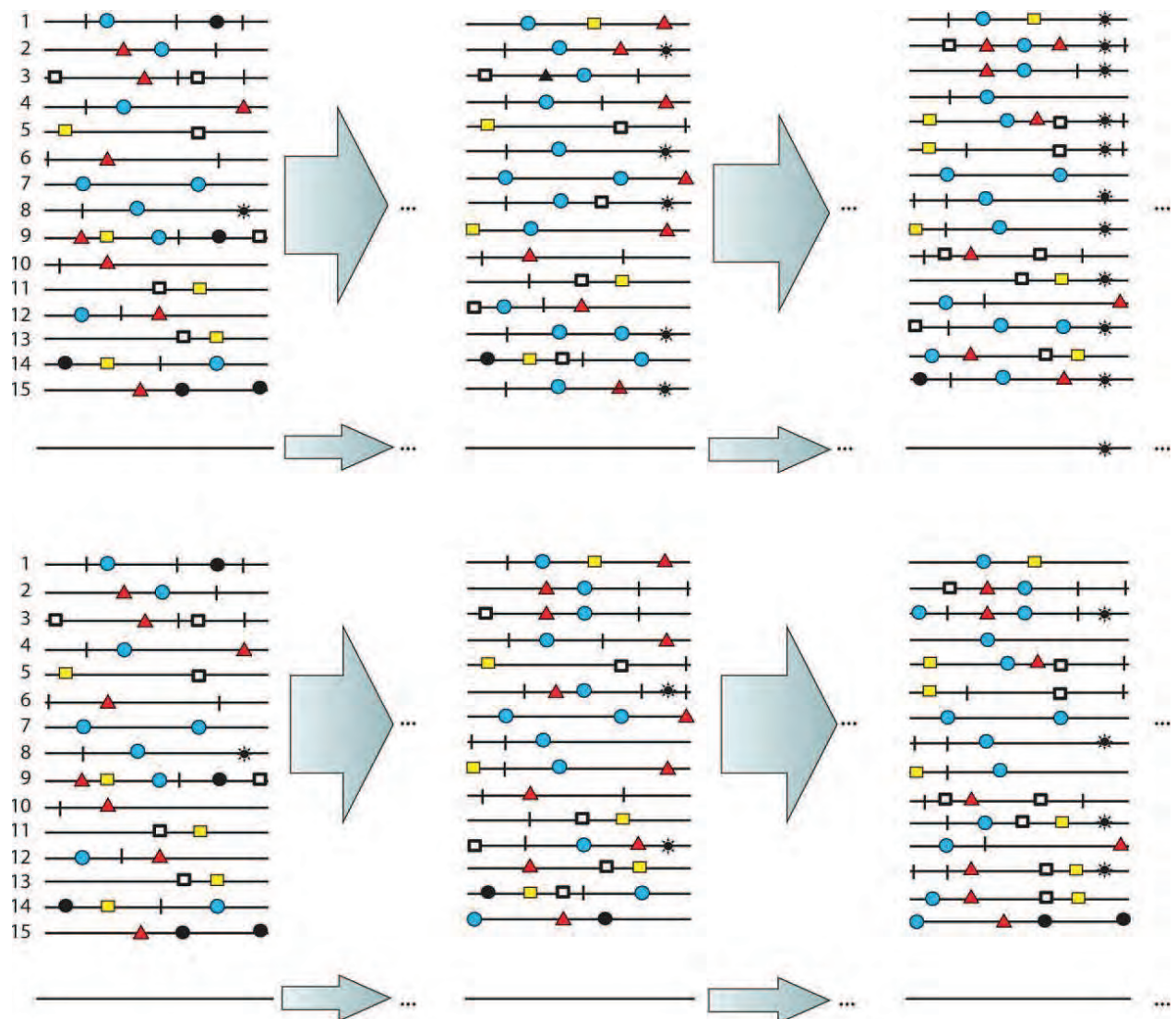


Figure 11 : Représentation schématique de la sélection d'une mutation conférant un avantage répliatif. Dans la partie haute de la figure, la mutation matérialisée par un astérisque dans le génome 8 confère un avantage sélectif. Cette mutation devient donc dominante dans les autres séquences et finit par apparaître dans la séquence consensus. Dans la partie basse de la figure, la même mutation présente sur le génome 8 donne un avantage répliatif modeste. Malgré l'augmentation de sa fréquence dans les autres génomes, elle ne devient pas dominante et n'apparaît donc pas dans la séquence consensus. D'après Domingo et al., 2012.

Ainsi, les variants composant une quasi-espèce donnée ne sont pas le simple reflet de l'accumulation des mutants générés durant le processus de réplication mais correspondent aux mutants produits et sélectionnés pour leur capacité adaptative. La combinaison des pressions de sélection crée de multiples goulots d'étranglement que la quasi-espèce fortement contrainte doit franchir pour survivre.

II. Principales caractéristiques de la quasi-espèce virale.

A. Survie de la quasi-espèce.

La survie d'une quasi-espèce est conditionnée par de nombreux facteurs comme la transmissibilité, le tropisme cellulaire ou la capacité d'échappement au système immunitaire. Ces paramètres doivent être pris en compte pour estimer la capacité adaptative globale dans un environnement donné (Domingo et al., 1997). Ainsi, si l'on représente la quasi-espèce dans un plan xy correspondant à l'espace des séquences associé à un axe z représentant la capacité adaptative, une population virale possédant une bonne capacité adaptative dans un environnement donné sera représentée par un pic haut et fin. Ce pic correspond à une faible diversité génétique et une capacité adaptative optimale (figure 12). Inversement, une population virale plus hétérogène et possédant une capacité adaptative moindre sera représentée par un pic moins haut et plus large (Wilke, 2005).



Figure 12 : Représentation schématique d'une quasi-espèce en fonction de son hétérogénéité et de sa capacité adaptative. La population 1 présente une bonne capacité adaptative mais la moindre mutation ou une modification de l'environnement entraîne une

perte de capacité adaptative. La population 2 est mutationnellement plus robuste car les mutations entraînent une perte mineure de capacité adaptative. D'après Lauring et al., 2010.

D'après la théorie de la quasi-espèce, ce sera la 2^{ème} population virale décrite qui aura le plus de chance de survivre au cours du temps. Cet effet est appelé la survie du plus plat et a notamment été observé dans le cas du VSV (Codoner et al., 2006; Wilke et al., 2001). En effet, une quasi-espèce « plate » évolue plus facilement car il n'y a pas de perte majeure de sa capacité adaptative. De plus, une quasi-espèce plate possède un grand répertoire de variants, augmentant ainsi la probabilité qu'au moins un variant soit capable de s'adapter à des changements survenant dans l'environnement. Par exemple, les arbovirus doivent s'adapter aux insectes et aux mammifères. Une quasi-espèce qui occupe une région plate et large dans l'espace des séquences pourra s'adapter à chacun des hôtes sans perte significative de sa capacité adaptative (Ciota et al., 2007).

B. Mémoire virale de la quasi-espèce.

Etant donné que la sélection positive entraîne la sélection d'une sous-population virale possédant un caractère avantageux, ce mode de sélection devrait augmenter la fréquence de ces variants au détriment des autres variants ne possédant pas ce caractère, et qui devraient disparaître. Des études menées sur le foot and mouth disease virus (FMDV) montrent que des sous-populations autrefois majoritaires dans un environnement donné, mais qui sont devenues minoritaires suite à des changements, n'étaient pas totalement éliminées de la quasi-espèce. Cette conservation a été appelée mémoire virale de la quasi-espèce et représente des variants autrefois majoritaires. Ces variants permettraient la reconquête rapide de cet ancien environnement s'il est à nouveau rencontré (Ruiz-Jarabo et al., 2000). Cela a été démontré *in vitro* par passage de mutants du virus de la fièvre aphteuse (Arias et al., 2004).

C. Notion de coopération.

Il existe un phénomène de coopération entre les variants d'une quasi-espèce. Dans le cas du virus de la poliomyélite, lorsqu'un variant neurotrope est introduit dans une population virale homogène possédant une polymérase haute fidélité, le variant est incapable d'atteindre le système nerveux central (SNC). Inversement, lorsqu'il était introduit dans une population

virale hétérogène, le variant est capable d'envahir le SNC (figure 13). Ces résultats suggèrent que la diversité de la quasi-espèce, plutôt que la sélection de variants individuels, est corrélée à une plus grande virulence (Vignuzzi et al., 2006).

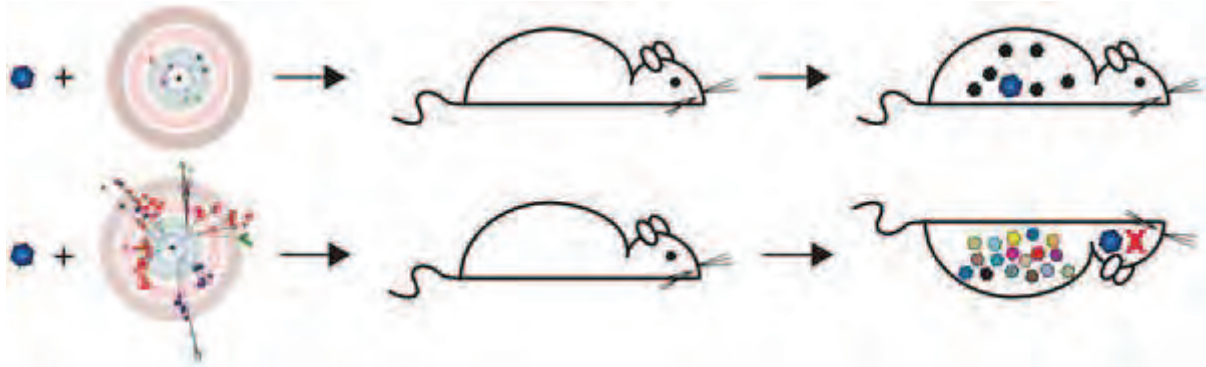


Figure 13 : Illustration du phénomène de coopération dans la quasi-espèce. Un variant neurotrope de poliovirus est isolé du cerveau d'une souris infectée par une souche sauvage. Des souris naïves ont été réinfectées avec ce clone (hexagone bleu) accompagné d'une quasi-espèce homogène (schéma du haut) ou hétérogène (schéma du bas). Bien que les 2 souris aient reçue le même clone, seule celle infectée avec une quasi-espèce hétérogène a développé la maladie. Les différentes sous-populations de la quasi-espèce ont coopéré avec le variant neurovirulent pour faciliter son entrée dans le SNC. D'après Vignuzzi et al., 2006.

D. Complémentation et défection : la quasi-espèce comme unité de sélection.

La complémentation est le processus par lequel un génome exprimant une protéine fonctionnelle peut favoriser la réplication d'un autre variant dont la protéine correspondante est défective (ou sub-optimale). L'interférence est l'inverse de la complémentation : la protéine défective gêne le fonctionnement de la protéine compétente (Gelderblom et al., 2008; Roux et al., 1991). Ces phénomènes ont lieu lorsque 2 variants différents infectent une même cellule.

III. Conséquences physiopathologiques de la distribution en quasi-espèce.

Les virus existant sous forme d'une quasi-espèce présentent un ensemble unique de défis pour l'hôte. Les variants peuvent différer entre eux par leurs propriétés biologiques comme la virulence, la capacité à échapper au système immunitaire, la résistance aux traitements antiviraux ou le tropisme pour certains tissus.

A. Compartimentation.

L'analyse de séquences virales isolées de différents compartiments de l'organisme (foie, sang périphérique, cellules mononucléées) a permis de démontrer la compartimentation de la quasi-espèce du VHC. L'existence de variants lymphotropes a été initialement évoquée devant la réplique préférentielle dans des lignées cellulaires d'origine lymphoïde de variants isolés de lymphocytes périphériques d'un chimpanzé infecté expérimentalement (Shimizu et al., 1997). Les variants présents dans le foie diffèrent de ceux circulant dans le sérum ou les cellules mononucléées du sang (Maggi et al., 1997).

B. Mutants d'échappement.

Les mutants d'échappement correspondent aux variants présents dans la population virale pouvant se multiplier malgré les contraintes de sélection entravant leur réplique. Ces contraintes peuvent être des antiviraux, les composants de l'immunité innée et adaptative, des ARNs interférents...

La fréquence des variants résistants aux médicaments est de 10^{-3} à 10^{-5} (Domingo, 1989). La notion de barrière génétique est essentielle pour comprendre l'apparition de mutants résistants. La barrière génétique d'un virus à un médicament décrit la capacité à sélectionner des virus résistants à celui-ci lorsque la réplique virale n'est pas contrôlée. Cela inclut plusieurs notions combinant : (1) le nombre de changement nucléotidique nécessaire pour obtenir une mutation de résistance, (2) l'impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'antirétroviral, (3) l'impact de cette mutation sur la capacité adaptative virale. L'ensemble conditionne la vitesse de sélection des variants résistants.

La réponse immune adaptative impose de nombreuses contraintes de sélection pour la réplication du virus, incluant les anticorps neutralisants et la réponse T qui élimine les cellules infectées. Les mutants d'échappement jouent vraisemblablement un rôle important dans le maintien de la persistance virale. L'échappement au système immunitaire est régi par les mêmes contraintes que l'échappement aux antiviraux : les mutants sélectionnés doivent présenter une capacité adaptative suffisante pour maintenir la persistance virale chez l'hôte (Aebischer et al., 1991).

C. Quasi-espèce et persistance virale.

Le rôle de la variabilité génétique du VHC paraît déterminant dans l'établissement de la persistance. Farci *et al.* ont montré que l'évolution de la quasi-espèce lors de la phase aiguë de l'hépatite C permettait de prédire l'évolution ultérieure de la maladie (Farci et al., 2000). Les malades infectés par une souche de VHC ayant une forte capacité à produire des variants viraux différents lors de l'infection aiguë seraient incapables d'éliminer le virus, à l'inverse de ceux chez lesquels la quasi-espèce évolue peu. Assurant une adaptation plus rapide du virus face aux contraintes liées à la réponse immunitaire, une augmentation de la diversité de la quasi-espèce au début de l'infection serait un facteur prédictif de l'établissement d'une persistance virale.

D. Quasi-espèce et progression de la maladie.

Chez les patients infectés par le VIH, des différences dans la vitesse de progression vers le stade SIDA ont été observées. Des études longitudinales portant sur l'évolution de la quasi-espèce du VIH chez les patients infectés ont montré qu'une diversification plus lente de la quasi-espèce était associée à une progression plus rapide vers le stade SIDA (Delwart et al., 1997).

Chez les patients chroniquement infectés par le VHC, il a également été mis en évidence une faible hétérogénéité de la quasi-espèce chez les patients ayant une progression plus rapide de la fibrose hépatique (Izopet et al., 2000; Sullivan et al., 2007).

E. Induction de l'erreur catastrophique comme stratégie antivirale.

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre I.3, l'une des conséquences de la dynamique de la quasi-espèce est l'existence d'un seuil d'erreur en relation avec le maintien de l'information génétique (Swetina et al., 1982). Lorsque ce seuil est dépassé, les séquences nucléotidiques perdent le contenu de leur information, ce qui correspond à l'enclenchement du processus d'erreur catastrophique (Eigen, 1971). L'utilisation d'agents mutagènes menant à l'erreur catastrophique est appelée mutagénèse létale (Anderson et al., 2004; Domingo et al., 2005).

L'un des mécanismes d'action supposé de la ribavirine pourrait reposer sur l'induction du processus d'erreur catastrophique (Crotty et al., 2001; Crotty et al., 2000). Certains travaux ont confirmé sur des modèles *in vivo* et *in vitro* que la ribavirine induisait une augmentation du taux de mutations dans les domaines codant les protéines NS5A et NS5B (RdRp) du VHC (Contreras et al., 2002; Hofmann et al., 2007). Ce mécanisme n'est cependant pas systématiquement retrouvé (Chevaliez et al., 2007).

IV. Etude de la quasi-espèce.

A. Méthodes d'analyse.

1. Méthodes ne reposant pas sur le séquençage.

L'étude du polymorphisme conformationnel simple brin (SSCP ou *single strand conformation polymorphism*) repose sur l'analyse de la différence de mobilité électrophorétique des ADN simple brin en fonction de leurs mutations nucléotidiques (Lopez-Labrador et al., 1999). La présence d'une variation de séquence (mutation, délétion, insertion) altère la conformation spatiale de l'ADN simple brin qui se traduit par une variation de migration en gel de polyacrylamide non dénaturant. Le nombre de bandes obtenues sur le gel est le reflet direct de la complexité génétique de la quasi-espèce. Généralement, le SSCP permet la détection des variants représentant 5 à 10% de la population virale, voire 2% quand les conditions sont optimisées (McKechnie et al., 2001).

La technique des hétéroduplexes (HGST ou *heteroduplex gel shift technology*) consiste à hybrider les produits d'amplification avec des amorces oligonucléotidiques. L'ADN double brin en présence d'un mésappariement subit une altération de sa conformation spatiale. La présence d'au moins 7 mésappariements entre 2 séquences de 500 paires de bases conditionne la formation d'un hétéroduplexe. Une diminution de la mobilité de l'hétéroduplexe par rapport à celle de l'homoduplexe est habituellement observée sur un gel d'acrylamide non dénaturant. Cette technique permettrait d'identifier les variants viraux représentant entre 1 à 5 % de la quasi-espèce (Barlow et al., 2000).

Ces techniques, rapides à mettre en œuvre, ne permettent pas d'identifier qualitativement les changements nucléotidiques, contrairement aux techniques basées sur le séquençage.

2. Séquençage par la méthode de Sanger après clonage ou dilutions limites.

L'étude d'une quasi-espèce par clonage et séquençage reste la référence pour décrire finement la composition d'une population virale donnée. Les clones sont obtenus à l'aide d'un vecteur ou par dilution limite (*single genome sequencing*) (Liu et al., 1996; Palmer et al., 2005; Simmonds et al., 1990). Un nombre suffisant de clones doit être analysé afin de représenter le plus fidèlement la population virale étudiée. Quarante clones permettent l'identification de

séquences représentant au moins 5 % de la population de la quasi-espèce et 20 clones permettent l'isolement de variants représentant au moins 10% de la population.

3. Séquençage haut-débit.

Les techniques de séquençage haut-débit constituent une méthode sensible permettant d'étudier un très grand nombre de clones (Loman et al., 2012) et devraient à terme remplacer les méthodes de séquençage par clonage ou dilution limite.

B. Analyses bioinformatiques des séquences de la quasi-espèce.

Le degré d'hétérogénéité au sein de la quasi-espèce peut être évalué en déterminant la complexité, la diversité et le nombre de mutations synonymes et non synonymes par site.

1. Complexité.

La complexité génétique désigne le nombre total de variants viraux identifiés (i.e. le nombre de séquence) dans un prélèvement. Le calcul de l'entropie de Shannon S permet d'estimer la complexité de la quasi-espèce infectant un patient donné. L'entropie est calculée par la formule $S = -\sum p_i \ln(p_i)$ où p_i représente la fréquence de chaque variant dans la quasi-espèce. L'entropie normalisée, S_n , se calcule avec la formule $S_n = S / \ln(N)$ où N correspond au nombre de séquences analysées (Wolinsky et al., 1996).

2. Diversité.

La diversité génétique définit la distance génétique moyenne entre les différents variants composant une quasi-espèce. Le modèle de Kimura 2 paramètres est fréquemment utilisé. Ce modèle affecte un coefficient différent dans la matrice de calcul selon qu'il s'agisse d'une mutation de transition (base purique → purique ou base pyrimidique → pyrimidique) ou de transversion (base purique → base pyrimidique et inversement) (Kimura, 1980).

3. Mutations synonymes, non synonymes et étude de la pression de sélection.

Les mutations synonymes (ou silencieuses) sont des mutations n'entraînant pas de changement de l'acide aminé, alors que les mutations non synonymes sont des mutations entraînant un changement d'acide aminé.

Pour évaluer le taux de mutations, on calcule classiquement le taux de substitutions synonymes par site de substitution synonyme (K_s) et celui de substitutions non synonymes par site de substitution non synonyme (K_a). L'utilisation du modèle de Nei et Gojobori 1986 est la plus répandue (Nei et al., 1986).

La pression de sélection exercée sur une quasi-espèce est étudiée en calculant le rapport K_a/K_s . Un K_a/K_s proche de 1 indique une sélection neutre (dérive). Si le rapport est inférieur à 1, il s'agit d'une pression de sélection négative (purification). S'il est supérieur à 1, il s'agit d'une pression de sélection positive (évolution) (Yang et al., 2000).

Objectifs du travail

La description des premiers cas d'hépatite E chronique en 2008 chez les patients transplantés d'organes solides a constitué un tournant décisif dans la connaissance du virus et de la pathogénèse. Il était en effet admis que l'infection par le virus de l'hépatite E était spontanément résolutive. De fait, les mécanismes de persistance du VHE chez l'immunodéprimé n'ont pas été étudiés. Identifier les facteurs virologiques et immunologiques impliqués dans la persistance du VHE et dans la progression de la fibrose chez les patients immunodéprimés contribuerait à une meilleure compréhension de la pathogénèse de l'hépatite E chez l'immunodéprimé. De même, lors d'une infection chronique, l'évolution du génome viral au cours du temps a été très peu documentée.

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes attachés à mieux caractériser les événements survenant au moment de la phase aiguë. Nous avons notamment étudié la quasi-espèce virale au niveau des domaines M et P de la capsidie afin de déterminer leur implication dans la persistance virale et dans la progression de la fibrose. Nous avons également étudié la sécrétion de cytokines/chimiokines au moment de la phase aiguë chez les patients éliminant spontanément le virus et chez les patients développant une infection chronique (**publication n°1 : Lhomme et al., J. Virol., 2012**). L'étude de la quasi-espèce à la phase aiguë a également été réalisée dans ORF1 au niveau des régions codant la région riche en proline et le macro domaine. En effet, ces régions pourraient jouer un rôle dans la pathogénèse (**publication n°2, Lhomme et al., J. Infect. Dis., 2013**).

La deuxième partie de notre travail a consisté à étudier l'évolution du génome du VHE chez un patient chroniquement infecté pendant une période de 4 années. Pour ce faire, un suivi longitudinal de la séquence consensus du virus a été réalisé. L'objectif était d'identifier les régions du génome où surviennent le plus grand nombre de mutations lors d'une infection prolongée. De plus, la description récente d'insertions de génome humain dans la région riche en proline nous a conduits à nous interroger sur la nature de cet événement :

-s'agit-il d'un événement systématique lors de la persistance virale ou bien s'agit-il d'un événement survenant de façon aléatoire ou sous certaines conditions ?

-les insertions sont-elles toutes de même nature ?

-les insertions sont-elles localisées au même endroit ?

-quels peuvent être les avantages pour le virus ?

(**publication n°3, Lhomme et al., soumis**).

Résultats

Partie I : étude de la quasi-espèce et de la sécrétion de cytokines/chimiokines lors de la phase aiguë et impact sur la fibrose hépatique.

Publication n°1: HEV Quasispecies and the Outcome of Acute Hepatitis E in Solid-Organ Transplant Patients.

Sébastien Lhomme, Florence Abravanel, Martine Dubois, Karine Sandres-Saune, Lionel Rostaing, Nassim Kamar and Jacques Izopet.

Journal of Virology, 2012, vol 86, p10006-10014.

Le virus de l'hépatite E peut être responsable d'une hépatite E chronique chez les patients transplantés d'organes solides. L'objectif de cette première étude a donc été de mieux caractériser les facteurs virologiques et immunologiques à la phase aiguë puis lors de la fibrose hépatique. La relation entre l'hétérogénéité de la quasi-espèce, la sécrétion de cytokines/chimiokines et l'évolution de la phase aiguë et de la fibrose a été étudiée.

Les virus présents chez huit patients ayant développé une infection chronique ont été comparés à un groupe de huit patients ayant éliminé le virus spontanément. L'hétérogénéité de la quasi-espèce virale présente chez chaque patient a été étudiée dans la région ORF2 codant pour les domaines M P de la protéine de capsid. Parmi les patients ayant développé une infection chronique, quatre ont présenté une évolution de leur fibrose hépatique (augmentation du score METAVIR d'au moins 2 unités entre les 2 biopsies) tandis que les quatre autres n'ont pas présenté d'évolution de la fibrose.

La complexité et la diversité de la quasi-espèce étaient plus élevées au niveau des domaines M et P de la capsid chez les patients développant une infection chronique comparativement aux patients éliminant spontanément le virus. La pression de sélection exercée sur la quasi-espèce virale au niveau du domaine M était également plus faible chez les patients développant une infection chronique. Les concentrations sériques de TNF- α et de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra), deux cytokines induites lors de l'inflammation, étaient plus faibles chez les patients développant une infection chronique. De plus, les concentrations sériques du récepteur soluble à l'IL-2 (sIL-2R), un marqueur d'activation des lymphocytes T, étaient également plus faibles chez les patients développant une infection

chronique. Les taux de sIL-2R étaient également positivement corrélés à l'activité des aminotransférases. Enfin, les concentrations sériques de chimiokines impliquées dans le recrutement hépatique des cellules effectrices étaient plus élevées chez les patients développant une infection chronique et inversement corrélées à la pression de sélection exercée sur le domaine M.

Concernant l'évolution de la fibrose hépatique chez les patients chroniquement infectés par le VHE, l'analyse longitudinale de la quasi-espèce a objectivé une plus faible diversification de la quasi-espèce lors de la 1^{ère} année chez les patients présentant une fibrose hépatique rapide.

Cette 1^{ère} étude a donc montré une plus grande hétérogénéité de la quasi-espèce, une pression de sélection plus faible sur le domaine M, une plus faible sécrétion de cytokines impliquées dans l'inflammation, une activation moindre des lymphocytes T et des concentrations sériques plus élevées de chimiokines chez les patients développant une infection chronique. La plus grande hétérogénéité de la quasi-espèce virale pourrait donc favoriser la persistance du VHE. Enfin, la faible diversification de la quasi-espèce lors de la 1^{ère} année d'infection semble associée à la progression de la fibrose.

Hepatitis E Virus Quasispecies and the Outcome of Acute Hepatitis E in Solid-Organ Transplant Patients

Sebastien Lhomme,^{a,b} Florence Abravanel,^{a,b} Martine Dubois,^{a,b} Karine Sandres-Saune,^{a,b} Lionel Rostaing,^{a,c} Nassim Kamar,^{a,c} and Jacques Izopet^{a,b}

INSERM, UMR1043, Toulouse, France^a; Department of Virology, CHU Purpan, Toulouse, France^b; and Department of Nephrology, Dialysis and Organ Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France^c

Hepatitis E virus (HEV) infections are responsible for chronic hepatitis in immunocompromised patients, and this can evolve to cirrhosis. Like all RNA viruses, HEV exists as a mixture of heterogeneous viruses defining quasispecies. The relationship between the genetic heterogeneity described as a quasispecies, cytokine secretion, and the outcome of acute hepatitis in immunocompromised patients remains to be elucidated. We cloned and sequenced the region encoding the M and P capsid domains of HEV from eight solid-organ transplant (SOT) patients with acute HEV infection who subsequently cleared the virus and from eight SOT patients whose infection became chronic. We analyzed the cytokines and chemokines in the sera of these SOT patients by multianalyte profiling. The nucleotide sequence entropy and genetic distances were greater in patients whose infections became chronic. A lower K_a/K_s ratio was associated with the persistence of HEV. The patients who developed chronic infection had lower serum concentrations of interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-2 receptor. Increased concentrations of the chemokines implicated in leukocyte recruitment to the liver were associated with persistent infection. Those patients with chronic HEV infection and progressing liver fibrosis had less quasispecies diversification during the first year than patients without liver fibrosis progression. Great quasispecies heterogeneity, a weak inflammatory response, and high serum concentrations of the chemokines involved in leukocyte recruitment to the liver in the acute phase were associated with persistent HEV infection. Slow quasispecies diversification during the first year was associated with rapidly developing liver fibrosis.

Hepatitis E virus (HEV) infections are a major cause of acute hepatitis in developing countries and are an emerging health problem in industrialized countries due to zoonotic transmission (6). HEV is a nonenveloped hepatotropic virus with an ~7.2-kb, single-stranded, positive-sense, 5'-capped RNA genome. It consists of short 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) and three partially overlapping open reading frames (ORFs), namely, ORF1, ORF2, and ORF3 (34). The capsid protein, encoded by ORF2, contains 3 linear domains: S, M, and P (10, 40, 41). Variations in the ORF2 domains could influence cellular or humoral immune responses. The M domain contains T cell epitopes (1). It is also a potential receptor binding site, as it contains a sequence that is strictly conserved among all genotypes (1, 10). The P domain forms dimeric spikes on the surface of the capsid (41) and contains neutralization epitopes (28, 30).

HEV infection is responsible for chronic hepatitis in solid-organ transplant (SOT) patients, and these infections can cause cirrhosis (8, 17, 18). The evolution of an HEV infection to chronicity seems to be related, at least in part, to the intensity of the immunosuppressive therapy used. Indeed, reducing the dose of immunosuppressant given to SOT patients can lead to clearance of the virus (14). The mechanisms responsible for persistence of the virus and for differences in the course of fibrosis during HEV infection are largely unknown but are thought to be a complex interplay between virus diversity and the host immune response. The simultaneous presence of several closely related virus variants that are commonly described as quasispecies (22) may enable the virus to circumvent diminished host immune defenses, leading to a chronic infection.

The host immune response to viruses involves the secretion of cytokines and chemokines to regulate innate or adaptive effector functions (9). Cytokines are secreted proteins that regulate the

immune response by modulating the activation, proliferation, and differentiation of targeted cells (4). Chemokines are chemotactic cytokines that regulate the recruitment of leukocytes (26). They play a crucial role in inflammatory processes and host defense (26). These molecules have emerged as key players in host defense mechanisms. Immunocompetent patients with acute hepatitis E have high concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β) in serum, suggesting that this cytokine is implicated in the disease (32). But little is known about the immune response and cytokine secretion in immunocompromised patients. However, it was shown recently that recovery from an HEV infection depends on the responses of multispecific T cells to HEV and the secretion of gamma interferon (IFN- γ) (33).

This study was designed to investigate SOT patients and determine the relationship between virus heterogeneity, host cytokine profiles, and the outcome of the acute phase of hepatitis E. We also monitored the relationship between quasispecies diversification in patients with chronic infection and the progression of liver fibrosis for a year.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples. We studied 16 SOT patients who underwent transplantation between January 2004 and June 2009 at the Toulouse University Hospital, France. We included 8 patients who cleared the virus within

Received 23 April 2012 Accepted 28 June 2012

Published ahead of print 3 July 2012

Address correspondence to Jacques Izopet, izopet.j@chu-toulouse.fr.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01003-12

TABLE 1 Features of hepatitis E virus-infected solid-organ transplant recipients in the acute phase^a

Patient parameter	Value		P value
	Patients without chronic infection (n = 8)	Patients with chronic infection (n = 8)	
Gender (no. of males/no. of females)	6/2	6/2	NS
Age (yr)	47 (32–58)	50 (42–55)	NS
No. of kidney transplant recipients/no. of liver transplant recipients	7/1	6/2	NS
No. of patients receiving drug			
Cyclosporine	3	0	NS
Tacrolimus	2	6	NS
m-TOR inhibitors	3	2	NS
MPA	5	6	NS
Steroids	6	5	NS
Azathioprine	0	1	NS
Time (mo) between transplantation and HEV infection	56.5 (36–94)	27.5 (20.5–60)	NS
HEV RNA concn (log copies/ml)	6.30 (6.22–6.72)	6.52 (5.73–7.01)	NS
No. of patients with HEV genotype 3c/3e/3f	0/1/7	1/0/7	NS
No. of patients positive for anti-HEV IgG/IgM	1/8	1/7	NS
Enzyme activity (IU/liter)			
ALT	259 (238–340)	157 (129–167)	0.03
AST	107 (89–173)	78 (57–108)	NS
γGT	280 (120–1,165)	118 (89–141)	NS
AP	410 (298–1,247)	258 (198–290)	NS
Total bilirubin (μmol/liter)	14 (12–43)	15 (13–18)	NS
Cell count (mm ⁻³)			
White blood cells	5,400 (4,845–8,255)	7,130 (4,630–7,260)	NS
Lymphocytes	1,337 (903–1,878)	1,042 (742–1,428)	NS
CD4 ⁺ cells	511 (317–765)	397 (282–683)	NS
CD8 ⁺ cells	434 (247–664)	445 (305–508)	NS
CD19 ⁺ cells	72 (37–135)	121 (28–208)	NS

^a Data are medians (interquartile ranges), unless otherwise indicated. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; γGT, γglutamyl transpeptidase; AP, alkaline phosphatase; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; MPA, mycophenolic acid; m-TOR, mammalian target of rapamycin; NS, not significant.

6 months following the acute phase and 8 patients who developed chronic HEV infection. An acute HEV infection was defined by elevated liver transaminase activity and the presence of HEV RNA in the plasma. A chronic infection was defined by the presence of HEV RNA in the plasma for more than 6 months. Other causes of hepatitis were excluded by serological and molecular tests for hepatitis A virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus (HCV), Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus. Drug-related causes of abnormal liver function test results were also ruled out by patient history. Serum samples were collected during the acute phase for all patients and 1 year later for patients whose infection had become chronic. Samples were stored frozen at -80°C .

Each patient underwent an exhaustive clinical and laboratory examination at the time of the acute phase. This included a clinical examination, examination of the immunosuppressive drugs used, and assessment of alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST, respectively), γ-glutamyl transpeptidase (γGT), and alkaline phosphatase (AP) activities. Serological analyses were performed with EIAgen HEV IgG and EIAgen HEV IgM kits (Adaltis, InGen, France) as recommended by the manufacturer. The serum concentration of HEV RNA was measured by real-time PCR as previously described (23). The genotype was determined by sequencing a 189-nucleotide fragment within the ORF2 gene (24). The sequences were compared to reference HEV strains (GenBank) as previously reported (24).

Those subjects whose acute hepatitis E resolved did not differ from those who developed chronic HEV infection in terms of age at HEV in-

fection, gender, immunosuppressive drugs used, HEV genotype, and serum HEV RNA concentration (Table 1). In contrast, the patients whose acute hepatitis was resolved had higher ALT activities.

The grade and stage of liver fibrosis were assessed according to the Metavir classification of liver biopsy specimens (3). The 8 patients who evolved to chronic HEV infection included 4 who had progressing liver fibrosis (fibrosers) with a 2-point increase of the Metavir score between the first and second biopsies, and 4 whose liver fibrosis had not progressed (nonfibrosers), defined by similar Metavir scores for the two biopsy specimens. The 2 groups did not differ in terms of age at HEV infection, gender, immunosuppressive drugs used, HEV genotype, and serum HEV RNA concentration.

Cloning and sequencing of ORF2. (i) HEV RNA extraction, HEV cDNA synthesis, and PCR. RNA was isolated and purified using a QIAamp viral RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). A reverse transcriptase PCR (RT-PCR) was used to amplify 1,100 nt of the ORF2 region encoding the M and P domains. The RT-PCR was performed with the SuperScript III OneStep RT-PCR system (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), with the following cycling conditions: 30 min at 50°C , 2 min at 94°C , and 50 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 55°C , and 2 min 30 s at 68°C . The primers used were 5'-GAGCTTGAATTYAGRAATTTGACCCC-3' for the ORF2 sense direction and 5'-TTTTTTTTTTTCCGGGGGRCGGMG RAACC-3' for the ORF2 antisense direction. PCR fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis and extracted using Qiaquick PCR

purification (Qiagen, Courtaboeuf, France) as specified by the manufacturer.

(ii) **Plasmid cloning.** The purified PCR products were quantified by spectrophotometry; 10 ng of cDNA was directly ligated into 10 ng of TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* competent cells according to the manufacturer's protocol, and transformants were grown on ampicillin plates. Twenty clones were randomly selected for sequencing. Template resampling was avoided because the number of original templates was far greater than the number of templates sequenced (25).

(iii) **Nucleotide sequencing.** The cDNAs of the 20 previously selected clones were amplified under the following conditions: 10 min at 94°C followed by 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 1 min 30 s at 68°C. The amplification was performed using the Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany). The primers used were for the ORF2 sense and antisense directions. The PCR products were extracted using Qiaquick PCR purification (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced on both strands by the dideoxy chain termination method (Prism Ready Reaction AmpliTaq Fs and dye deoxy primers; Applied Biosystems, Paris, France) on an ABI 3130XL high-throughput capillary DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The primers used were 5'-GAGCTTGAATTYAGRAATTTGACCC C-3' and 5'-GACAGAATTRATTTTCGTCCGGCTGG-3' for the ORF2 sense direction and 5'-CCCTTRTCCTGCTGNGCATTCTCGACAGA-3' for the ORF2 antisense direction. Electrophoregram data were analyzed using Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation).

(iv) **Calculation of genetic complexity and diversity.** Nucleotide sequences were aligned using Clustal X 1.83. We quantified the complexity of the HEV strain in the region of interest by calculating the Shannon entropy as follows: $S = -\sum p_i \ln(p_i)$, where p_i is the frequency of each sequence in the virus quasispecies (39). The normalized entropy, S_n , was calculated at the nucleotide level as follows: $S_n = S/\ln(N)$, where N is the total number of sequences analyzed. We quantified diversity as the mean genetic distance calculated for all pairs of nucleotide sequences, using MEGA 4.0.2 (21). The calculation was based on a Kimura two-parameter distance matrix. The mean and standard error of the mean (SEM) within-sample genetic distances were calculated for the acute-phase quasispecies in each of the 16 patients.

The rates of intrasample synonymous substitutions per synonymous site (K_s) and nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (K_a) were calculated by the method of Nei and Gojobori with the Jukes-Cantor correction for multiple substitutions (13), using MEGA 4.0.2 (21). The K_a/K_s ratio is an indicator of the strength of the positive (>1) or negative (<1) selection pressure on a quasispecies (42).

Multiplex cytokine analysis. A human cytokine 25-plex panel (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was used to analyze 25 cytokines, chemokines, and markers of T cell activation in serum samples according to the manufacturer's protocol. The samples were measured using the antibody bead mix in duplicate with a biotinylated detection antibody followed by streptavidin-phycoerythrin. This kit can quantify IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p40 and p70), IL-13, IL-15, IL-17, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IFN- α , IFN- γ , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), soluble IL-2 receptor (sIL-2R), and the following chemokines: CXCL8, interferon-inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), monokine induced by gamma interferon (MIG), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and eotaxin.

The plate was read with a Luminex 200 instrumentation system (Luminex Corporation, Austin, TX). Data were collected for 100 beads per cytokine from each well. The raw data (mean fluorescence intensities) were processed with Xponent 3.1 software (Xmap technology; Luminex) to obtain concentrations.

Statistical analysis. All statistical calculations were performed using Stata software (version 9.2; Stata Corp.). The characteristics of individuals

were compared using Fisher's exact test for categorical variables (type of immunosuppressive treatments, presence of anti-HEV IgM and IgG). The Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables, including genetic parameters. *P* values of <0.05 were considered statistically significant. When sample sizes were smaller than 5, no statistical analysis was performed. Correlations between quantities of cytokines and AST/ALT activities or K_a/K_s ratios were estimated by calculating Spearman's rank correlation coefficient.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers JQ763600 to JQ764559.

RESULTS

Analysis of HEV quasispecies and relationship to the outcome of acute infection. The distribution of HEV quasispecies during the acute phase of HEV infection was analyzed by cloning of an ORF2 fragment encoding the M and P domains of the capsid protein.

The nucleotide sequence entropy (complexity) of the region encoding the M domain was higher in patients whose infection became chronic (median [interquartile range], 0.62 [0.46 to 0.66]) than in patients who cleared the virus (0.34 [0.28 to 0.45]; *P* = 0.04). The complexity of the region encoding the P domain was also higher in patients whose infection became chronic (0.77 [0.71 to 0.86]) than in patients who cleared the virus (0.58 [0.38 to 0.73]) (*P* = 0.03) (Fig. 1A).

The mean within-sample genetic distance (diversity) of the region encoding the M domain was greater for the 8 chronically infected patients (0.0039 [0.0025 to 0.0050]) than for the patients who cleared the virus (0.0016 [0.0013 to 0.0025]) (*P* = 0.03). The diversity of the region of the virus genome encoding the P domain was also greater in the 8 chronically infected patients (0.0039 [0.0030 to 0.0050]) than in the patients who cleared the virus (0.0020 [0.0015 to 0.0026]) (*P* = 0.02) (Fig. 1B).

The K_a/K_s ratio of the M domain was lower for the patients whose hepatitis became chronic (0.18 [0.12 to 0.29]) than for the patients who cleared the virus (0.44 [0.34 to 0.58]) (*P* = 0.03), but the K_a/K_s ratios of the P domain of the viruses in the 2 groups were not different for patients whose infection became chronic and those who cleared the virus (0.20 [0.15 to 0.29] versus 0.28 [0.23 to 0.32]) (*P* = 0.46) (Fig. 1C).

Levels of cytokines, markers of T cell activation, and chemokines and relationship to the acute-phase outcome. We compared the concentrations of cytokines and chemokines in the patients who cleared the virus and those whose HEV infection became chronic (Table 2). Two cytokines (IFN- γ and IL-2) whose concentrations in 80% or more of the samples were below the limit of detection were removed from this analysis.

We first examined the cytokines involved in inflammation. The IL-1Ra concentration was higher in patients who cleared the virus than in those whose infection became chronic (*P* = 0.05) (Fig. 2A). In addition, the TNF- α concentration tended to be higher in patients who cleared the virus (*P* = 0.07) (Fig. 2B). The concentrations of the other inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL-17) and of IFN- α in patients who cleared the virus and those whose infection became chronic were similar.

The concentrations of Th1 (IL-12) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13) cytokines in patients who cleared the virus and those whose infection became chronic were similar. The concentrations of cytokines implicated in cell differentiation and survival (IL-7, IL-15, and GM-CSF) in the 2 groups were also similar (Table 2).

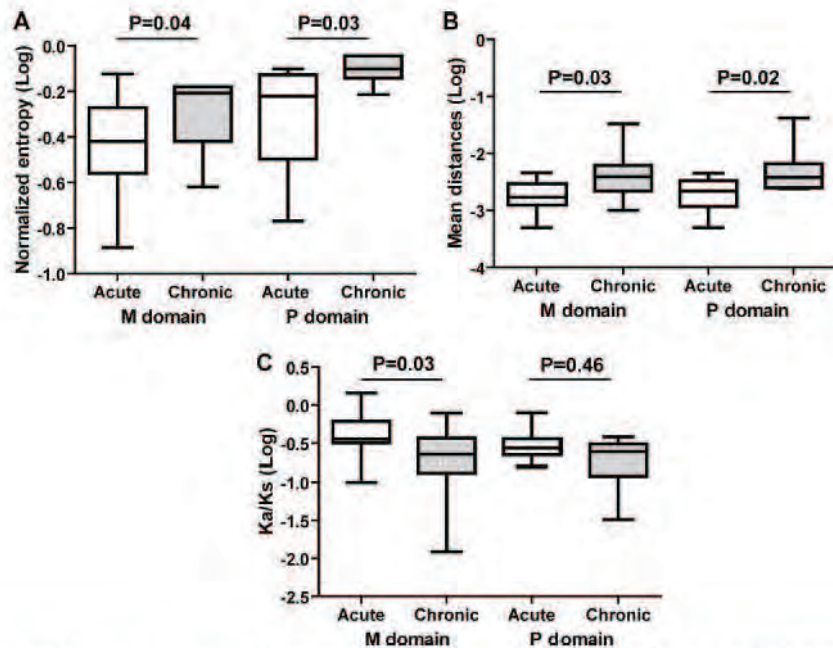


FIG 1 Box plot representation of quasispecies parameters for patients who did or did not develop chronic HEV infection. White boxes, acute infection (patients who cleared the virus); gray boxes, chronic infection (patients with chronic infection). (A) Mean values for nucleotide entropy (complexity); (B) mean values for nucleotide genetic distance (diversity); (C) mean values for K_a/K_s ratio. The Mann-Whitney test was used to compare differences between the 2 groups.

The concentration of sIL-2R, a marker of T cell activation, was higher in patients who cleared the virus than in those whose infection became chronic ($P = 0.05$) (Fig. 2C). The concentration of sIL-2R was positively correlated with the activities of AST ($r = 0.52$; $P = 0.04$) and ALT ($r = 0.51$; $P = 0.04$) (Fig. 3A and B), but there was no correlation between the sIL-2R concentration and the K_a/K_s ratios of the M and P capsid domains.

The concentrations of the chemokines RANTES, MIP-1 β , MCP-1, and CXCL8 were higher in patients whose HEV infection became chronic ($P = 0.02, 0.04, 0.01, \text{ and } 0.02$, respectively) (Fig. 2D, F, G, and H). The concentration of MIP-1 α tended to be higher in patients whose infection became chronic ($P = 0.07$) (Fig. 2E). We found no correlation between the concentrations of RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, and CXCL-8 and the AST/ALT activities or the K_a/K_s ratio of the P domain. In contrast, the concentrations of these 5 chemokines were negatively correlated with the K_a/K_s ratio of the M domain (Fig. 4). The concentrations of the other chemokines (MIG, IP-10, and eotaxin) were similar in the 2 groups.

Analysis of HEV quasispecies and relationship with progressing liver fibrosis. Four of the 8 patients who developed chronic HEV infection had progressing liver fibrosis (fibrosers), and 4 did not (nonfibrosers).

During the acute phase, the K_a/K_s ratio of the M domain of virus in the nonfibrosers (0.25 [0.14 to 0.47]) was similar to that of virus in the fibrosers (0.16 [0.078 to 0.23]), and the same was true for the P domain (0.27 [0.21 to 0.29] in nonfibrosers and 0.16 [0.12 to 0.21] in fibrosers).

One year after the acute phase, the K_a/K_s ratios of the M domain of virus in the nonfibrosers (0.12 [0.05 to 0.20]) and fibrosers (0.20 [0.13 to 0.27]) were similar. The K_a/K_s ratios of the P

domain of virus in the nonfibrosers (0.31 [0.23 to 0.41]) and fibrosers (0.16 [0.14 to 0.20]) were also similar.

We studied the intersample virus diversification (rK_a/K_s) during 1 year after the acute phase. The diversification of the M domain in nonfibrosers (0.16 [0.14 to 0.20]) and fibrosers (0.13 [0.08 to 0.19]) were similar. In contrast, the diversification of the P domain in nonfibrosers (0.29 [0.23 to 0.40]) seemed greater than that in fibrosers (0.11 [0.08 to 0.16]), although the small number of patients precluded statistical analysis (Fig. 5).

DISCUSSION

It was shown recently that hepatitis E virus can lead to chronic infection in SOT patients, but the virological and immunological factors associated with viral persistence have not yet been elucidated. This study examines the relationship between the heterogeneity of HEV quasispecies, the secretion of various cytokines and chemokines, and the outcome of acute hepatitis.

In the acute phase, the complexity and diversity of the region encoding the M and P capsid domains of the virus were greater in immunocompromised patients who developed chronic infection than in patients who cleared the virus. The great genetic heterogeneity of virus in patients with persistent hepatitis could reflect changes in the host environment, such as the appearance of neutralizing antibodies or intrahepatic cytotoxic T lymphocytes. Viruses with an enhanced ability to persist could emerge under these selective constraints. Similar results have been described for hepatitis C virus quasispecies, where increased diversity in hypervariable region 1 during acute infection was associated with progression to a chronic infection (7).

The K_a/K_s ratio of the virus M domain was lower in patients who developed chronic infection than in those who cleared the

TABLE 2 Serum cytokine concentrations during the acute phase in patients who cleared the virus and patients who developed chronic infection^d

Cytokine or chemokine	Concn (pg/ml)		P value
	Patients without chronic HEV infection (n = 8)	Patients with chronic HEV infection (n = 8)	
Inflammatory cytokines			
IL-1Ra	1,463.9 (1,313.2–1,637.6)	1,067.1 (885.3–1,237.0)	0.05
TNF- α	37.8 (28.6–52.7)	23.7 (22.5–29.8)	0.07
IL-1 β	37.9 (15.1–70.1)	31.9 (14.7–44.3)	NS
IL-6	21.5 (19.4–41.1)	24.9 (18.3–27.2)	NS
IL-17	82.8 (73.5–101.4)	95.8 (63.8–131.4)	NS
IFN- α	212.9 (196.5–249.1)	252.9 (220.5–288.9)	NS
Th1/Th2 cytokines			
IL-12	538.1 (473.3–668.1)	522.9 (504.7–578.1)	NS
IL-4	14.9 (9.4–33.1)	13.2 (10.9–27.2)	NS
IL-5	4.4 (4.3–6.6)	8 (4.2–11.1)	NS
IL-10	21.1 (12.8–30.1)	21.1 (20.0–42.9)	NS
IL-13	51.7 (28.8–185.9)	72.9 (52.3–95.4)	NS
Growth and cellular cytokines			
IL-7	55.1 (47.2–79.3)	93 (60.3–128.2)	NS
IL-15	91.5 (69.8–113.0)	117 (106.5–148.8)	NS
GM-CSF	80.5 (20.0–193.2)	26.5 (20.0–58.0)	NS
Marker of T cell activation			
sIL-2R	957.7 (717.5–1116.8)	391.5 (272.0–788.0)	0.05
Chemokines			
RANTES	6,500.4 (5,019–8,334.5)	11,800 (10,056.2–13,055.0)	0.02
MIP-1 α	129.1 (117.0–160.3)	181.2 (135.3–330.2)	0.07
MIP-1 β	146.7 (96.3–216.7)	248.8 (210.1–306.5)	0.04
MCP-1	547.9 (484.5–702.1)	1,210.8 (966.3–1,879.0)	0.01
CXCL8	30.9 (21.0–143.7)	226.9 (146.5–404.2)	0.02
MIG	398.4 (304.6–505.6)	209 (160.2–309.0)	NS
IP-10	283.6 (261.3–341.5)	353 (142.1–568.6)	NS
Eotaxin	397.4 (373.5–472.0)	528.2 (446.8–675.7)	NS

^d Data are medians (interquartile ranges). GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- α , alpha interferon; IFN- γ , gamma interferon; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; sIL-2R, soluble IL-2 receptor; IP-10, interferon-inducible protein 10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIG, monokine induced by interferon gamma; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein 1 α ; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein 1 β ; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted.

virus. Both K_p/K_s ratios were negative, so in patients who developed a chronic HEV infection, the negative selection was stronger. Negative selection promotes conservation of the amino acid sequence; thus, development of a chronic infection is associated with conservation of the amino acid sequence of the M domain. The M domain contains T cell epitopes (1). Thus, the immune pressure mediated by T cells could explain the difference in selection, since the T cell response determines HEV eradication (33). An effective immune response should lead to less conservation of amino acid sequences, which is in line with our observations. The K_p/K_s ratios of the P domain of virus in the 2 groups of patients were similar, perhaps due to the limited number of patients included in our study. Alternatively, the P capsid domain, which is a B cell epitope (28, 30), could not be the key epitope for virus clearance.

We investigated the role of cytokines in the clearance of HEV by comparing the acute-phase serum cytokine profiles of the patients who cleared the virus and those who developed chronic infection. The concentrations of two cytokines produced during the inflammatory process were lower in patients whose HEV infection became chronic than in those who cleared the virus. Lower

circulating concentrations of cytokines may reflect a weaker inflammatory response in these patients. IL-1Ra is produced during inflammation. It binds competitively to the IL-1 receptor without activating the IL-1 signaling pathway, thus attenuating the effect of IL-1 (2). IL-1Ra also stimulates IFN- λ 1 (IL-29) production by plasmacytoid dendritic cells (27). IFN- λ 1 contributes to the antiviral defenses by stimulating the synthesis of 2'-to-5' oligoadenylate synthase (OAS) and MxA (20). Thus, a lower IL-1Ra concentration could weaken the anti-HEV defenses by diminishing IFN- λ 1 secretion. TNF- α is also a key cytokine in inflammation, as it can recruit and activate macrophages, NK cells, and T cells (36). A tendency to lower the TNF- α concentration could weaken the host's anti-HEV defenses by impairing effector recruitment.

The concentration of sIL-2R, which is a marker of the activation of T lymphocytes (31), was also lower in the patients who developed a chronic infection. Thus, HEV is likely to persist in patients who have fewer activated T cells. This may be due to immunosuppressive therapy, which interferes with T cell activation or proliferation (11). The amount of circulating sIL-2R was also positively correlated with the activities of ALT and AST. Higher ALT/AST activities have been reported for patients who

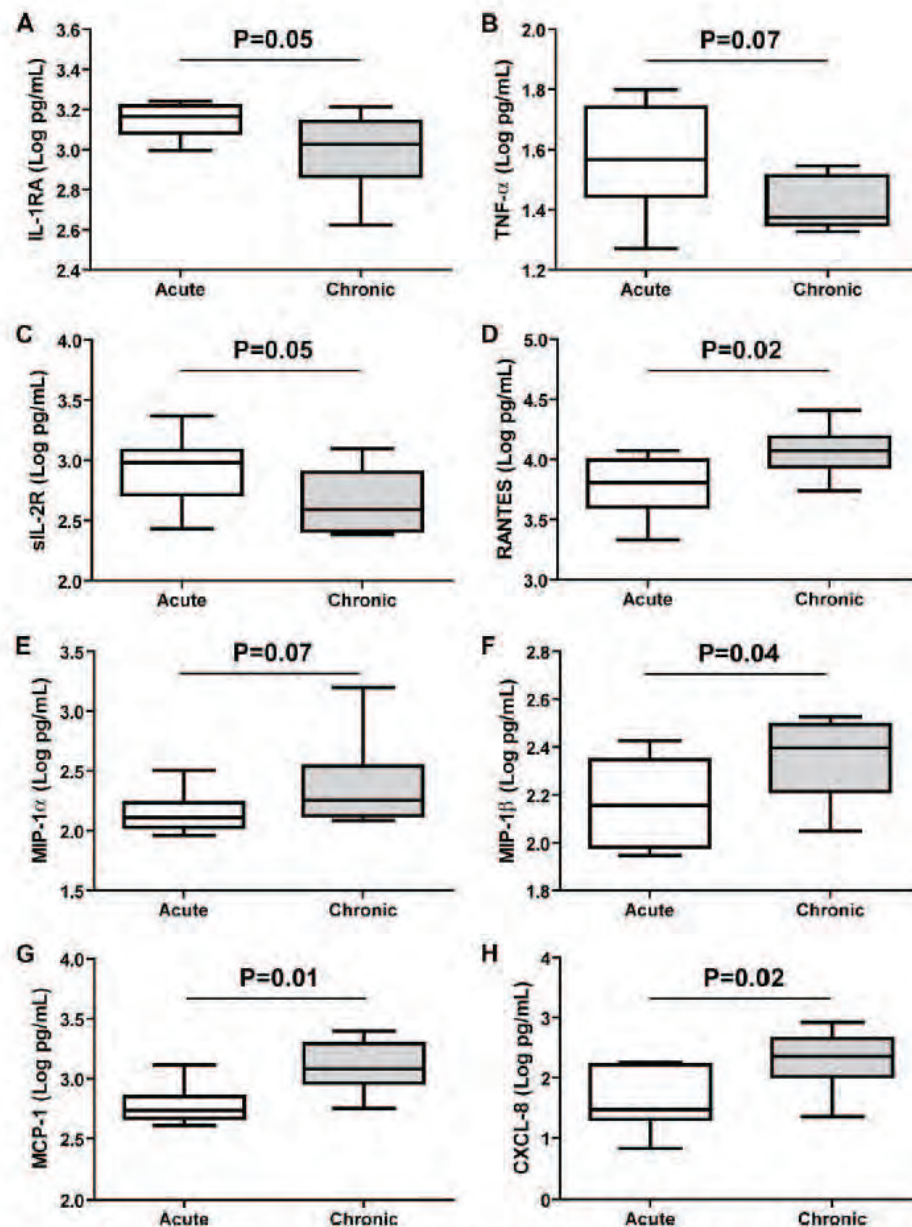


FIG 2 Box plot representation of cytokine/chemokine concentrations in patients who did and did not develop chronic HEV infection. White boxes, acute infection (patients who cleared the virus); gray boxes, chronic infection (patients with chronic infection). (A) IL-1Ra; (B) TNF- α ; (C) sIL-2R; (D) RANTES; (E) MIP-1 α ; (F) MIP-1 β ; (G) MCP-1; (H) CXCL8. The Mann-Whitney test was used to compare differences between the 2 groups.

cleared the virus (23). Since the virus is not cytolytic, the elimination of infected hepatocytes may depend on the degree of T cell activation. Patients who cleared their HEV infection after transplantation have been found to have a strong, HEV-specific T cell response (33).

We found that the serum concentrations of five chemokines were higher in those patients whose HEV infection became chronic. This indicates that the persistence of HEV is associated with high concentrations of chemokines. RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β can recruit T cells bearing CCR5 chemokine receptors to an inflamed liver (5). The involvement of CCR5⁺ cells in the

pathogenesis of hepatitis E was suggested recently (37). MCP-1 promotes the recruitment of monocytes and macrophages to the liver via the CCR2 chemokine receptor (38). CXCL8, a CXCR1 ligand, may be important for recruiting neutrophils (35). CXCL8 also inhibits the antiviral action of IFN- α (19), thus impairing the host's antiviral defenses. It may appear counterintuitive that high serum concentrations of chemokines are negative prognostic markers of viral clearance. Chemokines are supposed to recruit activated lymphocytes to the liver, but high chemokine concentrations during the acute phase of infection may lead to the down-regulation of the chemokine receptors on T cells by molecule in-

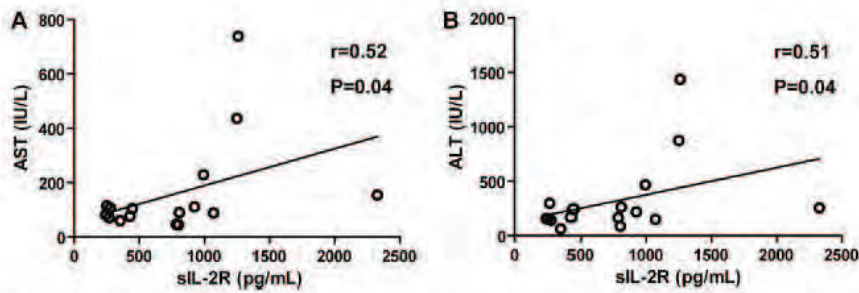


FIG 3 Correlation between sIL-2R concentrations and AST/ALT activities. Correlations were estimated by calculating Spearman's rank correlation coefficient.

ternalization. This could impair specific T cell migration during a primary infection, thus impairing HEV clearance. Finally, the circulating chemokine concentrations were negatively correlated with the K_{α}/K_{β} ratio of the M domain. High chemokine concentrations are associated with low K_{α}/K_{β} ratios, which is in line with our observations on the patients who developed chronic infection.

However, one limitation of our study is that we compared many parameters, so the false discovery rate cannot be excluded as a factor.

High concentrations of chemokines during the acute phase may be the first step toward the persistence of an HEV infection, but this relationship needs further investigation. A study of the T

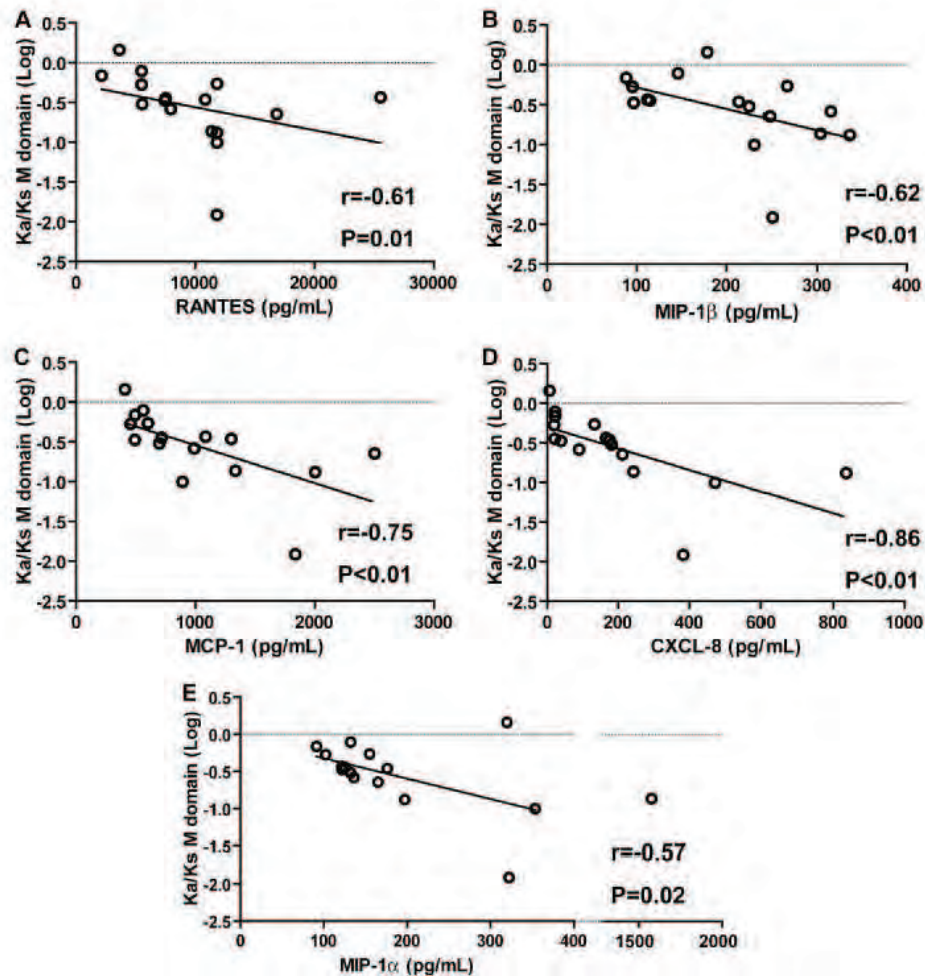


FIG 4 Correlation between chemokine concentrations and K_{α}/K_{β} ratios of the M domain. (A) RANTES; (B) MIP-1 β ; (C) MCP-1; (D) CXCL8; (E) MIP-1 α . Correlations were estimated by calculating Spearman's rank correlation coefficient.

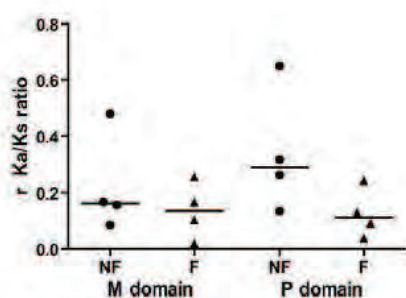


FIG 5 Scatterplot representation of quasispecies diversification in patients who did and did not develop liver fibrosis. ●, patients without progressing liver fibrosis (NF); ▲, patients with progressing liver fibrosis (F).

cells invading the liver during the acute phase of infection could confirm the hypothesis of impaired recruitment, since activated CD8⁺ T cells were found recently in liver biopsy specimens from HEV-infected patients (29).

Four of the patients whose HEV infection became chronic developed liver fibrosis (fibrosers), while four did not (nonfibrosers). The diversification of the P capsid domain (rK_a/K_s ratio) seemed to be lower in the fibrosers than in the nonfibrosers. Thus, the slow diversification of the P capsid domain seems to be associated with progression to liver fibrosis. A study including more patients is needed to confirm these data. In patients chronically infected with HCV, the progression of liver fibrosis was significantly associated with slower HVR-1 diversification. This could indicate the selection of more aggressive variants in fibrosers (12).

Our study was focused on HEV quasispecies and cytokines/chemokines in immunocompromised patients. A compartmentalization of HEV variants in blood and cerebrospinal fluid has been reported for a kidney transplant patient with chronic hepatitis and neurological symptoms (16). Similar investigations could be relevant for immunocompetent patients experiencing resolutive infection or for patients with severe hepatitis E during pregnancy in developing countries or in the context of preexisting chronic liver disease (15).

We concluded that quasispecies heterogeneity in the region encoding the M and P capsid domains during the acute phase of infection is associated with the development of chronic HEV infection. Moreover, the production of low concentrations of inflammatory cytokines and a soluble marker of T cell activation and the synthesis of high concentrations of chemokines during the acute phase seem to be critical for the persistence of HEV infection. Finally, we found that low quasispecies diversification during the first year seems to be associated with the rapid progression of fibrosis.

REFERENCES

- Aggarwal R, et al. 2007. T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *J. Viral Hepat.* 14:283–292.
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* 16:27–55.
- Bedossa P, Poynard T. 1996. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 24:289–293.
- Borish LC, Steinke JW. 2003. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:S460–S475.
- Cook DN, et al. 1995. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 269:1583–1585.
- Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. 2008. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 8:698–709.
- Farci P, et al. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288:339–344.
- Gerolami R, Moal V, Colson P. 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* 358:859–860.
- Guidotti LG, Chisari FV. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 19:65–91.
- Guu TS, et al. 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:12992–12997.
- Hong JC, Kahan BD. 2000. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future. *Semin. Nephrol.* 20:108–125.
- Izopet J, et al. 2000. Longitudinal analysis of hepatitis C virus replication and liver fibrosis progression in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 181:852–858.
- Jukes TH, Cantor TR. 1969. Evolution of protein molecules, p 21–132. *In* Munro IHN (ed), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, Inc, New York, NY.
- Kamar N, et al. 2010. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 89:353–360.
- Kamar N, et al. 2012. Hepatitis E. *Lancet* 379:2477–2488.
- Kamar N, et al. 2010. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am. J. Transplant.* 10:1321–1324.
- Kamar N, et al. 2008. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 8:1744–1748.
- Kamar N, et al. 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 358:811–817.
- Khabar KS, et al. 1997. The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *J. Exp. Med.* 186:1077–1085.
- Kotenko SV, et al. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69–77.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10:189–191.
- Lauring AS, Andino R. 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 6:e1001005. doi:10.1371/journal.ppat.1001005.
- Legrand-Abravanel F, et al. 2010. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J. Infect. Dis.* 202:835–844.
- Legrand-Abravanel F, et al. 2009. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg. Infect. Dis.* 15:110–114.
- Liu SL, et al. 1996. HIV quasispecies and resampling. *Science* 273:415–416.
- Luster AD. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338:436–445.
- Megjugorac NJ, Gallagher GE, Gallagher G. 2010. IL-4 enhances IFN-lambda1 (IL-29) production by plasmacytoid DCs via monocyte secretion of IL-1Ra. *Blood* 115:4185–4190.
- Meng J, et al. 2001. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288:203–211.
- Prabhu SB, et al. 2011. Study of cellular immune response against hepatitis E virus (HEV). *J. Viral Hepat.* 18:587–594.
- Riddell MA, Li F, Anderson DA. 2000. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 74:8011–8017.
- Rubin LA, et al. 1985. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.* 135:3172–3177.
- Srivastava R, et al. 2007. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol.* 20:56–65.
- Suneetha PV, et al. 2012. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 55:695–708.
- Tam AW, et al. 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120–131.
- Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ. 1996. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 97:1931–1941.

36. Tracey KJ, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45:491–503.
37. TrehanPati N, et al. 2011. Gene expression profiles of T cells from hepatitis E virus infected patients in acute and resolving phase. *J. Clin. Immunol.* 31:498–508.
38. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. 2007. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 39: 50–62.
39. Wolinsky SM, et al. 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272: 537–542.
40. Xing L, et al. 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 285:33175–33183.
41. Yamashita T, et al. 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:12986–12991.
42. Yang Z, Bielawski JP. 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 15:496–503.

Publication n°2: Influence of Polyproline Region and Macro domain Genetic Heterogeneity on HEV Persistence in Immunocompromised Patients.

Sébastien Lhomme, Cyril Garrouste, Nassim Kamar, Karine Saune, Florence Abravanel, Jean-Michel Mansuy, Martine Dubois, Lionel Rostaing and Jacques Izopet.

The Journal of Infectious Diseases, sous presse.

Notre première étude a mis en évidence qu'une grande hétérogénéité de la quasi-espèce au niveau de la région codant les domaines M et P de la protéine de capsid était associée à la persistance du VHE. Dans cette 2^{ème} étude, nous avons étudié la quasi-espèce dans la région codant la polyprotéine non structurale. Nous nous sommes intéressés à 2 régions d'ORF1: la région riche en proline et le macro domaine, 2 domaines qui pourraient intervenir dans la pathogénèse en modulant la réplication virale et/ou la réponse immune de l'hôte. L'objectif était d'étudier l'hétérogénéité de la quasi-espèce dans ces 2 domaines et de la comparer à celle observée au niveau des régions codant la protéine de capsid.

Quatorze patients ont été inclus dans cette étude rétrospective : 8 patients développant une infection chronique et 6 patients éliminant le virus spontanément. La complexité, la diversité et la pression de sélection ont été étudiées sur les 2 régions d'intérêt : la région riche en proline et le macro domaine.

Nos résultats ont montré, comme précédemment, une plus grande complexité et diversité de la quasi-espèce virale dans la région riche en proline et le macro domaine chez les patients développant une infection chronique comparativement aux patients éliminant le virus spontanément. Cependant, aucune différence de pression de sélection n'a été objectivée entre ces 2 groupes. Une corrélation entre les complexités/diversités a été retrouvée entre ORF1 et ORF2, suggérant une évolution similaire de ces régions.

Ainsi, cette étude a confirmé ce qui a été observé dans la région ORF2 : une plus grande hétérogénéité de la quasi-espèce virale dans la région riche en proline et le macro domaine chez les patients développant une infection chronique. Le rôle joué par ces 2 domaines dans la persistance virale requiert des études complémentaires.

Influence of Polyproline Region and Macro Domain Genetic Heterogeneity on HEV Persistence in Immunocompromised Patients

5 **Sebastien Lhomme**,^{1,2,a} **Cyril Garrouste**,^{1,2,3,a} **Nassim Kamar**,^{1,3}
Karine Saune,^{1,2} **Florence Abravanel**,^{1,2} **Jean-Michel Mansuy**,²
Martine Dubois,^{1,2} **Lionel Rostaing**,^{1,3} and **Jacques Izopet**^{1,2}

¹Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM, U1043, Toulouse,

10 ²Laboratoire de Virologie, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Institut fédératif de biologie de Purpan, Toulouse and ³Département de Néphrologie, Dialyse et Transplantation Multi-Organe, CHU Toulouse, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

Hepatitis E virus (HEV) can chronically infect immunocompromised patients. The polyproline region (PPR) and the macro domain of ORF1 protein may modulate virus production and/or the host immune response. We investigated the association between the genetic heterogeneity of HEV quasispecies in ORF1 and the outcome of infection in solid-organ transplant patients. Both sequence entropy and genetic distances during the hepatitis E acute phase were higher in patients whose infection became chronic than in those who cleared the virus. Hence, great quasispecies heterogeneity in the regions encoding the PPR and the macro domain may facilitate HEV persistence.

25 **Keywords.** hepatitis E; chronic infection; ORF1; polyproline region; macro domain.

Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. It is also responsible for large outbreaks of waterborne acute hepatitis in tropical and subtropical countries as well as sporadic infections worldwide. Hepatitis E is a zoonotic disease in industrialized countries, with pigs, wild boar, and deer being the major animal reservoirs of HEV [1]. HEV, genus *Hepevirus*, family *Hepeviridae*, is an unenveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus. Like all RNA

viruses, HEV exists as a mixture of closely related variants defining a quasispecies. The approximately 7.2 kb genome of HEV has a coding region consisting of 3 open reading frames (ORFs). ORF2 encodes the capsid protein; ORF3 encodes a small protein implicated in virus egress [2], whereas ORF1 encodes a nonstructural protein that contains several putative functional domains. These include at least 4 enzyme activities: methyltransferase, cystein protease, helicase, and RNA-dependent RNA polymerase [2]. Homologies with other plant and animal positive strand RNA viruses have been used to identify other domains: the Y domain, the polyproline region (PPR), and the macro domain.

The PPR is genetically very diverse and could correspond to an intrinsically disordered region involved in virus adaptation [3]. In addition, the PPR does not seem to be required for HEV replication in vitro or in vivo [4]. Nonstructural virus genes that are not essential for replication are usually involved in modulating host immune responses [5]. The genomes of several virus families, including all members of *Coronaviridae*, rubella virus, and alphaviruses (*Togaviridae*), and HEV, have macro domains. The macro domain of the mouse hepatitis virus (MHV) influences the pathogenicity of the virus [6].

HEV can lead to chronic hepatitis in solid-organ transplant (SOT) patients [7]. But our knowledge of the factors associated with the development of chronic infection in SOT patients exposed to HEV is far from complete.

Our working hypothesis was that the genetic heterogeneity of the PPR or the macro domain play a role in the outcome of HEV infection in immunocompromised patients, as the PPR could modulate the host immune response and the macro domain could influence virus pathogenicity. We therefore analysed the characteristics of HEV quasispecies at the acute phase of hepatitis E in 2 groups of SOT patients, one whose infection became chronic and the other who cleared the virus.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

We studied 14 SOT patients who became acutely infected with hepatitis E between January 2004 and June 2009. The infection was diagnosed by the detecting HEV RNA using the real time polymerase chain reaction (PCR) and immunoglobulin M/immunoglobulin G anti-HEV antibodies by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay [8]. Each patient was assigned to one of 2 groups according to the outcome of the infection. The first group (group 1; 8 patients) had chronic infections,

Received 26 April 2013; accepted 17 July 2013.

^aThese authors contribute equally to this work.

Correspondence: J. Izopet, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse F-31300, France (izopet.j@chu-toulouse.fr).

The Journal of Infectious Diseases

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jit438

80 defined by persistently elevated liver enzyme activity and serum
that was positive for HEV RNA for more than 6 months after di-
agnosis. The second group (group II; 6 patients) had resolving
infections. Serum samples were collected from all patients at the
acute phase of their infection and stored at -80°C .

85 Each patient underwent an exhaustive clinical and laboratory
examination, including the immunosuppressive drugs used, the
hepatic enzyme activities, and white blood cell count. The
serum concentration of HEV RNA was measured by real-time
PCR [9]. Virus genotype was determined by sequencing a 189-
90 nucleotide fragment within the ORF2 gene. The sequences
were compared to reference HEV strains (Genbank) as de-
scribed elsewhere [10].

Amplification of an ORF1 Fragment Encompassing the PPR and the Macro Domain

95 Nucleic acids were extracted from serum samples and analysed
by 1-step RT-PCR with the sense primer HEVORF1-S1 and
anti-sense primer HEVORF1-A1 using the Super script III
enzyme (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The sequences of
the primers are listed in Supplementary Table 1.

100 The sequence amplified included the PPR (nucleotide [nt]
2137–2340) and the macro domain (nt 2341–2829), using the
genome 1b L08816 as a reference. The PCR products were puri-
fied using Qiaprep (Qiagen, Courtaboeuf, France) miniprep
kits and stored at -20°C .

105 In total, 10 ng of the amplified sequence were directly ligated
into 1 μL of PCR 4 vector (kit TOPO TA Cloning; Invitrogen)
containing a gene conferring resistance to ampicilline. Recombi-
nant plasmids were used to transform *Escherichia coli*-competent
cells, and transformants were grown on ampicillin-coated plates
110 at 37°C for 18 hours. The complementary DNA (cDNA) clones
(20 from each patient sample) were analysed by PCR with the
primers HEVORF1-S1 and HEVORF1-A1 (Supplementary
Table 1).

Nucleotide Sequence Analysis

115 The PCR products of these amplifications were purified (Quick-
Spin columns; Qiagen) and sequenced using the fluorescent dye
terminator method for Big Dye Terminator cycle sequencing
(Applied Biosystems, Paris, France) with the primers HEVORF1-
S1, HEVORF1-S2, HEVORF1-S3, HEVORF1-A1 and HEVORF1-
120 A2 (Supplementary Table 1) on an Applied Biosystems ABI 3130
XL analyzer. Sequences were aligned using Clustal X and com-
pared with those of HEV strains obtained from Genbank.

Calculation of Genetic Complexity and Diversity

125 We quantified the complexity of the HEV quasispecies by cal-
culating the Shannon entropy: $S = -\sum_i (p_i \ln p_i)$, where p_i is the
frequency of each sequence in the viral quasispecies. The nor-
malized entropies for both nucleotides and amino-acids, S_n ,
were calculated using $S_n = S/\ln N$, where N is the total number
of sequences analysed.

We quantified diversity as the mean genetic distance calcu- 130
lated for all pairs of nucleotide sequences using Mega 4.0. The
numbers of synonymous (K_s) substitutions per synonymous
site and nonsynonymous (K_a) substitutions per nonsynony-
mous site were calculated with the Jukes-Cantor correction for
135 multiple substitutions using MEGA 4.0. The K_a/K_s ratio is an
indicator of the positive (>1) or negative (<1) selection pressure
on a quasispecies [11].

Statistical Analysis

Proportions were compared by Fisher exact test. Quantitative var- 140
iables were compared with the nonparametric Mann-Whitney
test. Correlations between complexities or diversities of quasispe-
cies were estimated by calculating Spearman rank correlation
coefficient. A P -value below .05 was considered to be statistically
significant.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

145 The sequences have been deposited in the GenBank database
under accession numbers KC911858 to KC912137.

RESULTS

Patient Characteristics

150 The clinical and biological characteristics of the patients are
summarized in Supplementary Table 2. There was no signifi-
cant difference between patients with chronic infections and
those with resolving infections in terms of gender, age, or im-
munosuppressant treatment. The ALT activities of individuals
with a chronic infection tended to be lower. Patients whose in- 155
fection became chronic had lower total, CD3, CD4, and CD8
lymphocyte counts, but the differences were not significant.
The serum HEV RNA concentrations at the acute phase of
the 2 groups of patients were similar. They were all infected
with HEV genotype 3f strains, except one whose infection was 160
genotype 3c.

Association Between Quasispecies Heterogeneity and the Development of a Chronic Infection

165 We compared the sequence heterogeneity of 2 regions of ORF1
in patients with chronic HEV infection and those with resolv-
ing infections.

The mean nucleotide sequence entropy (nt complexity) of
the PPR was higher in group I (0.63 [0.53–0.75]) than in group
II (0.43 [0.38–0.52]; $P = .03$). Similar results were obtained
for the macro domain (0.73 [0.60–0.91] in group I and 0.59
170 [0.50–0.54] in group II; $P = .005$) (Figure 1A).

The mean amino-acid (aa) sequence entropy (aa complexity)
of the PPR was significantly higher in group I (0.51 [0.46–
0.67]) than in group II (0.34 [0.20–0.37]; $P = .002$). Similar
results were obtained for the macro domain (0.52 [0.43–0.75] 175
in group I and 0.29 [0.24–0.32] in group II; $P = .03$; Figure 1B).

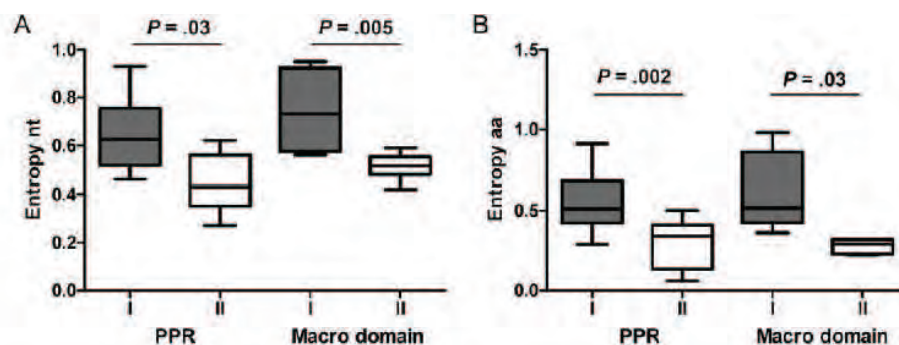


Figure 1. Box plot representation of quasispecies entropy for patients with chronic and resolving hepatitis E virus (HEV) infections. Gray boxes: chronic infection (I). White boxes: resolving infection (II). A, Mean values of nucleotide entropy (B) mean values of amino-acid entropy. The Mann-Whitney test was used to compare differences between the 2 groups.

The mean pair-wise within-sample genetic distance (diversity) of the PPR was higher in group I (0.0058 [0.0039–0.010]) than in group II (0.0030 [0.0025–0.0032]; $P = .006$). The macro domain diversity was also greater in group I (0.0050 [0.0038–0.011]) than in group II (0.0023 [0.0019–0.0025]; $P = .002$; Figure 2).

The nt complexity and diversity of the PPR were positively correlated with those of the macro domain ($r = 0.69$ $P = .009$ and $r = 0.83$ $P = .0005$, respectively).

Association Between the Ka/Ks Ratio and the Development of a Chronic Infection

The ratios of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (K_a) and synonymous substitutions per synonymous site (K_s) for the PPRs seemed to be higher in group I (0.51 [0.38–0.70]) than in group II (0.93 [0.61–1.75]), but the difference was not statistically significant ($P = .30$). The K_a/K_s ratios

for the macro domains in group I (0.54 [0.17–0.93]) and group II (0.37 [0.27–0.38]; $P = .90$) were similar.

DISCUSSION

It was shown recently that an HEV infection can evolve to a chronic infection in SOT recipients [7]. The viral determinants associated with the persistence of such an infection are poorly documented. We therefore investigated the influence of the genetic heterogeneity of HEV quasispecies on the outcome of infection, focusing on the PPR and the macro domain.

Both the complexity and diversity of the PPR and the macro domain were higher in viral population of the patients whose infection became chronic than in those who cleared the virus. It has been shown that the quasispecies heterogeneity in the ORF2 region encoding the capsid protein during the acute phase of infection is associated with the development of a chronic HEV infection [12]. Our data support the finding that great genetic heterogeneity of the quasispecies in patients whose infection become chronic seems to favor the appearance of variants that can persist, as reported for HCV infections [13]. Although the diversity of the region preceding the PPR was higher in patients with chronic infection, nt and aa complexities were not different in the 2 groups (data not shown), suggesting that the higher heterogeneity in chronic patients was not a general effect seen across the entire region studied. This great genetic heterogeneity could also reflect an inadequate control of the viral replication, but no correlation was found between quasispecies heterogeneity and viral concentrations. PPR appears to be dispensable for in vitro HEV replication, but it is required for in vivo infection, suggesting that it is involved in infecting cells with innate immunity [4]. Although the role of the macro domain in the replication of HEV is unknown, it does not seem to be essential for the replication of coronavirus in cell culture [14]. It was recently suggested that genes that are

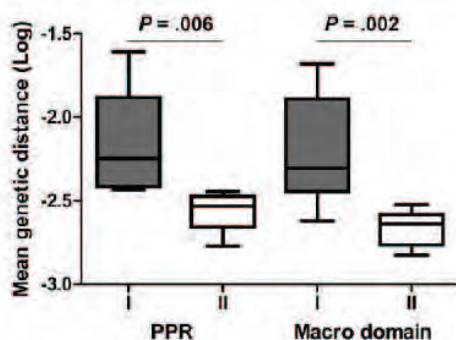


Figure 2. Box plot representation of quasispecies mean genetic distances for patients with chronic and resolving hepatitis E virus (HEV) infections. Gray boxes: chronic infection (I). White boxes: resolving infection (II). The Mann-Whitney test was used to compare differences between the 2 groups.

dispensable for virus replication are involved in modulating the host immune response, like down-regulating interleukin 1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor α (TNF- α) secretion [5]. The macro domain is also involved in the inflammation caused by the mouse hepatitis virus (MHV), and the substitution of a strictly conserved amino-acid residue is responsible for reducing the secretion of inflammatory cytokines [6]. The great quasispecies heterogeneity in patients whose infection became chronic may include some variants that reduce inflammatory cytokine production, which could facilitate HEV persistence. This could explain the lower serum concentrations of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist and TNF- α found in patients whose infection became chronic [12].

We find that the complexities and diversities of the PPR and the macro domain are correlated. These 2 regions may well have evolved together as the protein encoded by ORF1 does not seem to be cleaved [15]. We also studied the correlations between the ORF1 and ORF2 as this study and our previous one on ORF2 diversity [12] were carried out on the same patients (except for 3). We also find that the complexity and diversity of the regions in ORF1 and ORF2 that were studied are correlated (data not shown), suggesting that they, too, have evolved together.

Finally, we find no differences in the Ka/Ks ratios of the studied regions, even though the Ka/Ks ratios of the PPR seemed to be higher in patients who cleared the virus. Alternatively, the Ka/Ks ratio may not allow us to infer differences in selection pressure. In both regions, Ka/Ks ratios indicate negative selection, probably due to structural or functional constraints. A limitation of our study is the small number of patients in each group and an implication of immunological factors in the evolution toward chronicity cannot be excluded.

We conclude that the high genetic heterogeneity of the PPR and the macro domain at the acute phase of an HEV infection is associated with persistence of the virus. This association may be due to the appearance of mutants able to modulate the host immune response. Further investigation is now needed to confirm this association.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data

are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Financial support. This work was supported by Institut national de la santé et de la recherche médicale U1043.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet* 2012; 379:2477–88.
- Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 2011; 161:47–58.
- Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLoS One* 2012; 7:e35974.
- 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; 83:384–95.
- Chen Z, Zhou X, Lunney JK, et al. Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. *J Gen Virol* 2010; 91:1047–57.
- Eriksson KK, Cervantes-Barragan L, Ludewig B, Thiel V. Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1st-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J Virol* 2008; 82:12325–34.
- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358:811–7.
- Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, et al. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* 2010; 202:835–44.
- Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* 2012; 50:897–902.
- Legrand-Abravanel F, Mansuy JM, Dubois M, et al. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:110–4.
- Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol* 2000; 15:496–503.
- Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, et al. HEV quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol* 2012; 86:10006–14.
- Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288:339–44.
- Patics A, Filipowicz W, Hall J, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. ADP-ribose-1st-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol* 2005; 79:12721–31.
- Perttola J, Spuul P, Ahola T. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J Gen Virol* 2013; 94:807–16.

Supplementary data :

Table S1: Primers used to amplify a 1200nt fragment of ORF1 encompassing the polyproline region (PPR) and the macro domain.

Primer	Open reading frame	Sequence	Nucleotide position^a
HEVORF1-S1	ORF1	5'-GAGTGCCGYA CKGTGCTYGG GAATAA-3'	1666-1691
HEVORF1-S2	ORF1	5'-GCAYATCTGGGAGTCTGCTAACCC-3'	2037-2060
HEVORF1-S3	ORF1	5'-GCCCTGGRGGTGGCCTCTGCCATGC-3'	2417-2441
HEVORF1-A1	ORF1	5'-ACATCRACAT CCCCTGYTG TATRGA-3'	2932-2957
HEVORF1-A2	ORF1	5'-GGGGAGAAGTCGCTAGAGAAACCTGATGT3'	2134-2152

^a Nucleotide position refers to reference 1b L08816.

Table S2. Acute phase demographic, biological and virological features of patients with resolving HEV infection and those who evolved to chronic infection.

Variable	Group I	Group II	<i>p</i> -value
at diagnosis	Patients with chronic infection (<i>n</i> =8)	Patients with resolving infection (<i>n</i> =6)	
Age (years)	50.5 [42-55]	44 [35-56]	NS
Gender M/F	6/2	5/1	NS
Transplanted organ: kidney/liver	7/1	5/1	NS
Calcineurin inhibitors: Tacrolimus/cyclosporine	6/0	2/2	NS
Tacrolimus concentration (ng/mL)	11.3 [5.8-15.3]	10.6 [5.6-15.6]	NS
ALT (IU/L)	157 [129-167]	276 [247-425]	0.07
AST (IU/L)	79 [57-108]	129 [92-210]	NS
Lymphocytes/mm ³	1,042 [742-1,428]	2,026 [1,331-2,327]	NS
CD3+ cells/mm ³	871 [584-1,457]	1,125 [443-1,839]	NS
CD4+ cells/mm ³	397 [283-683]	782 [415-1,035]	NS
CD8+ cells/mm ³	445 [305-509]	721 [350-1030]	NS
CD19+ cells/mm ³	121[28-208]	166 [57-266]	NS
HEV RNA at acute phase (Log copies/ml)	6.5 [5.8-7.0]	6.5 [6.3-6.9]	NS
Genotype: 3f/3c	7/1	6/0	NS

Data are medians [ranges] unless otherwise indicated. Proportions were compared by Fisher's exact test. Quantitative variables were compared with the non-parametric Mann-Whitney test.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; F, female; HEV, hepatitis E virus; M, male; NS: not significant.

Partie II : étude longitudinale de l'évolution du génome du VHE chez un patient chroniquement infecté.

Publication n°3: Hepatitis E Virus Genome Evolution during a Chronic Infection and Impact on Virus Adaptation.

Sebastien Lhomme, Florence Abravanel, Martine Dubois, Karine Sandres-Saune, Lionel Rostaing, Nassim Kamar and Jacques Izopet.

Soumis.

La description d'infections chroniques par le VHE étant récente, l'évolution du génome lors d'une infection prolongée n'a pas encore été décrite. L'objectif de ce travail a été d'étudier sur plusieurs années la localisation des mutations survenant dans le génome du VHE.

Un patient greffé rénal en 2000 a présenté 4 ans après la transplantation une hépatite E aiguë. L'élimination du virus est survenue 4 ans après la phase aiguë à la suite d'un traitement antiviral par IFN pégylé α -2a. Le séquençage des génomes complets a été réalisé chaque année puis les séquences ont été comparées entre elles. Les régions présentant la plus grande variabilité ont fait l'objet d'une analyse clonale.

L'analyse des génomes complets à la phase aiguë puis tous les ans pendant 4 ans a permis de montrer qu'un nombre limité de mutations non synonymes est survenu dans le génome. ORF1 était la région présentant le plus de mutations tandis que la séquence en aa d'ORF3 apparaissait strictement conservée au cours du temps. La région accumulant le plus de mutations non synonymes était la région riche en proline. L'analyse clonale de cette région par séquençage de 15 à 20 clones par échantillon a montré qu'un an après la phase aiguë, l'hétérogénéité de la quasi-espèce était plus faible que celle observée au moment de la phase aiguë. Cette hétérogénéité a ensuite progressivement augmenté la 2^{ème} et 3^{ème} année avant de diminuer brusquement la 4^{ème} année. La faible hétérogénéité de la quasi-espèce observée la 1^{ère} et 4^{ème} année était associée à une pression de sélection positive ($Ka/Ks > 1$). Lors de la 4^{ème} année une variation de longueur de 75 nt du génome complet a été observée. Cette augmentation de la longueur génomique était due à l'insertion d'un fragment d'un gène d'origine humaine : la chaîne lourde de l'inter-alpha trypsine inhibiteur 2. Cette insertion est

apparue dans la région riche en proline. En culture cellulaire, la souche avec insertion présentait un avantage répliatif par rapport à la souche originelle. Les mécanismes pouvant expliquer cet avantage répliatif conféré par l'insertion ont été étudiés *in silico*. De nouveaux sites de régulation (ubiquitination, acétylation ou phosphorylation) apportés par cette séquence pourraient intervenir dans le cycle de réplication virale.

Cette étude a ainsi permis de montrer que la séquence consensus du VHE issu d'un patient chroniquement infecté subit un nombre limité de variations au cours du temps. Cette étude a également permis la description d'une nouvelle insertion dans la PPR. Contrairement à celles décrites précédemment, le gène humain inséré n'appartient pas à des gènes codant pour une fraction ribosomique. Notre étude *in silico* suggère que l'apport de nouveaux sites de régulation pourrait contribuer à l'amélioration de la capacité répliative des virus présentant une insertion. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Evolution of the Hepatitis E Virus Genome during a Chronic Infection and Virus Adaptation.

Authors: Sebastien LHOMME^{1;2}, Florence ABRAVANEL^{1;2}, Martine DUBOIS^{1;2}, Karine SANDRES-SAUNE^{1;2}, Lionel ROSTAING^{1;3}, Nassim KAMAR^{1;3} and Jacques IZOPET^{1;2}#

Short title: Chronic Hepatitis E and Genome Evolution

¹INSERM, UMR1043, Toulouse, F-31300 France

²Department of Virology, CHU Purpan, Toulouse, F-31300 France

³Department of Nephrology, Dialysis and Organ Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, F-31300 France

#Corresponding author: izopet.j@chu-toulouse.fr

Title: 90/120

Short title: 40/45

5506/6000 including the abstract, figure and table legends, and references.

Abstract: 236/260

ABSTRACT.

Background & aim

Genotype 3 Hepatitis E virus infections can become chronic in immunocompromised patients, including solid-organ transplant recipients. Little is known about virus adaptation in this setting. This study investigates the evolution of the HEV genome during a chronic 4-year infection.

Methods

Full-length strain genomes were obtained from a kidney-transplant recipient and analyzed by population sequencing; the polyproline region (PPR) of the ORF1 polyprotein was further characterized by clonal sequencing at several times after the acute phase.

Results

The 5 complete genomes sequenced had over 98% of nucleotide in common. We identified 59 mutation sites in consensus sequences over the 4 years. Only 19 mutations were non-synonymous. The PPR was most prone to non-synonymous mutations. Clonal analysis of the PPR showed limited variations during the first 3 years of infection but a virus-host recombinant with a 75 nt fragment of the human inter- α -trypsin inhibitor (ITI) gene in the PPR became the major variant of the quasispecies in the fourth year. This insert promoted more vigorous virus growth *in vitro*. *In silico* studies showed that the inserted sequence had potential acetylation, ubiquitination and phosphorylation sites, which could modulate the virus lifecycle.

Conclusion

The HEV genome undergoes a limited number of mutations during the initial 3 years of infection but 75 nt of the ITI gene became incorporated in the PPR thereafter. This short fragment enhanced replication of the strain, perhaps by supplying new regulation sites.

Key words: Hepatitis E Virus; Immunosuppression; Genome Evolution; Inserted Sequence.

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV), the causative agent of hepatitis E, is responsible for epidemic jaundice in developing countries and sporadic cases in developed countries ^{1, 2}. HEV is a member of the genus *Hepevirus*, family *Hepeviridae* ³ and, like all RNA viruses, exists as a mixture of closely related variants defining a quasispecies ⁴. The HEV genome is a single strand, approximately 7.2 kb long, positive-sense RNA. It contains 3 open reading frames (ORF), ORF1, ORF2 and ORF3, flanked by noncoding regions. ORF1 encodes a non-structural protein, with at least five putative functional domains: methyltransferase, papain-like cysteine protease (PCP), helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). It also has domains that are homologous to those of other plant and animal positive-strand RNA viruses: Y domain, X or macro domain and the polyproline region (PPR). A recent study suggested that the polyprotein is not cleaved ⁵. ORF2 encodes the 660 amino acid (aa) capsid protein. Its 3 domains are S (Shell), M (Middle) and P (Protruding). Lastly, ORF3 encodes a small (113 or 114 aa) phosphoprotein that is involved in virus egress ⁶.

HEV causes chronic hepatitis in immunocompromised patients, especially solid-organ transplant patients ⁷. The mechanisms leading to HEV persistence are largely unknown but seem to be a complex interplay between virus diversity and the host immune response. Recent reports indicate that great quasispecies heterogeneity at the acute phase of the infection is associated with HEV persistence ^{8,9}. The development of a chronic HEV infection also seems to be associated with a weak inflammatory response, poor T-cell activation and high concentrations of the chemokines involved in leukocyte recruitment to the liver ⁸. Another study reported that the evolution to chronic infection was associated with an impaired specific T-cell response ¹⁰.

Little is known about how the HEV genome evolves during a chronic infection. Segments of a human gene was recently identified in the PPR of HEV RNA obtained from both cell culture

systems ^{11, 12} and from a chronically infected patient ¹³. These human sequences were portions of the S17 and S19 ribosomal proteins, respectively. These fragments of human genes could have been inserted by chance or could reflect some unknown aspect of HEV replication.

We therefore investigated the dynamics of the HEV genome during a chronic infection. We monitored the virus in a chronically infected patient for 4 years and sequenced the full genomes of the HEV strains every year from the acute phase. We looked for inserts of human sequences both within and outside the PPR.

MATERIALS AND METHODS

Patient history.

A 30 year-old man was given a kidney allograft for Alport syndrome in November 2000. He presented with acutely elevated ALT in December 2004 and hepatitis E was diagnosed based on HEV RNA detected in his blood. The immunosuppressive drug treatment given during the acute phase was sirolimus (2mg/day) and corticoids (5mg/day). As kidney biopsy revealing moderate signs of allograft nephropathy, tacrolimus (1 mg twice a day, b.i.d) was begun 1 year 4 months after the acute phase. Sirolimus was stopped 20 months after the acute phase and mycophenolate mofetil (360mg b.i.d) begun. The tacrolimus dose was increased to 2 mg b.i.d at the same time. The tacrolimus dosage was then gradually decreased to 0.5 mg b.i.d 3 years and 3 months after the acute phase. The doses of immunosuppressive drug were dramatically reduced 4 years after the acute phase. The patient was finally treated with pegylated interferon alfa-2a, and recovered. He was monitored for Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus and BK Virus during follow-up but suffered no intercurrent viral infection.

Virus strains.

The initial virus strain was collected from the patient's plasma during the acute phase and was designated Toulouse strain 09-0 (TLS09-0). Plasma samples were collected every year for four years after the acute phase: their virus strains were designated TLS09-1, TLS09-2, TLS09-3 and TLS09-4.

Plasma HEV RNA concentrations and genotype determination.

The concentrations of HEV RNA in the plasma samples were measured by real time PCR based on ORF3 as previously described ¹⁴. HEV genotypes were determined by sequencing a 189nt fragment within the ORF2 gene ¹⁵. The sequences were compared to reference HEV strains (GenBank).

Sequencing the full-length genome.

(i) HEV-RNA extraction, HEV-cDNA synthesis and PCR. RNA was isolated from serum samples and purified using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify a 5400 nt fragment of the HEV genome. RT-PCR was performed with the SuperScript III One-step RT-PCR system (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), with the following conditions: 30 minutes at 50°C, 2 minutes at 94°C, 50 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C, and 2 minutes 30 seconds at 68°. The primer pair was 10-sense (S) ATGTGGTCGATGCCATGGAGGCCCA and 5500 anti-sense (AS) CTTGGCGYGACCAGTCCCA. The last 1900 nt fragment of the HEV genome was amplified with the same protocol using the primer pair 5254-S TGCCTATGCTGCCCGCGCCACCGGC and 7250-AS TTTTTTTTTTTTCCGGGGRGCGMG RAACC.

Nested PCR was performed on the 5400 and 1900 nt fragments with the Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany) using the following conditions: 30 seconds at 98°C and 35 cycles of 30 seconds at 98°C, 30 seconds at 55°C and 3minutes at 72°C. PCR fragments were analyzed by capillary electrophoresis with Caliper (Life Sciences, Villepinte, France) and purified using Qiaquick PCR purification (Qiagen, Courtaboeuf, France) as specified by the manufacturer.

(ii) Nucleotide sequencing. Nested PCR products were sequenced on both strands by the dideoxy chain termination method (PRISM Ready Reaction AmpliTaq Fs and Big Dye Terminator, Applied Biosystems, Paris, France) on an ABI 3130XL analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences of the primer pairs used to sequence the complete genome are available on request.

Electrophoregram data were analyzed using Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation). Sequencher 4.8 was used to determine the final assembly of the complete genomic sequences.

Cloning and sequencing the polyproline region (PPR).

(i) HEV-RNA extraction, HEV-cDNA synthesis and PCR.

The RT-PCR was performed with 10-S and 5500-AS as above. The nested PCR was performed with the Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany) with the following conditions: 30 seconds at 98°C and 30 cycles of 30 seconds at 98°C, 10 seconds at 55°C and 35 seconds at 72°C. The sense primer was 1710-S GAGTGCCGYACKGTGCTYGGGAATAA and the anti-sense primer was 3050-AS ACATCRACATC CCCCTGYTGTATRGA. PCR fragments were analyzed by capillary electrophoresis with Caliper (Life Sciences, Villepinte, France) and purified using Qiaquick PCR purification (Qiagen, Villepinte, France) as specified by the manufacturer.

(ii) Plasmid cloning. The purified PCR products were quantified with Caliper (Life Sciences, Villepinte, France); 10 ng of cDNA was directly ligated into 10 ng of TOPO TA cloning (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* competent cells according to the manufacturer's protocol and transformants were grown on ampicillin plates. Fifteen to twenty clones were randomly selected for sequencing.

(iii) Nucleotide sequencing. The cDNA of the previously selected clones were amplified under the following conditions: 10 min at 94°C followed by 35 cycles of 15 seconds at 94°C,

30 seconds at 55° and 1min 30 seconds at 68°C. The primers used were 1710-S and 3050-AS. The PCR products were purified and sequenced as previously described⁹ using primers 1710-S, 2080-S GCA YATCTGGGAGTCTGCTAACCC, 3050-AS and 2150-AS GGGGAGAAGTCGCTAGAGAAACCTGATGT. Electrophoregram data were analyzed using Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation).

(iv) Calculation of genetic complexity and diversity. Nucleotide sequences were aligned using Clustal X 1.83. The complexity of the PPR clones was determined by calculating the Shannon entropy as follows: $S = -\sum p_i \ln(p_i)$ where p_i is the frequency of each sequence in the virus quasispecies¹⁶. The normalized nucleotide entropy (S_n) was calculated at the nucleotide level as follow: $S_n = S/\ln(N)$ where N is the total number of sequences analyzed. Diversity is quantified as the mean genetic distance calculated for all pairs of nucleotide sequences using the MEGA program 4.0.2¹⁷. The calculation is based on a Kimura two-parameter distance matrix. The within-strain genetic distances were calculated for PPR clones in each of the 5 sample times.

The MEGA program 4.0.2¹⁷ was also used to calculate the rates of intra-sample synonymous substitutions per synonymous site (K_s) and non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) with the Nei and Gojobori method and the Jukes-Cantor correction for multiple substitutions¹⁸. The K_a/K_s ratio is an indicator of the strength of the positive (>1) or negative (<1) selection pressure on a quasispecies.

Sequence analysis.

Sequences were aligned using Bioedit (version 7.0.5.3). The similarities of aligned nucleotide or deduced aa sequences were also analyzed using Bioedit.

A phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method ¹⁹ based on the PPR (333nt). A total of 100 bootstrap replicates were performed to assess the statistical support for the topologies. The tree was visualized and annotated in Treeview (version 1.6.6).

Potential ubiquitination sites were identified using the BDM-PUB server (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>) with a threshold value of >0.3 average potential score.

Potential phosphorylation sites were identified using the NetPhos 2.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) with a threshold value of >0.5 average potential score ²⁰.

Potential acetylation sites were identified using the Prediction of Acetylation on Internal Lysines. (PAIL) server (<http://bdmpail.biocuckoo.org/prediction.php>) with a threshold value of >0.2 average potential score.

Potential N-linked glycosylation sites were identified using the NetNGlyc 1.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) with a threshold value of >0.5 average potential score.

Potential methylation sites were identified using the BPB-PPMS server (www.bioinfo.bio.cuhk.edu.hk/bpbppms/index.jsp) with a threshold value of >0.5 average potential score ²¹.

Cell culture and virus inoculation.

HepG2/C3A cells were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 100U/mL penicillin G, 100U/mL streptomycin and 0.25µg/ml amphotericin B (culture medium) at 37° in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Inoculum titers were measured by the limiting dilution method. Briefly, serial 10-fold dilutions of HEV strains were diluted in 100µL phosphate buffered saline (PBS) containing

0.2% bovine serum albumin (BSA) and inoculated onto monolayers of HepG2/C3A to identify the doses of HEV inocula infecting cell cultures prior to growth assay.

Cells to be infected were added ($5 \cdot 10^5$ cells per well) to 24-well plates and cultured for 2 days. They were then washed 3 times with 1.5ml PBS and inoculated. Inoculated cells were incubated for 1h at room temperature. The inoculum was removed and replaced with 1.5 ml cell culture medium and the cells were cultured at 35.5°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The maintenance medium used for virus culture was a 1:1 mixture of DMEM and medium 199 (Invitrogen) containing 2% (vol/vol) heat-inactivated FBS and 30mM MgCl₂ (final concentration), the other supplements were the same as those in the growth medium.

On day 1 post-infection, the cells were washed 5 times with 1.5ml PBS and 1.5 ml cell culture medium was added. Subsequently, half the medium was replaced with fresh cell culture medium every 2 days, and the harvested media samples were stored at -80°C. The virus in the culture supernatants was measured by real time PCR ¹⁴.

Statistical analysis

All statistical calculations were performed using Stata software (version 9.2; Stata Corp.). Correlations between complexity, diversity, the Ka/Ks ratio and HEV RNA concentrations were estimated by calculating Spearman's rank correlation coefficients. P values <0.05 were considered statistically significant.

Nucleotide sequence accession numbers.

Full-length genomes have been deposited in Genbank as KC166967-KC166971. Clone sequences have been deposited in Genbank as KC166872-KC166966.

RESULTS

Evolution of biological parameters.

The HEV genotype was genotype 3. The serum HEV RNA concentrations, ALT activities and tacrolimus trough concentration at the 5 times are shown in [Figure 1](#). The ALT activity decreased from 451 IU/L at the acute phase to 250 IU/L after the first year of infection and stabilised at around 140 IU/L thereafter. The virus RNA concentrations remained relatively stable at 4.5 - 5.7 Log copies/mL throughout the 4 year period despite the introduction of tacrolimus. The tacrolimus trough concentration was stable at about 8.0 µg/L during its first year introduction and then dropped to 4.9 µg/L at the end of the second year.

Complete genome sequence analysis.

The complete genome sequence of TLS09-0 was 7290nt long, as were those of TLS09-1, TLS09-2 and TLS09-3. ORF1 extended from nucleotide 1 to 5205 (5205nt) and encoded a 1735 residue protein. ORF2 extended from nucleotide 5240 to 7219 (1980nt) and encoded a 660 aa long protein. ORF3, which partially overlaps ORF2, extended from nucleotide 5229 to 5567 (339nt) and encoded a 113 residue protein. The complete sequence of the TLS09-4 genome was 75 nucleotides longer than the other genomes due to an insertion in the PPR of ORF1. The presence of this inserted sequence was confirmed on independent PCR.

A BLAST search identified the 75 nt insert, in frame, as similar to a fragment of the human inter-alpha-trypsin inhibitor 2 gene. Of its 75 nucleotides, 71 were identical to those of the *Homo sapiens* inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2 (ITI-H2) (genbank NM_002216.2), as were 22 of the 25 aa ([Figure 2](#)). The inserted sequence encoded a peptide rich in aliphatic hydrophobic aa (particularly alanine, glycine, proline or leucine) and dibasic aa (lysine and arginine). It also had at least 2 sites suitable for acetylation, ubiquitination or phosphorylation (especially serine) sites, but no new glycosylation or methylation sites.

Nested PCR with paired HEV and insertion sequence primers revealed no insertions in the genomes of the strains collected at the acute phase or in those collected 1, 2 and 3 years later. This indicates that the recombinant variant probably emerged after at least 3 years of chronic infection.

The nucleotide sequences of the various regions of the five HEV genomes obtained during 4 years of chronic infection were more than 98% identical (Table 1). The greatest differences (at least 0.9% of nt between two consecutive sequences) were in ORF1, especially the PPR, Y domain and PCP gene. We found no mutations in the ORF3 gene of any of the strains analysed.

Analysis of the mutations over the entire genome and the predicted aa differences within the 3 ORFs between the strains isolated at the acute phase revealed that only 19 of the 59 mutations observed were non-synonymous (Table 2). There were few non-synonymous mutations in regions encoding methyl transferase, helicase, RdRp or X domain, while there were 5 mutations in the PPR. Three of the 5 non-synonymous mutations detected in the PPR were detected at the same time as the insertion. Only 1 non-synonymous mutation was detected in the P domain of the capsid protein. Over half (27/40) of the synonymous mutations were detected 4 years after the acute phase.

The PPR region and selection pressure analysis.

We used clonal analysis to calculate the complexity, diversity and selection pressure (Ka/Ks ratio) across the coding region sequences of the PPR region, which was prone to non-synonymous mutations and the site of a recombination. These analyses of nucleotide sequence identities, Ka/Ks ratios of the various genome domains and phylogenetic analysis did not include the PPR insertion.

All the clones isolated 4 years after the acute phase contained the 75nt ITI fragment insert. As shown in [Figure 3](#), the complexity and the diversity of the TLS09-0 and TLS09-1 quasispecies were low, but increased for the TLS09-2 and TLS09-3 quasispecies after starting tacrolimus. Lastly, they were again low in TLS09-4, taken after the tacrolimus dose had been reduced. The Ka/Ks ratio was >1 , indicating positive selection, in the sample taken after the acute phase (TLS09-1) and in that taken 4 years after the acute phase (TLS09-4), when the tacrolimus dose was low. The Ka/Ks ratio was <1 , indicating negative selection, in the samples taken in the other years. No correlations were found between the HEV RNA concentration and the parameters of virus heterogeneity ([data not shown](#)).

Phylogenetic analysis showed that the sequences of clones isolated during the acute phase and the 3 following years were intermixed whereas the sequences of clones isolated 4 years after the acute phase were clearly distinct ([Figure 4](#)).

Culture of strain TLS09

We inoculated HepG2/C3A cells in triplicate with the TLS09-4 and TLS09-3 strains, with and without the inserted sequence, to see whether the inserted sequence conferred a growth advantage in culture. The presence of the inserted sequence in the inoculum was verified using primers 1710-S and specific primer INS-AS GCTGGACAGTTTTGCCAAGCTCCCCGAA. Monolayers of HepG2/C3A cells were inoculated with serial 10-fold dilutions of the HEV inoculum to determine the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀). The titer obtained was 10^3 TICD₅₀/mL for both strains. Using 100 TCID₅₀ per well for the growth assay, the TLS09-4 strain with the human sequence insertion seemed to grow more efficiently in culture in comparison with the TLS09-3 ([Figure 5](#)). The virus production in the supernatant after 4 days was higher in the wells inoculated

with the strain containing the inserted sequence than in the wells containing virus without the insert. The virus RNA production also seemed to be higher on the other days.

DISCUSSION

We have analysed the evolution of the genome of an HEV strain isolated from a patient who had had a chronic HEV infection for 4 years. While the genome presented a limited number of variations during much of the infection, a human sequence became inserted into the PPR towards the end of the 4 years.

Only 19 of the 59 mutations found were non-synonymous, indicating great conservation of the major variant. However, mutations may appear to adapt to the host environment or as a result of polymerase error. Lorenzo et al. examined mutations of the HEV genome in primary cell culture²² and found few genetic changes (0.3%). Similarly, no nucleotide mutations were found in the full-length consensus sequence amplified after the transmission of the strain from human to swine, which shows adaptation of genotype 3 HEV to both hosts²³. These results suggest that virus adaptation is associated with a limited number of mutations. We found few mutations in the TLS09 genome during the first year of the chronic infection, suggesting that the strain adapted to a new host with only a limited number of mutations.

The PPR was the region most prone to non-synonymous mutations. While the function of this region is not well understood, its deletion does not abolish HEV infectivity *in vivo* or *in vitro*, but lead to virus attenuation^{24, 25}. Koonin et al. suggested that this region is a putative proline hinge²⁶. This is supported by a recent study showing that the PPR is an intrinsically disordered region (IDR) that probably contributes to virus adaptation²⁷. IDRs have no stable tertiary structure and their functions include regulating translation, cellular signal transduction and protein phosphorylation²⁸. The PPR Ka/Ks ratios at 2 times after the acute phase showed positive selection. Positive selection one year after the acute phase could reflect the initial adaptation of the virus to its host immune response. Positive selection 4 years after the acute phase could reflect the dose reduction of the immunosuppressive drug targeting T cells. The

reduced tacrolimus dose during the fourth year of the chronic infection may have improved T cell function, leading to greater immune pressure on the virus ¹⁰.

A fragment of the ITI human gene became inserted into the PPR four years after the acute phase, when the tacrolimus concentration was decreased. The insertion was not due to an amplification artefact of PCR as it was detected with specific primers. The delayed occurrence of this recombinant event also suggests that such an insert is not required for the persistence of HEV after the acute phase.

The HEV of another chronically infected patient also had a PPR containing a segment of the S17 human ribosomal protein gene ¹¹. This variant was isolated by inoculating a cell culture system with fecal samples ¹¹. Serum samples collected 10 months after the acute phase of yet another chronically infected patient were found to have virus whose PPR contained a segment of the human S19 ribosomal protein gene ¹³. Unlike these two cases, the TLS09-4 strain from our patient had, in frame, a short fragment of the inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 2 (ITI-H2) gene. All three of these recombinant events occurred at different positions in the PPR. The ITI is composed of 3 chains, two heavy (HC1 and HC2) and one light (bikunin), which confers the protease inhibitor function ²⁹. The ITI stabilizes the extracellular matrix in humans, but the role of the sequence inserted into the HEV genome is not clear.

The inserted sequence seems to promote virus growth in HepG2/C3A cells. While any of the non-synonymous mutations found in TLS09-4 could also influence virus replication in a cell culture system, the reduced immunosuppressive drug treatment suggests that they are more likely to help the virus escape the immune response than improve virus fitness. The complexity and diversity of TLS09-4 were also low. It was recently shown that reduced genetic diversity has a negative impact on chikungunya virus fitness³⁰. The replicative fitness of this strain should, therefore, have been impaired, which was not the case. Perhaps the inserted sequence offset the loss of virus fitness due to the non-synonymous mutations. Just

how it improved HEV replication has yet to be elucidated. The effect of the insert in the Kernow-C1 strain was due to the encoded peptide rather than the RNA since introducing synonymous mutations into the insert did not affect virus replication¹². The inserted sequence encodes additional proline, alanine and serine residues, which are also found in IDR³¹. The insertion also provides a few phenylalanine and tyrosine residues. These new proline, alanine and serine residues could enhance peptide disorder and so improve virus replication. The insertion could also provide new regulation sites. We used bioinformatic prediction tools to show that the aa sequence of the inserted ITI fragment provides new putative regulation sites. The peptide encoded by the inserted sequence of the Kernow-C1 strain (Genbank n°HQ70917) and LBPR-0379 strain (Genbank n°JN564006) also has such sites. The sequences inserted in TLS09-4 provided at least two new ubiquitination, acetylation or phosphorylation sites, but no glycosylation or methylation sites. The peptides derived from the Kernow strain with reversed or reversed complementary insert have fewer regulation sites, especially acetylation or ubiquitination sites, and they lost their *in vitro* replicative advantage¹¹. Hence, ubiquitination or acetylation sites may improve virus fitness.

The conjugation of ubiquitin to substrates usually leads to the degradation of a peptide by the proteasome. Viruses may hijack the ubiquitin/proteasome system (UPS). It was shown recently that replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin proteasome system to ensure the efficient recruitment of virus protein to the viroplasm³². Ubiquitination of the polymerase of Coxsackie virus B3 is also necessary for completion of the viral lifecycle³³. HEV may also manipulate the UPS to regulate its lifecycle, especially since it was shown recently that inhibiting active UPS affects HEV replication, possibly by inhibiting transcription or translation³⁴. Although the influence of PPR ubiquitination on the regulation of virus replication must still be determined, these findings suggest that the UPS regulates HEV replication. The function of cellular enzymes can be modified by phosphorylation^{35, 36}.

Virus proteins can also be phosphorylated. Phosphorylation of NS5B of the hepatitis C virus improved RNA replication³⁷. Similarly, acetylation of histone and non-histone proteins modulates protein function or the intracellular distribution of the protein^{38,39}. Acetylation of virus proteins can improve their function. The affinity of the integrase of HIV for DNA is increased by acetylation and its enzymatic activity is enhanced⁴⁰. While the lifecycle of HEV is not yet clear, the PPR could regulate transcription and translation through ubiquitination, acetylation or phosphorylation. Knowledge of the crystal structure of the protein encoded by the PPR region could also provide useful information about its molecular surface accessibility to enzymes.

In conclusion, we have shown that the HEV genome undergoes a limited number of changes during a 4-year chronic infection. The PPR is the most prone to mutation, perhaps because of its involvement in the adaptation of the virus to its host. The emergence of a virus-host recombinant variant in the PPR could provide a replicative advantage due to the new regulation sites into the inserted sequence.

Disclosures: None of the authors has any potential conflict.

Writing assistance: We thank Dr Owen Parkes for editing the English text

Authors' contribution:

LS: wrote the paper, provided technical support and interpreted data.

FA, KSS: interpreted data, performed statistical analysis.

MD: gave technical support.

NK, LR: responsible for patient follow-up.

JJ: designed the study, interpreted data, reviewed text.

1. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med* 2012;367:1237-44.
2. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet* 2012;379:2477-88.
3. Meng XJ, Anderson D, Arankalle A, et al. Hepeviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB; Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier. 2012:1021-8.
4. Grandadam M, Tebbal S, Caron M, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 2004;85:3189-94.
5. Perttola J, Spuul P, Ahola T. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J Gen Virol* 2013;94:807-16.
6. Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, et al. Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* 2013;33:3-14.
7. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008;358:811-7.
8. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, et al. HEV Quasispecies and the Outcome of Acute Hepatitis E in Solid-Organ Transplant Patients. *J Virol* 2012;86:10006-14.
9. 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* 2013. *In press*
10. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 2011;55:695-708.

11. 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;108:2438-43.
12. 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;86:5697-707.
13. 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;93:526-30.
14. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, et al. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* 2012;50:897-902.
15. Legrand-Abravanel F, Mansuy JM, Dubois M, et al. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 2009;15:110-4.
16. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, et al. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996;272:537-42.
17. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 1994;10:189-91.
18. Jukes T.H., T.R. C. Evolution of protein molecules. I. H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, Inc., New York, N. Y. 1969:21-132.
19. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
20. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999;294:1351-62.

21. Shao J, Xu D, Tsai SN, et al. Computational identification of protein methylation sites through bi-profile Bayes feature extraction. *PLoS One* 2009;4:e4920.
22. Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, et al. Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* 2008;137:86-96.
23. Bouquet J, Cheval J, Rogee S, et al. Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission. *J Virol* 2012;86:6238-45.
24. Pudupakam RS, Kenney SP, Cordoba L, et al. Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol* 2011;85:10031-40.
25. Pudupakam RS, Huang YW, Opriessnig T, et al. 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;83:384-95.
26. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8259-63.
27. Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLoS One* 2012;7:e35974.
28. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:197-208.
29. Bost F, Diarra-Mehrpour M, Martin JP. Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem* 1998;252:339-46.

30. Coffey LL, Beeharry Y, Borderia AV, et al. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16038-43.
31. Purdy MA. Evolution of the hepatitis E virus polyproline region: Order from disorder. *J Virol* 2012.
32. Lopez T, Silva-Ayala D, Lopez S, et al. Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* 2011;85:11964-71.
33. Si X, Gao G, Wong J, et al. Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3. *PLoS One* 2008;3:e2585.
34. Karpe YA, Meng XJ. Hepatitis E virus replication requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* 2012;86:5948-52.
35. Wang X, Chuang HC, Li JP, et al. Regulation of PKC-theta function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Front Immunol* 2012;3:197.
36. Derouiche A, Cousin C, Mijakovic I. Protein phosphorylation from the perspective of systems biology. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:585-90.
37. Kim SJ, Kim JH, Kim YG, et al. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:50031-41.
38. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005;363:15-23.
39. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:435-59.
40. Cereseto A, Manganaro L, Gutierrez MI, et al. Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *Embo J* 2005;24:3070-81.

Table 1: Nucleotide identity between the strains isolated in adjacent years (%).

	2005 vs 2004	2006 vs 2005	2007 vs 2006	2008 vs 2007
Complete genome	99.67	99.66	99.81	99.27
Complete ORF1	99.87	99.71	99.88	99.17
Methyltransferase	99.64	99.27	98.54	98.54
Y domain	99.69	98.77	99.69	99.08
Papain like cysteine Protease	99.79	100	99.79	98.76
PPR	100	99.40	99.40	98.50
X domain	100	99.58	98.95	99.16
Helicase	100	100	100	99.59
RdRp	99.93	100	100	99.45
Complete ORF2	99.85	99.90	99.95	99.85
ORF2-S	100	100	100	99.90
ORF2-M	99.75	99.75	100	99.75
ORF2-P	99.68	99.84	99.84	99.84
ORF3	100	100	100	100

PPR: polyproline region; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase

Table 2: Evolution of the entire genome sequences of the 5 virus strains.

Region	Nucleotide position	TLS09-0	TLS09-1	TLS09-2	TLS09-3	TLS09-4
Me-transferase	589	G/Val	R/Val-Ile	G/Val	G/Val	G/Val
Me-transferase	647	A/Asn	A/Asn	A/Asn	A/Asn	R/Asn-Ser
Me-transferase	695	M/His-Pro	M/His-Pro	A/His	A/His	M/His-Pro
Y domain	730	M/Pro-Thr	M/Pro-Thr	A/Thr	A/Thr	M/Pro-Thr
Y domain	778	M/Ile-Leu	M/Ile-Leu	A/Ile	A/Ile	M/Ile-Leu
Y domain	788	M/His-Pro	M/His-Pro	A/His	A/His	M/His-Pro
Y domain	896	C/Ser	Y/Ser-Leu	C/Ser	C/Ser	C/Ser
Y domain	1006	T/Phe	T/Phe	T/Phe	Y/Leu-Phe	T/Phe
PPR	2168	C/Ala	C/Ala	S/Ala-Gly	C/Ala	C/Ala
PPR	2474	T/Leu	T/Leu	T/Leu	T/Leu	C/Pro
PPR	2476	A/Thr	A/Thr	A/Thr	A/Thr	G/Ala
PPR	2495	C/Val	C/Val	C/Val	C/Val	T/Ala
PPR	2500	G/Glu	G/Glu	R/Glu-Lys	G/Glu	G/Glu
PRR	2301-2376					Insertion
X domain	2573	Y/Val-Ala	Y/Val-Ala	Y/Val-Ala	Y/Val-Ala	T/Val
X domain	2686	C/His	C/His	Y/His-Tyr	C/His	C/His
Helicase	3040	A/Ile	R/Ile-Val	R/Ile-Val	R/Ile-Val	G/Val
RdRp	4147	A/Thr	A/Thr	A/Thr	A/Thr	R/Thr-Ala
RdRp	4943	G/Arg	G/Arg	G/Arg	G/Arg	R/Gln-Arg
P domain	6730	G/Trp	T/Cys	G/Trp	G/Trp	G/Trp

Sequences from the complete genome were aligned and analysed. Nucleotide/corresponding amino acid.

PPR: polyprolin region; Me-transferase: methyl transferase; PCP: papain-like cystein protease; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase.

Bold: non-synonymous mutation.

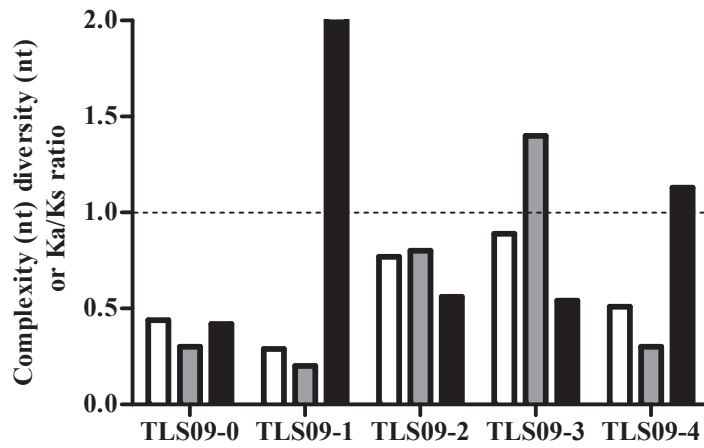


Figure 3: Complexity, diversity and Ka/Ks ratio of the PPR at the acute phase and during chronic infection.

White bar: nucleotide entropy (complexity); grey bar: mean nucleotide distance (diversity) (10^{-2}); black bar: Ka/Ks ratio.

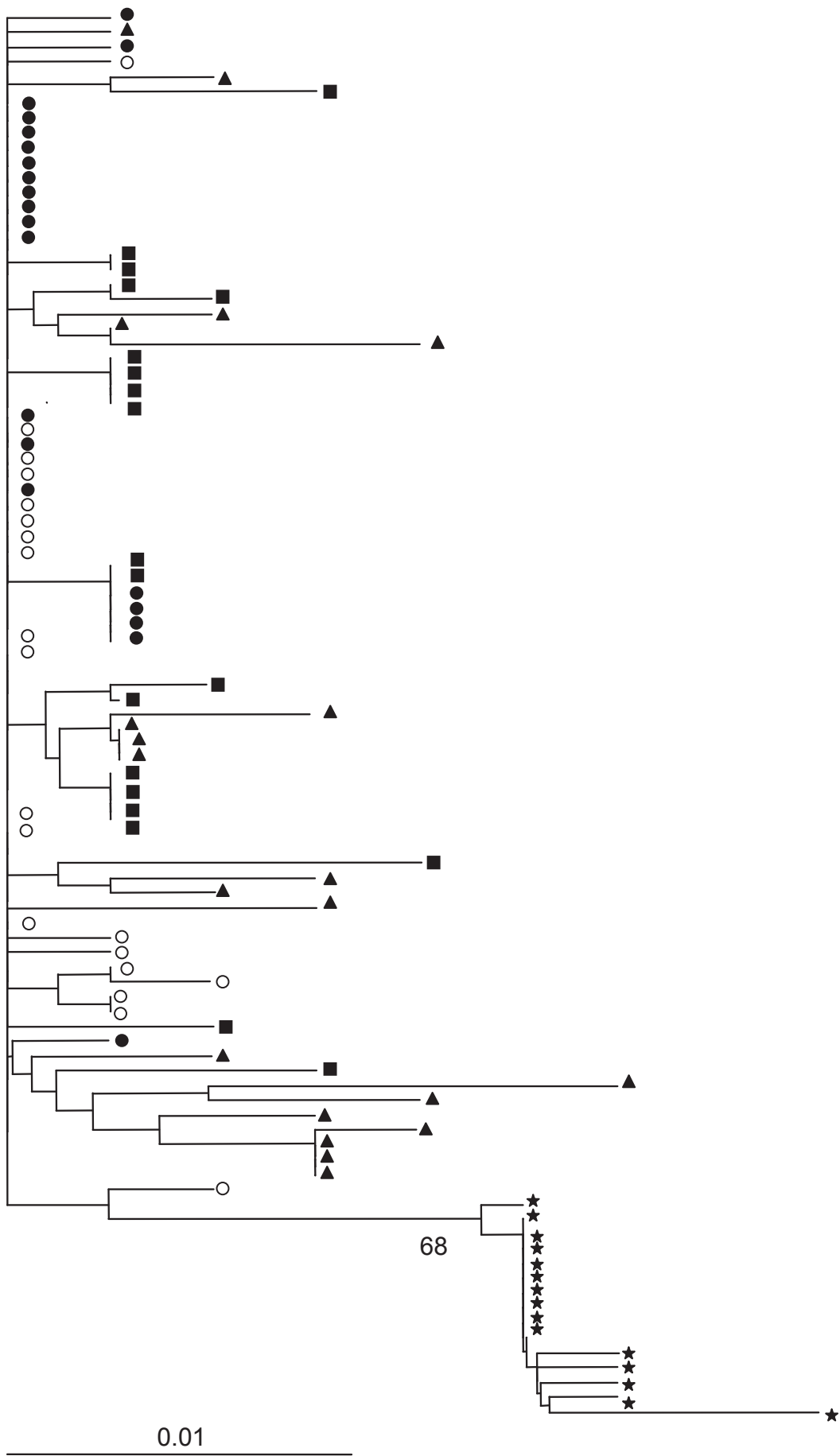


Figure 4: Phylogenetic tree based on PPR sequences (333nt) obtained by clonal analyses.

Empty circles: clone sequences of TLS09-0; filled circles: TLS09-1; square: TLS09-2; triangle:

TLS09-3; star: TLS09-4.

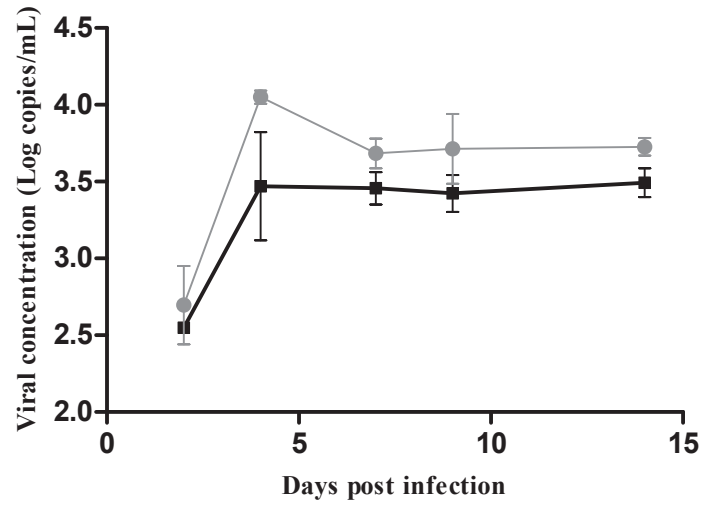


Figure 5: Growth of TLS09-4 and TLS09-3 in cell culture.

Growth of TLS09-4 (with human-sequence insert) and TLS09-3 (without insert) strains on HepG2/C3A cells.

Grey circle: TLS09-4 strain; Dark square: TLS09-3 strain. Error bars show SEM.

Discussion

Au cours de nos travaux, nous avons montré que l'hétérogénéité de la quasi-espèce était associée à la persistance virale chez l'immunodéprimé. D'autre part, la faible hétérogénéité de la quasi-espèce lors de la phase chronique était associée à la progression de la fibrose hépatique. Des différences de sécrétion de cytokines/chimiokines ont également pu être mises en évidence. Enfin, le suivi de l'évolution du génome du VHE lors d'une infection chronique nous a permis de caractériser l'insertion d'un fragment génomique humain qui semble conférer un avantage répliatif en culture cellulaire.

Etude de la quasi-espèce virale.

Etude de la quasi-espèce virale à la phase aiguë.

Notre étude de la quasi-espèce virale à la phase aiguë a mis en évidence une plus grande complexité et diversité de la quasi-espèce virale chez les patients développant une infection chronique. Cette plus grande hétérogénéité a été décrite aussi bien dans la région codant la protéine de capsid que dans la région codant la région riche en proline et le macro domaine. Des études portant sur le VHC ont également mis en évidence une plus grande hétérogénéité de la région hypervariable 1 (HVR-1) de la glycoprotéine d'enveloppe E2 dans la quasi-espèce présente chez les patients développant une infection chronique (Farci et al., 2000; Ray et al., 1999). Ces études avaient montré que la quasi-espèce virale présente chez les patients développant une infection chronique était plus hétérogène (Farci et al., 2000). Cette plus grande hétérogénéité observée chez les patients chroniquement pourrait être le reflet d'un moins bon contrôle immunitaire de la réplication virale conduisant à l'accumulation des différents variants générés. Parmi ces variants, il se peut que certains soient plus aptes à persister. Inversement, chez les patients éliminant le virus spontanément, les différents variants sont éliminés au fur et à mesure, rendant la quasi-espèce plus homogène.

Ainsi, l'hétérogénéité de la quasi-espèce observée au moment de la phase aiguë pourrait prédire l'éradication spontanée du VHE ou sa persistance. Chez les patients chroniquement infectés par le VHC, il a également été montré que l'étude de la quasi-espèce au moment de l'instauration du traitement pouvait prédire l'échec thérapeutique (Kumar et al., 2008). En effet, une grande complexité/diversité de la quasi-espèce virale dans la région HVR-1 était associée à un échec du traitement par IFN chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Kanazawa et al., 1994). De même, avant traitement, des mutations non synonymes sont plus

fréquemment retrouvées comparativement aux mutations synonymes dans la région HVR-1 des virus des patients qui vont répondre au traitement par IFN (Sandres et al., 2000). Ainsi, les réponses immunes B et T pourraient permettre la diversification de la quasi-espèce sans pour autant conduire à l'élimination du virus.

L'étude de la pression de sélection exercée sur la quasi-espèce a montré que celle-ci était plus importante sur le domaine M de la capsidie chez les patients éliminant spontanément le virus. Le domaine M représente un épitope T (Aggarwal et al., 2007), ce qui renforce l'idée selon laquelle la réponse cellulaire est essentielle pour l'éradication virale. Aucune différence de pression de sélection n'a été objectivée sur le domaine P, la région riche en proline ou le macro domaine. Il semblerait donc que ces domaines ne jouent pas de rôle dans l'éradication du virus. Ces données doivent néanmoins être confirmées sur un plus grand effectif. Les rapports Ka/Ks du domaine M étaient tous les deux inférieurs à 1, témoignant d'une pression de sélection négative, celle-ci étant plus forte chez les patients développant une infection chronique. Les pressions de sélection étaient également négatives pour le domaine P, la PPR ou le macro domaine. Ainsi, il semblerait que les contraintes structurales ou fonctionnelles soient très importantes pour les régions étudiées. Cependant, l'interprétation du rapport Ka/Ks dans le cas de la quasi-espèce doit se faire avec précaution. En effet, l'utilisation du Ka/Ks repose sur le principe selon lequel les mutations non synonymes sont «fixées» dans la séquence. Quand on compare des séquences proches entre elles comme dans le cas de la quasi-espèce, on ne sait pas si les mutations non synonymes sont transitoires ou non (Rocha et al., 2006). Ainsi, les Ka/Ks calculés à partir de séquences issues d'une même population ne sont pas forcément un bon indicateur de la nature de la pression de sélection (Kryazhimskiy et al., 2008).

Impact de la quasi-espèce sur la fibrose hépatique.

La comparaison de la quasi-espèce virale chez les patients chroniquement infectés a mis en évidence une plus faible diversification de la région codant le domaine P de la capsidie lors de la première année d'infection chez les patients ayant une progression de la fibrose hépatique. Dans le cas du VHC, plusieurs études ont montré qu'une plus faible diversification de la quasi-espèce au niveau de la région HVR-1 était associée à une progression de la fibrose hépatique. Cet événement pourrait correspondre à la sélection de variants d'emblée mieux adaptés à l'hôte ou plus pathogènes (Izopet et al., 2000). L'émergence d'un nouveau variant devenant majoritaire dans la quasi-espèce pourrait correspondre à une étape clé dans les mécanismes

menant à la fibrose. Chez les patients transplantés, il a été montré que l'homogénéisation de la quasi-espèce du VHC précédait la fibrose (Sullivan et al., 2007). Chez les patients ne présentant pas de progression de la fibrose hépatique, la diversité de la région HVR-1 du VHC pourrait être due à la sélection par la réponse humorale (Rosa et al., 1996; Weiner et al., 1992). Dans ces études, la réponse immune contre HVR-1 n'a pas été étudiée mais soulève la possibilité qu'une réponse humorale dirigée contre HVR-1 pourrait être protectrice vis-à-vis de la fibrose. L'implication du système immunitaire semble d'autant plus probable que l'atteinte hépatique liée au VHC est plus sévère chez les patients les plus immunodéprimés.

Il a récemment été montré que les mécanismes conduisant à la fibrose hépatique lors d'une infection par le VHC se mettaient en place de façon précoce (Farci et al., 2012). Les patients présentant une évolution rapide de la maladie montrent une réponse immune adaptative réduite ou retardée en association avec des charges virales élevées et une élévation persistante des chimiokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques : MCP-1, IL-8 et IP-10. Les taux de ces chimiokines à la phase aiguë pourraient servir de marqueur prédictif de la progression rapide de la maladie hépatique. MCP-1 reste à des taux élevés tout au long de l'infection. Il s'agit d'un médiateur critique de la fibrose hépatique via une boucle autocrine médiée par les cellules hépatiques stellaires, les 1^{ères} cellules effectrices de la fibrogénèse. De plus, l'allèle 2518G du gène codant pour MCP-1 a été plus fréquemment retrouvé chez les patients chroniquement infectés par le VHC et présentant une fibrose hépatique avancée (Muhlbauer et al., 2003). Ce résultat suggère que la fibrose hépatique chez les progresseurs rapides est secondaire à une inflammation intra-hépatique soutenue : les lésions hépatiques ne seraient donc pas induites par les cellules T effectrices spécifiques du virus mais par l'infiltration massive et l'activation de cellules inflammatoires non spécifiques et le relargage continu de médiateurs de l'inflammation et profibrogénique sur les cellules hépatiques stellaires (Farci et al., 2012).

Limites de l'étude de la quasi-espèce par clonage conventionnel et alternatives.

Le clonage conventionnel permet l'analyse d'un nombre limité de clones et ne fournit donc pas une représentativité exhaustive de la quasi-espèce. L'étude de 20 clones permet la détection de variants constituant au moins 10% de la quasi-espèce. L'étude de 40 clones permet la mise en évidence de variants constituant au moins 5% de la quasi-espèce virale. L'augmentation du nombre de clones étudiés permet ainsi d'augmenter le seuil de sensibilité de

détection des variants minoritaires. La lourdeur de cette technique limite cependant son utilisation. De plus, l'augmentation du nombre de clones analysés ne permet pas toujours la mise en évidence de variants rares. Par exemple, l'analyse de 120 clones n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un variant du VHE contenant l'insertion d'un gène humain codant la fraction ribosomique S17 (Shukla et al., 2011).

Les techniques de séquençage haut-débit permettent de générer plusieurs milliers de séquences clonales en quelques heures et pour plusieurs échantillons. Une étude comparative a montré que le clonage puis séquençage par méthode Sanger détectait 3632 mutations sur 1503 nucléotides du gène *gag* du VIH, avec une moyenne de 53 mutations par échantillon (Liang et al., 2011). L'analyse des mêmes échantillons par pyroséquençage a permis la détection de 14034 variations avec en moyenne 204 variations par échantillon. Cette technique a permis la mise en évidence de 4215 mutations présentes à une fréquence inférieure à 2%, témoignant de la sensibilité de cette technique. Pour obtenir une couverture similaire par clonage conventionnel, il faudrait amplifier et séquencer au moins 384 clones par échantillon, ce qui représente un coût et une charge de travail pratiquement inaccessible.

Si les techniques haut-débit semblent très prometteuses pour l'étude d'une quasi-espèce, la maîtrise des biais liés aux étapes d'amplification pré-pyroséquençage est indispensable. En effet, les étapes d'amplification par RT-PCR/PCR peuvent générer des erreurs dans les séquences. La grande majorité (80%) des erreurs de substitutions retrouvées après pyroséquençage aurait lieu durant ces étapes (Shao et al., 2013; Vandembroucke et al., 2011). Les artefacts de PCR sont donc susceptibles d'augmenter artificiellement la diversité de la quasi-espèce virale d'un échantillon et compliquent l'analyse des variants authentiques après pyroséquençage. La maîtrise de ces paramètres est donc capitale pour la bonne interprétation des résultats obtenus. Une étude récente suggère l'utilisation d'une balise, constituée de nucléotides dégénérés, pour marquer chaque molécule d'ADN complémentaire (ADNc) (Jabara et al., 2011). Ainsi, chaque variant de la quasi-espèce est marqué par une balise unique. Cette balise permet de regrouper toutes les séquences issues du même variant originel qui ont été générées après l'introduction d'erreurs survenues au cours des différentes étapes de pyroséquençage (Jabara et al., 2011). Cependant, cette approche ne permet pas d'exclure le fait que 2 molécules d'ADNc différentes se retrouvent par hasard avec la même balise, ce qui conduirait à une élimination excessive de séquences (Liang et al., 2013).

Les techniques de séquençage haut-débit ont été utilisées pour la détection de variants minoritaires non détectés par les méthodes classiques lors d'un traitement par inhibiteur de la transcriptase inverse chez des patients infectés par le VHB (Margeridon-Thermet et al., 2009) ou le VIH (Delobel et al., 2011) ou pour la recherche de variants minoritaires dans le cas de l'étude du tropisme du VIH (Saliou et al., 2011).

La taille restreinte à 800 nt des fragments à analyser constitue une limite de cette technique pour l'étude des génomes viraux. Cependant, les améliorations technologiques devraient rapidement permettre l'analyse de plus grands fragments (Zagordi et al., 2012).

Etude de la réponse immunitaire.

La description de la quasi-espèce à la phase aiguë n'est qu'un marqueur indirect de la réponse immunitaire mise en place au cours de l'infection par le VHE. Ainsi, nous avons étudié la sécrétion de différentes cytokines/chimiokines lors de la phase aiguë.

La réponse inflammatoire.

La comparaison de sécrétion de cytokines induites lors de l'inflammation a mis en évidence des concentrations plus faibles de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1. Les concentrations en TNF- α avaient également tendance à être plus faibles chez les patients développant une infection chronique. Il avait été montré que dans le cas du VHE, la réponse immunitaire innée jouait un rôle important dans l'éradication virale chez le chimpanzé, en comparaison avec ce qui avait été observé dans le cas du VHC (Yu et al., 2010). Nos données objectivent une réponse immunitaire innée moindre chez les patients développant une infection chronique, ce qui est concordant avec les observations rapportées par l'étude de Yu : la réponse immunitaire innée est importante pour le contrôle de l'infection par le VHE. La différence observée de sécrétion de cytokines inflammatoires pourrait être due à une protéine virale du VHE. En effet, dans le cas du virus de l'hépatite murine, il a été montré que le macro domaine était impliqué dans l'inflammation. La substitution d'un aa était responsable de la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Eriksson et al., 2008). Au sein de la quasi-espèce présente chez les patients développant une infection chronique, il est possible que certains variants inhibent la sécrétion de cytokines impliquées dans l'inflammation.

Il a été montré *in vitro* que l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 stimule la synthèse de l'IFN- λ par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Megjugorac et al., 2010). Il participe aux défenses antivirales innées en stimulant la synthèse de la 2'-5' oligoadénylate synthase et de la protéine MxA (Kotenko et al., 2003). Le TNF- α , pour sa part, recrute et active les macrophages, les NK et les cellules T (Tracey et al., 1994). La diminution de sécrétion de ces 2 cytokines peut conduire à une altération de la réponse innée et du recrutement des cellules effectrices.

Cytokines induites lors de l'activation des lymphocytes.

Le récepteur soluble à l'IL-2 (sIL-2R) présente des concentrations plus faibles chez les patients développant une infection chronique, indiquant une activation moindre des lymphocytes T chez ces patients. La réponse cellulaire T joue un rôle majeur dans l'élimination des virus de l'hépatite B et C (Lechner et al., 2000). Ainsi, une altération de la réponse T conduit à la persistance virale. Cette différence d'activation entre patients éliminant le virus spontanément et les patients développant une infection chronique pourrait être liée au traitement immunosuppresseur. Il a en effet été montré que la prise de tacrolimus par rapport à la ciclosporine était un des principaux facteurs associé au passage à la chronicité (Kamar et al., 2011). Le tacrolimus est une molécule appartenant à la famille des anti-calcineurines, comme la ciclosporine, mais possède un effet immunosuppresseur supérieur à cette dernière (McAlister et al., 2006). Ainsi, la différence d'activation observée entre patients éliminant le virus spontanément et ceux développant une infection chronique pourrait s'expliquer par un traitement immunosuppresseur plus « agressif » chez les patients développant une infection chronique. L'implication du traitement immunosuppresseur dans le développement de l'infection chronique est d'autant plus vraisemblable que son allègement conduit à l'éradication virale dans 32% des cas (Kamar et al., 2010a). Certaines molécules immunosuppressives pourraient avoir une activité antivirale. Il a par exemple été montré que la ciclosporine possédait une activité antivirale sur le VHC (Watashi et al., 2003). Ainsi, l'effet immunosuppresseur moindre et l'activité antivirale de la ciclosporine pourraient expliquer la moins grande fréquence du passage à la chronicité du VHE chez ces patients, bien que l'activité antivirale n'ait pas encore été démontrée sur le VHE. Le mycophénolate mofétil pourrait également posséder une activité antivirale sur le VHE (Pan et al., 2012; Pischke et al., 2012).

Enfin, les taux de sIL-2R étaient positivement corrélés à l'activité des aminotransférases, marqueurs de la lyse des hépatocytes et marqueurs indirects de l'activité de la lyse des hépatocytes infectés. Il a été précédemment décrit qu'une activité plus élevée des aminotransférases au moment de la phase aiguë était associée à l'éradication virale (Legrand-Abravanel et al., 2010). Nous avons donc mis en évidence une association entre le taux d'activation des lymphocytes T et la lyse des hépatocytes.

Etude des cytokines Th1-Th2.

Notre étude n'a pas mis en évidence de différence de sécrétions de cytokines de type Th1 ou Th2. Pourtant, il a été suggéré que les patients développant une infection chronique présentaient une altération de la réponse cellulaire au profit d'une réponse de type Th2 (Suneetha et al., 2011). En effet, la stimulation des PBMC des patients développant une infection chronique conduisait à une faible sécrétion d'IFN- γ comparativement aux patients éliminant le virus spontanément. L'IL-10 était sécrétée à des taux élevés par les PBMC de certains patients ayant développé une infection chronique. Le blocage des récepteurs inhibiteurs PD-1 et/ou CTLA-4 permettait de rétablir une réponse T efficace, objectivée par le rétablissement de la sécrétion d'IFN- γ *in vitro*. Cette étude a été réalisée *in vitro* alors que nous avons réalisé un dosage endogène de ces cytokines, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence pour les taux de cytokines étudiées. Cependant, il a été montré dans le cas du VHC que le déséquilibre entre la réponse de type Th1 et Th2 conditionnait l'issue de la phase aiguë (Gramenzi et al., 2005). Il a également été montré une compartimentation de la réponse immunitaire : la réponse de type Th2 se fait principalement dans les tissus lymphoïdes périphériques tandis que la réponse de type Th1 a lieu au niveau hépatique (Minutello et al., 1993). Il serait donc intéressant de comparer les profils cytokiniques observés en périphérie et au niveau hépatique.

Etude de la sécrétion de chimiokines.

Cinq chimiokines présentent des taux plus élevés chez les patients développant une infection chronique : RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), IL-8 (CXCL8) et MCP-1 (CCL2).

RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sont des ligands de CCR5. Le rôle des cellules CCR5+ a été évoqué dans la physiopathologie de l'infection à VHE (TrehanPati et al., 2011). En effet, lors d'une hépatite E aiguë, il a été montré une augmentation d'expression de CCR5 sur les lymphocytes T. MCP-1 favorise le recrutement des monocytes et des macrophages via le récepteur CCR2 (Wald et al., 2007). L'IL-8 intervient dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles via le récepteur CXCR1 (Taub et al., 1996) et inhibe l'action de l'IFN- α (Khabar et al., 1997). Cela peut sembler paradoxal que des taux élevés de chimiokines, des molécules recrutant les cellules effectrices sur le site de l'infection, soient associés à la persistance du VHE. Cependant, ces concentrations élevées de chimiokines pourraient conduire à l'internalisation des récepteurs aux chimiokines sur les cellules T, diminuant leur expression à la surface des cellules.

Dans le cas du VHC, il a été montré que des taux élevés d'IP-10 (ou CXCL10) au moment de la phase aiguë étaient associés à la persistance virale (Grebely et al., 2013). De même, des taux élevés d'IP-10 lors de la phase chronique étaient prédictifs de l'échec du traitement par IFN/ribavirine (Askarieh et al., 2010). Comme dans le cas de la persistance du VHE, des taux élevés de chimiokines sont associés à la persistance du VHC. Cette situation paradoxale a récemment été expliquée : la forme détectée d'IP-10 chez les patients chroniquement infectés par le VHC correspond en fait à une forme antagoniste non active. Ces taux élevés s'accompagnaient d'un grand nombre de cellules CXCR3+ circulantes (lymphocytes B et T effecteurs), témoignant donc du mauvais recrutement des cellules effectrices au niveau hépatique (Casrouge et al., 2011). Dans le cas du VHE, il pourrait être intéressant de vérifier la fonctionnalité des chimiokines détectées. De plus, la quantification des cellules portant les récepteurs CCR5, CCR2 et CXCR1 pourrait également apporter de précieuses informations quant aux mécanismes de recrutement hépatique chez les patients développant une infection chronique. L'étude des cellules infiltrées au niveau hépatique permettrait également d'objectiver une altération éventuelle des mécanismes de recrutement des cellules effectrices. Ce travail peut être envisagé sur des biopsies hépatiques congelées ayant été réalisées lors de la phase aiguë.

Evolution du génome du VHE lors de l'infection chronique.

Adaptation à un nouvel hôte.

Dans notre étude nous avons montré que le VHE présentait un nombre limité de mutations lors de la transmission puis l'adaptation à un hôte immunodéprimé. Parmi les 59 mutations répertoriées (0.8% sur l'ensemble du génome), seulement 19 (32%) correspondaient à des mutations non synonymes. L'adaptation de souches de VHE en culture a également montré un nombre limité de mutations (0.3% de mutations sur l'ensemble du génome) (Lorenzo et al., 2008). Ces 2 études suggèrent que l'adaptation à un nouvel hôte ou à un nouveau système de réplication nécessite peu de mutations en l'absence de pression immune. Une étude a analysé les modifications génomiques survenant lors du passage d'une souche de génotype 3 de l'homme au porc (Bouquet et al., 2012). Cette étude n'a montré aucune différence entre les séquences consensus des génomes de la souche transmise de l'homme au porc, indiquant ainsi que le franchissement de la barrière d'espèce de l'homme au porc se fait sans modification de la séquence consensus du génome du VHE. Dans notre étude, ORF1 est la région présentant le plus de mutations non synonymes, notamment au niveau de la région riche en proline. Cette région a déjà été proposée comme intervenant dans l'adaptation à un nouvel hôte même si son rôle est encore mal connu (Purdy et al., 2012). Il pourrait s'agir d'une région intrinsèquement désordonnée (Dyson et al., 2005), ce qui renforcerait son rôle supposé dans l'adaptation à un nouvel hôte. L'analyse de la quasi-espèce a montré une pression de sélection positive associée à une faible complexité/diversité à 2 moments : un an après la phase aiguë d'une part et, d'autre part, lors d'une diminution de posologie du traitement immunosuppresseur. Ces 2 événements pourraient correspondre à des goulots d'étranglement qui sont caractérisés par une diminution de la complexité/diversité de la quasi-espèce. De plus, cette diminution de l'hétérogénéité de la quasi-espèce s'accompagne d'une pression de sélection élevée par rapport aux autres temps. Le premier goulot d'étranglement pourrait correspondre à l'adaptation du virus à son nouvel hôte : seulement quelques variants ont pu coloniser le nouvel environnement à l'issue de la phase aiguë. Après cette adaptation, la quasi-espèce s'est diversifiée suite aux erreurs commises par la polymérase. Le 2^{ème} goulot d'étranglement survient lors de l'allègement du traitement immunosuppresseur, suggérant qu'une nouvelle force de sélection s'est appliquée sur la quasi-espèce. En effet, l'allègement du traitement par tacrolimus a probablement conduit à une meilleure réponse immune cellulaire. De plus, c'est à ce moment qu'apparaît l'insertion dans la PPR, peut être pour compenser la

perte de capacité répliquative induite par les mutations ou pour favoriser l'échappement au système immunitaire.

Contrairement à ORF1 et ORF2, aucune mutation n'a été observée dans ORF3, suggérant que de fortes contraintes fonctionnelles s'exercent sur cette région.

Etude de l'insertion.

Au cours du suivi de l'évolution du génome du VHE chez le patient chroniquement infecté, une insertion a été détectée dans la PPR. Ce fragment inséré correspond à une portion du gène codant la chaîne lourde de l'inter alpha trypsine inhibiteur 2 (ITI-H2). Les 2 souches virales actuellement décrites dans la littérature possèdent une insertion dans la PPR correspondant à un fragment de gène codant pour la fraction ribosomique S17 (souche Kernow-C1) ou S19 (souche LBPR-0379) (Nguyen et al., 2012; Shukla et al., 2011). Ces virus recombinants ont respectivement été mis en évidence lors de la culture cellulaire de selles d'un patient infecté depuis 2 ans par le VHE et dans le sérum d'un patient infecté depuis 10 mois. Le délai d'émergence de ce type de variant semble aléatoire et la sélection peut n'avoir lieu qu'en culture cellulaire. Dans les 3 cas, les variants avec insertion possèdent un avantage répliquatif en culture cellulaire. Il ne semble pas y avoir de point commun entre les 3 insertions décrites à ce jour : S17, S19 et ITI-H2. De plus, la position de l'insertion, hormis le fait d'être localisée dans la PPR, n'est pas identique d'une souche à l'autre. Les mécanismes conduisant à un avantage répliquatif restent donc inconnus. L'allongement de la séquence de la PPR ne semble pas suffisant pour conférer un avantage répliquatif. En effet, l'introduction d'une insertion dérivée de la séquence anti-sens ou anti-sens complémentaire du fragment du gène codant la fraction ribosomiques S17 ne fournit pas d'avantage répliquatif à la souche Kernow-C1 (Shukla et al., 2011). L'introduction de mutations synonymes dans la séquence insérée permettait la conservation de l'avantage répliquatif conféré à la souche Kernow-C1, ce qui suggère l'importance de la séquence en aa plutôt qu'en nucléotide (Shukla et al., 2012). La composition en aa de la séquence semble donc être essentielle. L'étude des séquences des 3 insertions décrites à ce jour montre qu'elles sont riches en proline, en alanine et en sérine. Ces aa sont souvent retrouvés dans les régions intrinsèquement désordonnées (Dyson et al., 2005). L'apport de ces aa pourrait augmenter le désordre de la PPR et *in fine* améliorer la réplication virale. Une autre hypothèse est que ces aa fournissent de nouveaux sites de régulation, comme le suggèrent nos études *in silico*, notamment des sites d'ubiquitination, acétylation ou

phosphorylation. Il est intéressant de noter que l'analyse des séquences anti-sens et anti-sens complémentaire du fragment S17 montre une perte de ces sites de régulation.

La fixation d'ubiquitine sur une protéine conduit à sa dégradation par le protéasome. Les virus ont développé des mécanismes de détournement du système ubiquitine/protéasome. Par exemple, le rotavirus détourne ce système pour le recrutement des protéines virales dans les viroplasmés (Lopez et al., 2011). Dans le cas du coxsackie virus B3, l'ubiquitination de la polymérase était nécessaire au cycle viral (Si et al., 2008). On peut donc supposer que le VHE détourne ce système pour son propre cycle viral. Karpe et Meng ont montré que l'inhibition du protéasome inhibe la réplication du VHE, possiblement en inhibant la transcription ou la traduction virale (Karpe et al., 2012). La phosphorylation des protéines virales peut également modifier leur fonctionnement. Par exemple, la phosphorylation de la protéine NS5B du VHC améliore la réplication (Kim et al., 2004). L'acétylation des protéines virales comme l'intégrase du VIH peut améliorer l'affinité de cette protéine pour l'ADN et améliorer l'activité enzymatique (Cereseto et al., 2005). Le cycle de réplication du VHE n'étant pas encore élucidé, on peut supposer que la PPR régule la transcription et/ou la traduction via ces sites de régulation.

L'insertion pourrait également avoir un rôle dans la physiopathologie de l'infection. Dans le cas du virus de l'hépatite C, il a été montré que l'insertion d'un aa dans la région HVR-1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 était associée à la présence d'une cryoglobulinémie mixte de type 2 chez les patients chroniquement infectés (Gerotto et al., 2001). L'insertion pourrait faciliter l'interaction avec certains récepteurs. Ces récepteurs pourraient être à l'origine du déclenchement de la prolifération des cellules B, expliquant l'association avec la cryoglobulinémie mixte de type 2. Cependant, l'avantage répliatif de ces souches pas plus que la reconnaissance d'un autre récepteur n'a été prouvé.

Enfin, la présence de cette insertion pourrait modifier la compartimentation de la quasi-espèce, lui permettant de franchir de nouvelles barrières afin d'atteindre de nouveaux compartiments comme cela a été décrit pour le VHC (Fishman et al., 2008). Une compartimentation de la quasi-espèce virale entre le sang et le LCR a été observée chez un patient transplanté rénal chroniquement infecté par le VHE (Kamar et al., 2010b).

D'autres insertions ont été observées dans le génome du VHE, en particulier chez le lapin, au niveau du macro domaine (Cossaboom et al., 2012a; Geng et al., 2011; Izopet et al.,

2012). L'origine et le rôle de cette insertion de 93 nt reste à déterminer. Une hypothèse de travail est qu'elle interviendrait dans la spécificité d'espèce. L'impact de la suppression de cette insertion sur l'adaptation à un système de culture ou sur le franchissement de la barrière d'espèce serait intéressant à étudier.

Synthèse et perspectives

En conclusion, nos travaux ont permis de mieux caractériser la quasi-espèce et la sécrétion des cytokines lors de la phase aiguë d'une infection par le VHE. Nous avons montré que la plus grande hétérogénéité de la quasi-espèce, une sécrétion plus faible d'IL-1Ra et de TNF- α , une activation plus faible des lymphocytes et une sécrétion plus élevée de chimiokines lors de la phase aiguë étaient associées à la persistance virale. L'étude de la quasi-espèce à l'aide des techniques de séquençage haut-débit permettra de confirmer dans d'autres régions l'évolution observée dans le macro domaine, la région riche en proline et les domaines M et P de la protéine de capsid. De même, il serait intéressant de déterminer l'origine de la diminution de sécrétion de cytokines inflammatoires chez les patients développant une infection chronique. Est-elle liée au traitement immunosuppresseur ou existe-t-il une protéine virale comme par exemple le macro domaine capable d'inhiber la réponse inflammatoire ? L'étude de certains polymorphismes comme celui de l'IL-28B dont on connaît l'importance pour le VHC (Ge et al., 2009) serait également intéressante. Nos travaux n'ont pas mis en évidence de différence de sécrétion de cytokines de type Th1 et Th2 dans le plasma. Du fait de la compartimentation de la réponse immunitaire, l'étude des profils cytokiniques au niveau hépatique pourrait permettre d'objectiver une différence entre les patients éliminant spontanément le virus et ceux développant une infection chronique. L'accès à des biopsies hépatiques réalisées au moment de la phase aiguë permettrait également d'étudier le recrutement des cellules effectrices. Enfin, il serait intéressant d'étudier la réponse immunitaire lors d'un traitement par ribavirine, ceci afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette molécule dont l'activité sur le VHE a été démontrée (Kamar et al., 2010d).

Le suivi de l'évolution du génome du VHE nous a permis de montrer que la séquence consensus du virus isolé chez un patient chroniquement infecté subit un nombre limité de variations au cours du temps. C'est la région riche en proline qui subit le plus de modifications, suggérant son rôle dans l'adaptation à l'hôte. C'est également dans cette région que nous avons pu mettre en évidence un nouveau type d'insertion. L'origine et la longueur du fragment de gène inséré était différente de celles décrites jusqu'à présent. Il semblerait donc que ce soit la nature des aa plutôt que la longueur ou la structure de l'insertion qui favorise la réplication *in vitro*. Cet avantage répliatif pourrait également être fourni par l'apparition de nouveaux sites d'ubiquitination, de phosphorylation ou d'acétylation. Des études de mutagenèse dirigée pour analyser individuellement l'impact des sites potentiels de régulation ou de certains acides aminés sont nécessaires pour tester ces hypothèses.

Enfin, il apparaît important de mieux caractériser les circonstances d'apparition et d'émergence de tels variants. Leur association à des manifestations cliniques devra également être étudiée. Compte tenu de leur sensibilité, l'utilisation de techniques de séquençage haut-débit devra être envisagée pour la recherche systématique de variants possédant une insertion. Cette recherche systématique permettra d'estimer la prévalence de ces variants recombinants.

Bibliographie

- Abdel Hady, S. I., El-Din, M. S., and El-Din, M. E. (1998). A high hepatitis E virus (HEV) seroprevalence among unpaid blood donors and haemodialysis patients in Egypt. *J Egypt Public Health Assoc* **73**(3-4), 165-79.
- Abid, S., and Khan, A. H. (2002). Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *Am J Gastroenterol* **97**(6), 1544-7.
- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Dubois, M., Peron, J. M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N., and Izopet, J. (2013). Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. *J Clin Microbiol* **51**(6), 1913-6.
- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Miedouge, M., Rostaing, L., Kamar, N., and Izopet, J. (2012a). Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients having anti-HEV antibodies. *American Association for th Study of Liver Diseases Abstract CRW-11*.
- Abravanel, F., Mansuy, J. M., Huynh, A., Kamar, N., Alric, L., Peron, J. M., Recher, C., and Izopet, J. (2012b). Low risk of hepatitis E virus reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* **54**(2), 152-5.
- Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Lhomme, S., Dubois, M., Mansuy, J. M., and Izopet, J. (2012c). Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* **50**(3), 897-902.
- Aebischer, T., Moskophidis, D., Rohrer, U. H., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). In vitro selection of lymphocytic choriomeningitis virus escape mutants by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24), 11047-51.
- Aggarwal, R. (2010). Hepatitis E virus and person-to-person transmission. *Clin Infect Dis* **51**(4), 477-8; author reply 478-9.
- Aggarwal, R. (2011). Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res* **161**(1), 15-22.
- Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S. R., and Krawczynski, K. (2000). Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* **356**(9235), 1081-2.
- Aggarwal, R., Shukla, R., Jameel, S., Agrawal, S., Puri, P., Gupta, V. K., Patil, A. P., and Naik, S. (2007). T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *J Viral Hepat* **14**(4), 283-92.

- Agrawal, S., Gupta, D., and Panda, S. K. (2001). The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* **282**(1), 87-101.
- Agrawal, V., Goel, A., Rawat, A., Naik, S., and Aggarwal, R. (2012). Histological and immunohistochemical features in fatal acute fulminant hepatitis E. *Indian J Pathol Microbiol* **55**(1), 22-7.
- Aguiar, R. C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., and Shipp, M. A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J Biol Chem* **280**(40), 33756-65.
- Anderson, J. P., Daifuku, R., and Loeb, L. A. (2004). Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol* **58**, 183-205.
- Arankalle, V. A., Chobe, L. P., and Chadha, M. S. (2006). Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J Viral Hepat* **13**(11), 742-5.
- Arias, A., Ruiz-Jarabo, C. M., Escarmis, C., and Domingo, E. (2004). Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. *J Mol Biol* **339**(2), 405-12.
- Askarieh, G., Alsio, A., Pugnale, P., Negro, F., Ferrari, C., Neumann, A. U., Pawlotsky, J. M., Schalm, S. W., Zeuzem, S., Norkrans, G., Westin, J., Soderholm, J., Hellstrand, K., and Lagging, M. (2010). Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **51**(5), 1523-30.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., and Poleschuk, V. F. (1983). Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**(1), 23-31.
- Barlow, K. L., Green, J., and Clewley, J. P. (2000). Viral genome characterisation by the heteroduplex mobility and heteroduplex tracking assays. *Rev Med Virol* **10**(5), 321-35.
- Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., and Pavio, N. (2012). Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* **78**(15), 5153-9.
- Batts, W., Yun, S., Hedrick, R., and Winton, J. (2011). A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* **158**(1-2), 116-23.
- Baylis, S. A., Hanschmann, K. M., Blumel, J., and Nubling, C. M. (2011). Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol* **49**(4), 1234-9.

- Beale, M. A., Tettmar, K., Szypulska, R., Tedder, R. S., and Ijaz, S. (2011). Is there evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors? *Vox Sang* **100**(3), 340-2.
- Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Ali, R., and Dalton, H. (2010). A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol* **82**(5), 799-805.
- Beniwal, M., Kumar, A., Kar, P., Jilani, N., and Sharma, J. B. (2003). Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: a prospective study from north India. *Indian J Med Microbiol* **21**(3), 184-5.
- Bertoletti, A., Ferrari, C., Fiaccadori, F., Penna, A., Margolskee, R., Schlicht, H. J., Fowler, P., Guilhot, S., and Chisari, F. V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23), 10445-9.
- Bhagat, S., Wadhawan, M., Sud, R., and Arora, A. (2008). Hepatitis viruses causing pancreatitis and hepatitis: a case series and review of literature. *Pancreas* **36**(4), 424-7.
- Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S. K., and Acharya, S. K. (2008). A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* **48**(5), 1577-85.
- Biebricher, C. K., and Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 1-31.
- Bliska, J. (1996). How pathogens exploit interactions mediated by SH3 domains. *Chem Biol* **3**(1), 7-11.
- Bortoliero, A. L., Bonametti, A. M., Morimoto, H. K., Matsuo, T., and Reiche, E. M. (2006). Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Parana , Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48**(2), 87-92.
- Bose, P. D., Das, B. C., Kumar, A., Gondal, R., Kumar, D., and Kar, P. (2011). High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* **54**(6), 1107-13.
- Bouquet, J., Cheval, J., Rogee, S., Pavio, N., and Eloit, M. (2012). Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission. *J Virol* **86**(11), 6238-45.

- Bouquet, J., Tesse, S., Lunazzi, A., Eloit, M., Rose, N., Nicand, E., and Pavio, N. (2011). Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg Infect Dis* **17**(11), 2018-25.
- Boxall, E., Herborn, A., Kochethu, G., Pratt, G., Adams, D., Ijaz, S., and Teo, C. G. (2006). Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* **16**(2), 79-83.
- Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R. H. (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4942-6.
- Bull, R. A., Luciani, F., McElroy, K., Gaudieri, S., Pham, S. T., Chopra, A., Cameron, B., Maher, L., Dore, G. J., White, P. A., and Lloyd, A. R. (2011). Sequential bottlenecks drive viral evolution in early acute hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog* **7**(9), e1002243.
- Casrouge, A., Decalf, J., Ahloulay, M., Lababidi, C., Mansour, H., Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Mottez, E., Mapes, J., Fontanet, A., Pol, S., and Albert, M. L. (2011). Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* **121**(1), 308-17.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M. I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., and Giacca, M. (2005). Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *Embo J* **24**(17), 3070-81.
- Chandra, V., Holla, P., Ghosh, D., Chakrabarti, D., Padigaru, M., and Jameel, S. (2011). The hepatitis E virus ORF3 protein regulates the expression of liver-specific genes by modulating localization of hepatocyte nuclear factor 4. *PLoS One* **6**(7), e22412.
- Chandra, V., Kar-Roy, A., Kumari, S., Mayor, S., and Jameel, S. (2008). The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol* **82**(14), 7100-10.
- Chen, X., Zhang, Q., He, C., Zhang, L., Li, J., Zhang, W., Cao, W., Lv, Y. G., Liu, Z., Zhang, J. X., and Shao, Z. J. (2012). Recombination and natural selection in hepatitis E virus genotypes. *J Med Virol* **84**(9), 1396-407.
- Chetverin, A. B., Kopein, D. S., Chetverina, H. V., Demidenko, A. A., and Ugarov, V. I. (2005). Viral RNA-directed RNA polymerases use diverse mechanisms to promote recombination between RNA molecules. *J Biol Chem* **280**(10), 8748-55.
- Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C., and Pawlotsky, J. M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**(14), 7732-41.

- Ciota, A. T., Ngo, K. A., Lovelace, A. O., Payne, A. F., Zhou, Y., Shi, P. Y., and Kramer, L. D. (2007). Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *J Gen Virol* **88**(Pt 3), 865-74.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., and Girones, R. (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* **9**(4), 448-54.
- Codoner, F. M., Daros, J. A., Sole, R. V., and Elena, S. F. (2006). The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog* **2**(12), e136.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., and Gerolami, R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* **202**(6), 825-34.
- Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., and Tamalet, C. (2007a). Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* **13**(4), 648-9.
- Colson, P., Dhiver, C., Poizot-Martin, I., Tamalet, C., and Gerolami, R. (2011). Acute and chronic hepatitis E in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Viral Hepat* **18**(3), 227-8.
- Colson, P., Kaba, M., Bernit, E., Motte, A., and Tamalet, C. (2007b). Hepatitis E associated with surgical training on pigs. *Lancet* **370**(9591), 935.
- Colson, P., Payraudeau, E., Leonnet, C., De Montigny, S., Villeneuve, L., Motte, A., and Tamalet, C. (2008). Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol* **46**(7), 2450-2.
- Colson, P., Romanet, P., Moal, V., Borentain, P., Purgus, R., Benezech, A., Motte, A., and Gerolami, R. (2012). Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg Infect Dis* **18**(8), 1361-4.
- Contreras, A. M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V., and Chung, R. T. (2002). Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* **76**(17), 8505-17.
- Cossaboom, C. M., Cordoba, L., Cao, D., Ni, Y. Y., and Meng, X. J. (2012a). Complete genome sequence of hepatitis e virus from rabbits in the United States. *J Virol* **86**(23), 13124-5.
- Cossaboom, C. M., Cordoba, L., Sanford, B. J., Pineyro, P., Kenney, S. P., Dryman, B. A., Wang, Y., and Meng, X. J. (2012b). Cross-species infection of pigs with a novel rabbit,

- but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol* **93**(Pt 8), 1687-95.
- Crossan, C., Scobie, L., Godwin, J., Hunter, J. G., Hawkes, T., and Dalton, H. R. (2013). Hepatitis E virus and porcine-derived heparin. *Emerg Infect Dis* **19**(4), 686-8.
- Crotty, S., Cameron, C. E., and Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12), 6895-900.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., Andino, R., and Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* **6**(12), 1375-9.
- Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S., and Banks, M. (2008a). Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* **8**(11), 698-709.
- Dalton, H. R., Bendall, R. P., Keane, F. E., Tedder, R. S., and Ijaz, S. (2009). Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* **361**(10), 1025-7.
- Dalton, H. R., Bendall, R. P., Rashid, M., Ellis, V., Ali, R., Ramnarace, R., Stableforth, W., Headdon, W., Abbott, R., McLaughlin, C., Froment, E., Hall, K. J., Michell, N. P., Thatcher, P., and Henley, W. E. (2011). Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **23**(12), 1200-5.
- Dalton, H. R., Fellows, H. J., Stableforth, W., Joseph, M., Thurairajah, P. H., Warshow, U., Hazeldine, S., Remnarace, R., Ijaz, S., Hussaini, S. H., and Bendall, R. P. (2007a). The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* **26**(10), 1429-35.
- Dalton, H. R., Hazeldine, S., Banks, M., Ijaz, S., and Bendall, R. (2007b). Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* **369**(9569), 1260.
- Dalton, H. R., Stableforth, W., Thurairajah, P., Hazeldine, S., Remnarace, R., Usama, W., Farrington, L., Hamad, N., Sieberhagen, C., Ellis, V., Mitchell, J., Hussaini, S. H., Banks, M., Ijaz, S., and Bendall, R. P. (2008b). Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**(8), 784-90.
- Davern, T. J., Chalasani, N., Fontana, R. J., Hayashi, P. H., Protiva, P., Kleiner, D. E., Engle, R. E., Nguyen, H., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Tillmann, H. L., Gu, J., Serrano, J., and Hoofnagle, J. H. (2011). Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* **141**(5), 1665-72 e1-9.

- Debing, Y., Winton, J., Neyts, J., and Dallmeier, K. (2013). Cutthroat trout virus as a surrogate in vitro infection model for testing inhibitors of hepatitis E virus replication. *Antiviral Res.*
- Delobel, P., Saliou, A., Nicot, F., Dubois, M., Trancart, S., Tangre, P., Aboulker, J. P., Taburet, A. M., Molina, J. M., Massip, P., Marchou, B., and Izopet, J. (2011). Minor HIV-1 variants with the K103N resistance mutation during intermittent efavirenz-containing antiretroviral therapy and virological failure. *PLoS One* **6**(6), e21655.
- Delwart, E. L., Pan, H., Sheppard, H. W., Wolpert, D., Neumann, A. U., Korber, B., and Mullins, J. I. (1997). Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* **71**(10), 7498-508.
- Domingo, E. (1989). RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* **33**, 93-133.
- Domingo, E., Escarmis, C., Lazaro, E., and Manrubia, S. C. (2005). Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res* **107**(2), 129-39.
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151-78.
- Dong, C., Zafrullah, M., Mixson-Hayden, T., Dai, X., Liang, J., Meng, J., and Kamili, S. (2012). Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* **55**(5), 1324-32.
- Drake, J. W., and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(24), 13910-3.
- Drexler, J. F., Seelen, A., Corman, V. M., Fumie Tateno, A., Cottontail, V., Melim Zerbinati, R., Gloza-Rausch, F., Klose, S. M., Adu-Sarkodie, Y., Opong, S. K., Kalko, E. K., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Muller, M. A., Ulrich, R. G., Leroy, E. M., Lukashev, A. N., and Drosten, C. (2012). Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* **86**(17), 9134-47.
- Drobeniuc, J., Favorov, M. O., Shapiro, C. N., Bell, B. P., Mast, E. E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B. H., and Margolis, H. S. (2001). Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* **184**(12), 1594-7.
- Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3), 197-208.
- Egloff, M. P., Malet, H., Putics, A., Heinonen, M., Dutartre, H., Frangeul, A., Gruez, A., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Ahola, T., and Canard, B. (2006).

- Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* **80**(17), 8493-502.
- Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**(10), 465-523.
- Emerson, S. U., Anderson, D. A., Arankalle, A., Meng, J., Purdy, M. A., Schlauder, G. G., and Tsarev, S. (2004). Hepevirus: In *Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Edited by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberg and L.A. Ball Elsevier/Academic Press, London*, 853-857.
- Emerson, S. U., Arankalle, V. A., and Purcell, R. H. (2005). Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* **192**(5), 930-3.
- Emerson, S. U., Nguyen, H., Torian, U., and Purcell, R. H. (2006). ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol* **80**(21), 10457-64.
- Emerson, S. U., Nguyen, H. T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., and Purcell, R. H. (2010). Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J Virol* **84**(18), 9059-69.
- Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2001). Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med* **7**(10), 462-6.
- Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2003). Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* **13**(3), 145-54.
- Eriksson, K. K., Cervantes-Barragan, L., Ludewig, B., and Thiel, V. (2008). Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J Virol* **82**(24), 12325-34.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzer, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H., and Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**(5464), 339-44.
- Farci, P., Wollenberg, K., Diaz, G., Engle, R. E., Lai, M. E., Klenerman, P., Purcell, R. H., Pybus, O. G., and Alter, H. J. (2012). Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(36), 14562-7.
- Favorov, M. O., Fields, H. A., Purdy, M. A., Yashina, T. L., Aleksandrov, A. G., Alter, M. J., Yarasheva, D. M., Bradley, D. W., and Margolis, H. S. (1992). Serologic identification

- of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* **36**(4), 246-50.
- Feagins, A. R., Opriessnig, T., Huang, Y. W., Halbur, P. G., and Meng, X. J. (2008). Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J Med Virol* **80**(8), 1379-86.
- Fishman, S. L., Murray, J. M., Eng, F. J., Walewski, J. L., Morgello, S., and Branch, A. D. (2008). Molecular and bioinformatic evidence of hepatitis C virus evolution in brain. *J Infect Dis* **197**(4), 597-607.
- Fry, K. E., Tam, A. W., Smith, M. M., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Piatak, M., Feldman, R. A., Yun, K. Y., Purdy, M. A., and et al. (1992). Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes* **6**(2), 173-85.
- Gad, Y. Z., Mousa, N., Shams, M., and Elewa, A. (2011). Seroprevalence of subclinical HEV infection in asymptomatic, apparently healthy, pregnant women in Dakahlyia Governorate, Egypt. *Asian J Transfus Sci* **5**(2), 136-9.
- Garbuglia, A. R., Scognamiglio, P., Petrosillo, N., Mastroianni, C. M., Sordillo, P., Gentile, D., La Scala, P., Girardi, E., and Capobianchi, M. R. (2013). Hepatitis e virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg Infect Dis* **19**(1), 110-4.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Muir, A. J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., and Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**(7262), 399-401.
- Gelderblom, H. C., Vatakis, D. N., Burke, S. A., Lawrie, S. D., Bristol, G. C., and Levy, D. N. (2008). Viral complementation allows HIV-1 replication without integration. *Retrovirology* **5**, 60.
- Geng, J., Fu, H., Wang, L., Bu, Q., Liu, P., Wang, M., Sui, Y., Wang, X., Zhu, Y., and Zhuang, H. (2011). Phylogenetic analysis of the full genome of rabbit hepatitis E virus (rbHEV) and molecular biologic study on the possibility of cross species transmission of rbHEV. *Infect Genet Evol* **11**(8), 2020-5.
- Gerolami, R., Borentain, P., Raissouni, F., Motte, A., Solas, C., and Colson, P. (2011). Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J Clin Virol* **52**(1), 60-2.
- Gerolami, R., Moal, V., and Colson, P. (2008). Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med* **358**(8), 859-60.

- Gerotto, M., Dal Pero, F., Loffreda, S., Bianchi, F. B., Alberti, A., and Lenzi, M. (2001). A 385 insertion in the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 envelope protein is found in some patients with mixed cryoglobulinemia type 2. *Blood* **98**(9), 2657-63.
- Gmyl, A. P., Korshenko, S. A., Belousov, E. V., Khitrina, E. V., and Agol, V. I. (2003). Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? *Rna* **9**(10), 1221-31.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., and Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett* **288**(1-2), 201-5.
- Graff, J., Nguyen, H., Yu, C., Elkins, W. R., St Claire, M., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (2005). The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* **79**(11), 6680-9.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., and Emerson, S. U. (2006). A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* **80**(12), 5919-26.
- Gramenzi, A., Andreone, P., Loggi, E., Foschi, F. G., Cursaro, C., Margotti, M., Biselli, M., and Bernardi, M. (2005). Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **12**(5), 525-30.
- Grandadam, M., Tebbal, S., Caron, M., Siriwardana, M., Larouze, B., Koeck, J. L., Buisson, Y., Enouf, V., and Nicand, E. (2004). Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* **85**(Pt 11), 3189-94.
- Grebely, J., Feld, J. J., Applegate, T., Matthews, G. V., Hellard, M., Sherker, A., Petoumenos, K., Zang, G., Shaw, I., Yeung, B., George, J., Teutsch, S., Kaldor, J. M., Cherepanov, V., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Lloyd, A. R., and Dore, G. J. (2013). Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* **57**(6), 2124-34.
- Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* **1**, 23-61.
- Guu, T. S., Liu, Z., Ye, Q., Mata, D. A., Li, K., Yin, C., Zhang, J., and Tao, Y. J. (2009). Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31), 12992-7.

- Haagsma, E. B., Riezebos-Brilman, A., van den Berg, A. P., Porte, R. J., and Niesters, H. G. (2010). Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl* **16**(4), 474-7.
- Hakze-van der Honing, R. W., van Coillie, E., Antonis, A. F., and van der Poel, W. H. (2011). First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* **6**(8), e22673.
- Halbur, P. G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M. B., Purcell, R. H., Emerson, S. U., Toth, T. E., and Meng, X. J. (2001). Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* **39**(3), 918-23.
- Hamid, S. S., Atiq, M., Shehzad, F., Yasmeen, A., Nissa, T., Salam, A., Siddiqui, A., and Jafri, W. (2002). Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology* **36**(2), 474-8.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., and Meng, X. J. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* **82**(Pt 10), 2449-62.
- Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schonberger, B., Zeuzem, S., and Sarrazin, C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* **132**(3), 921-30.
- Holla, R. P., Ahmad, I., Ahmad, Z., and Jameel, S. (2013). Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**(1), 3-14.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**(4540), 1577-85.
- Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* **64**(8), 3960-2.
- Huang, C. C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K. Y., Fry, K. E., Bradley, D. W., Tam, A. W., and Reyes, G. R. (1992). Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* **191**(2), 550-8.
- Huang, F. F., Sun, Z. F., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Shivaprasad, H. L., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. (2004). Determination and analysis of the complete

- genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* **85**(Pt 6), 1609-18.
- Huang, S., Zhang, X., Jiang, H., Yan, Q., Ai, X., Wang, Y., Cai, J., Jiang, L., Wu, T., Wang, Z., Guan, L., Shih, J. W., Ng, M. H., Zhu, F., Zhang, J., and Xia, N. (2010). Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One* **5**(10), e13560.
- Ippagunta, S. K., Naik, S., Jameel, S., Ramana, K. N., and Aggarwal, R. (2010). Viral RNA but no evidence of replication can be detected in the peripheral blood mononuclear cells of hepatitis E virus-infected patients. *J Viral Hepat.*
- Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeau, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., and Guerin, J. L. (2012). Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis* **18**(8), 1274-81.
- Izopet, J., Rostaing, L., Sandres, K., Cisterne, J. M., Pasquier, C., Rumeau, J. L., Duffaut, M., Durand, D., and Puel, J. (2000). Longitudinal analysis of hepatitis C virus replication and liver fibrosis progression in renal transplant recipients. *J Infect Dis* **181**(3), 852-8.
- Jabara, C. B., Jones, C. D., Roach, J., Anderson, J. A., and Swanstrom, R. (2011). Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(50), 20166-71.
- Jain, P., Nijhawan, S., Rai, R. R., Nepalia, S., and Mathur, A. (2007). Acute pancreatitis in acute viral hepatitis. *World J Gastroenterol* **13**(43), 5741-4.
- Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M. H., and Panda, S. K. (1996). Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* **70**(1), 207-16.
- Jaroszewicz, J., Flisiak, R., Kalinowska, A., Wierzbicka, I., and Prokopowicz, D. (2005). Acute hepatitis E complicated by acute pancreatitis: a case report and literature review. *Pancreas* **30**(4), 382-4.
- Jebblaoui, A., Haim-Boukobza, S., Marchadier, E., Mokhtari, C., and Roque-Afonso, A. M. (2013). Genotype 4 hepatitis e virus in france: an autochthonous infection with a more severe presentation. *Clin Infect Dis* **57**(4), e122-6.
- Jirintai, S., Jinshan, Tanggis, Manglai, D., Mulyanto, Takahashi, M., Nagashima, S., Kobayashi, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* **in press**.
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bonig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., and Ulrich, R. G. (2010). Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis* **16**(9), 1452-5.

- Kadare, G., and Haenni, A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* **71**(4), 2583-90.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., and Jameel, S. (2009). Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol* **83**(24), 12714-24.
- Kamani, P., Baijal, R., Amarapurkar, D., Gupte, P., Patel, N., Kumar, P., and Agal, S. (2005). Guillain-Barre syndrome associated with acute hepatitis E. *Indian J Gastroenterol* **24**(5), 216.
- Kamar, N., Abravanel, F., Selves, J., Garrouste, C., Esposito, L., Lavayssiere, L., Cointault, O., Ribes, D., Cardeau, I., Nogier, M. B., Mansuy, J. M., Muscari, F., Peron, J. M., Izopet, J., and Rostaing, L. (2010a). Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* **89**(3), 353-60.
- Kamar, N., Garrouste, C., Haagsma, E. B., Garrigue, V., Pischke, S., Chauvet, C., Dumortier, J., Cannesson, A., Cassuto-Viguiet, E., Thervet, E., Conti, F., Lebray, P., Dalton, H. R., Santella, R., Kanaan, N., Essig, M., Mousson, C., Radenne, S., Roque-Afonso, A. M., Izopet, J., and Rostaing, L. (2011). Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* **140**(5), 1481-9.
- Kamar, N., Izopet, J., Cintas, P., Garrouste, C., Uro-Coste, E., Cointault, O., and Rostaing, L. (2010b). Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant* **10**(5), 1321-4.
- Kamar, N., Mansuy, J. M., Cointault, O., Selves, J., Abravanel, F., Danjoux, M., Otal, P., Esposito, L., Durand, D., Izopet, J., and Rostaing, L. (2008a). Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant* **8**(8), 1744-8.
- Kamar, N., Rostaing, L., Abravanel, F., Garrouste, C., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I., Mansuy, J. M., Selves, J., Peron, J. M., Otal, P., Muscari, F., and Izopet, J. (2010c). Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* **50**(5), e30-3.
- Kamar, N., Rostaing, L., Abravanel, F., Garrouste, C., Lhomme, S., Esposito, L., Basse, G., Cointault, O., Ribes, D., Nogier, M. B., Alric, L., Peron, J. M., and Izopet, J. (2010d). Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **139**(5), 1612-8.

- Kamar, N., Rostaing, L., Legrand-Abravanel, F., and Izopet, J. (2013). How should hepatitis e virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant* **13**(7), 1935-6.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J. M., Ouezzani, L., Peron, J. M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J. P., Izopet, J., and Rostaing, L. (2008b). Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* **358**(8), 811-7.
- Kamar, N., Weclawiak, H., Guilbeau-Frugier, C., Legrand-Abravanel, F., Cointault, O., Ribes, D., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I., Guitard, J., Sallusto, F., Muscari, F., Peron, J. M., Alric, L., Izopet, J., and Rostaing, L. (2012). Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation* **93**(6), 617-23.
- Kanazawa, Y., Hayashi, N., Mita, E., Li, T., Hagiwara, H., Kasahara, A., Fusamoto, H., and Kamada, T. (1994). Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* **20**(5), 1121-30.
- Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H., and Panda, S. K. (2012). Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat* **19**(6), 436-48.
- Kar, P., Jilani, N., Husain, S. A., Pasha, S. T., Anand, R., Rai, A., and Das, B. C. (2008). Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol* **103**(10), 2495-501.
- Karpe, Y. A., and Lole, K. S. (2010). RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol* **84**(18), 9637-41.
- Karpe, Y. A., and Lole, K. S. (2011). Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J Gen Virol* **92**(Pt 9), 2088-92.
- Karpe, Y. A., and Meng, X. J. (2012). Hepatitis E virus replication requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* **86**(10), 5948-52.
- Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F. F., Guenette, D. K., Thomas, P. J., Meng, X. J., and Halbur, P. G. (2005). Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* **71**(12), 7831-7.
- Kaur, M., Hyams, K. C., Purdy, M. A., Krawczynski, K., Ching, W. M., Fry, K. E., Reyes, G. R., Bradley, D. W., and Carl, M. (1992). Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3855-8.

- Kenfak-Foguena, A., Schoni-Affolter, F., Burgisser, P., Witteck, A., Darling, K. E., Kovari, H., Kaiser, L., Evison, J. M., Elzi, L., Gurter-De La Fuente, V., Jost, J., Moradpour, D., Abravanel, F., Izpopet, J., and Cavassini, M. (2011). Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis* **17**(6), 1074-8.
- Khabar, K. S., Al-Zoghaibi, F., Al-Ahdal, M. N., Murayama, T., Dhalla, M., Mukaida, N., Taha, M., Al-Sedairy, S. T., Siddiqui, Y., Kessie, G., and Matsushima, K. (1997). The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *J Exp Med* **186**(7), 1077-85.
- Khuroo, M. S. (1980). Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* **68**(6), 818-24.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., Dar, M. Y., Moeckli, R., and Jameel, S. (1993). Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* **341**(8856), 1355.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., and Jameel, S. (1995). Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* **345**(8956), 1025-6.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., and Khuroo, M. S. (2009). Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat* **16**(7), 519-23.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., and Yattoo, G. N. (2004). Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* **19**(7), 778-84.
- Kim, S. J., Kim, J. H., Kim, Y. G., Lim, H. S., and Oh, J. W. (2004). Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**(48), 50031-41.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**(2), 111-20.
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., and Bradley, D. W. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17), 8259-63.
- Korkaya, H., Jameel, S., Gupta, D., Tyagi, S., Kumar, R., Zafrullah, M., Mazumdar, M., Lal, S. K., Xiaofang, L., Sehgal, D., Das, S. R., and Sahal, D. (2001). The ORF3 protein of

- hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J Biol Chem* **276**(45), 42389-400.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* **4**(1), 69-77.
- Kryazhimskiy, S., and Plotkin, J. B. (2008). The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet* **4**(12), e1000304.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B., and Murthy, N. S. (2004). Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* **85**(3), 240-4.
- Kumar, D., Malik, A., Asim, M., Chakravarti, A., Das, R. H., and Kar, P. (2008). Influence of quasispecies on virological responses and disease severity in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* **14**(5), 701-8.
- Kwo, P. Y., Schlauder, G. G., Carpenter, H. A., Murphy, P. J., Rosenblatt, J. E., Dawson, G. J., Mast, E. E., Krawczynski, K., and Balan, V. (1997). Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* **72**(12), 1133-6.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Vennarucci, V. S., and Muscillo, M. (2010). Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl Environ Microbiol* **76**(17), 5870-3.
- Labrique, A. B., Zaman, K., Hossain, Z., Saha, P., Yunus, M., Hossain, A., Ticehurst, J., and Nelson, K. E. (2009). Population seroprevalence of hepatitis E virus antibodies in rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* **81**(5), 875-81.
- Lauring, A. S., and Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* **6**(7), e1001005.
- le Coutre, P., Meisel, H., Hofmann, J., Rocken, C., Vuong, G. L., Neuburger, S., Hemmati, P. G., Dorken, B., and Arnold, R. (2009). Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* **58**(5), 699-702.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**(9), 1499-512.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**(5622), 1112.

- Lee, C. H., Gilbertson, D. L., Novella, I. S., Huerta, R., Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **71**(5), 3636-40.
- Legrand-Abravanel, F., Kamar, N., Sandres-Saune, K., Garrouste, C., Dubois, M., Mansuy, J. M., Muscari, F., Sallusto, F., Rostaing, L., and Izopet, J. (2010). Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* **202**(6), 835-44.
- Legrand-Abravanel, F., Kamar, N., Sandres-Saune, K., Lhomme, S., Mansuy, J. M., Muscari, F., Sallusto, F., Rostaing, L., and Izopet, J. (2011). Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* **17**(1), 30-7.
- Legrand-Abravanel, F., Mansuy, J. M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J. M., Rostaing, L., and Izopet, J. (2009a). Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* **15**(1), 110-4.
- Legrand-Abravanel, F., Thevenet, I., Mansuy, J. M., Saune, K., Vischi, F., Peron, J. M., Kamar, N., Rostaing, L., and Izopet, J. (2009b). Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol* **16**(5), 772-4.
- Li, S. W., Zhang, J., He, Z. Q., Gu, Y., Liu, R. S., Lin, J., Chen, Y. X., Ng, M. H., and Xia, N. S. (2005). Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem* **280**(5), 3400-6.
- Li, T. C., Miyamura, T., and Takeda, N. (2007). Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* **76**(1), 170-2.
- Liang, B., Luo, M., Scott-Herridge, J., Semeniuk, C., Mendoza, M., Capina, R., Sheardown, B., Ji, H., Kimani, J., Ball, B. T., Van Domselaar, G., Graham, M., Tyler, S., Jones, S. J., and Plummer, F. A. (2011). A comparison of parallel pyrosequencing and sanger clone-based sequencing and its impact on the characterization of the genetic diversity of HIV-1. *PLoS One* **6**(10), e26745.
- Liang, R., Mo, T., Dong, W., Lee, G., Swenson, L., McCloskey, R., Woods, C., Brumme, C., Harrigan, P., and Poon, A. (2013). Impact of Experimental Conditions on the Utility of Primer ID Tagging for Next-generation HIV Sequencing. *20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Atlanta, Georgia, Abstract 626*.
- Liu, S. L., Rodrigo, A. G., Shankarappa, R., Learn, G. H., Hsu, L., Davidov, O., Zhao, L. P., and Mullins, J. I. (1996). HIV quasispecies and resampling. *Science* **273**(5274), 415-6.

- Loly, J. P., Rikir, E., Seivert, M., Legros, E., Defrance, P., Belaiche, J., Moonen, G., and Delwaide, J. (2009). Guillain-Barre syndrome following hepatitis E. *World J Gastroenterol* **15**(13), 1645-7.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., Robinson, E. R., and Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* **10**(9), 599-606.
- Lopez-Labrador, F. X., Ampurdanes, S., Gimenez-Barcons, M., Guilera, M., Costa, J., Jimenez de Anta, M. T., Sanchez-Tapias, J. M., Rodes, J., and Saiz, J. C. (1999). Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology* **29**(3), 897-903.
- Lopez, T., Silva-Ayala, D., Lopez, S., and Arias, C. F. (2011). Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* **85**(22), 11964-71.
- Lorenzo, F. R., Tanaka, T., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Yamada, K., Inoue, J., Takahashi, M., and Okamoto, H. (2008). Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* **137**(1), 86-96.
- Lu, L., Li, C., and Hagedorn, C. H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**(1), 5-36.
- Lunemann, S., Schlaphoff, V., Cornberg, M., and Wedemeyer, H. (2012). NK cells in hepatitis C: role in disease susceptibility and therapy. *Dig Dis* **30 Suppl 1**, 48-54.
- MacCallum, F. O. (1972). Early studies of viral hepatitis. *Br Med Bull* **28**(2), 105-8.
- Macdonald, A., Mazaleyrat, S., McCormick, C., Street, A., Burgoyne, N. J., Jackson, R. M., Cazeaux, V., Shelton, H., Saksela, K., and Harris, M. (2005). Further studies on hepatitis C virus NS5A-SH3 domain interactions: identification of residues critical for binding and implications for viral RNA replication and modulation of cell signalling. *J Gen Virol* **86**(Pt 4), 1035-44.
- Magden, J., Takeda, N., Li, T., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits, A., and Kaariainen, L. (2001). Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol* **75**(14), 6249-55.
- Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M. L., Giorgi, M., Morrica, A., Pistello, M., Cammarota, G., Marchi, S., Ciccorossi, P., Bionda, A., and Bendinelli, M. (1997). Differences in

- hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gen Virol* **78** (Pt 7), 1521-5.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**(6944), 99-103.
- Mansuy, J. M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., Kamar, N., Rostaing, L., Alric, L., Moreau, J., Peron, J. M., and Izopet, J. (2009a). Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol* **44**(1), 74-7.
- Mansuy, J. M., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Saune, K., Miedouge, M., Ellis, V., Rech, H., Destruel, F., Kamar, N., Dalton, H. R., and Izopet, J. (2011). Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* **17**(12), 2309-12.
- Mansuy, J. M., Huynh, A., Abravanel, F., Recher, C., Peron, J. M., and Izopet, J. (2009b). Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* **48**(3), 373-4.
- Mansuy, J. M., Legrand-Abravanel, F., Calot, J. P., Peron, J. M., Alric, L., Agudo, S., Rech, H., Destruel, F., and Izopet, J. (2008). High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol* **80**(2), 289-93.
- Mansuy, J. M., Peron, J. M., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J. P., and Izopet, J. (2004). Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* **74**(3), 419-24.
- Margeridon-Thermet, S., Shulman, N. S., Ahmed, A., Shahriar, R., Liu, T., Wang, C., Holmes, S. P., Babrzadeh, F., Gharizadeh, B., Hanczaruk, B., Simen, B. B., Egholm, M., and Shafer, R. W. (2009). Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naive patients. *J Infect Dis* **199**(9), 1275-85.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**(12), 1313-9.
- Matsubayashi, K., Nagaoka, Y., Sakata, H., Sato, S., Fukai, K., Kato, T., Takahashi, K., Mishiro, S., Imai, M., Takeda, N., and Ikeda, H. (2004). Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* **44**(6), 934-40.

- McAlister, V. C., Haddad, E., Renouf, E., Malthaner, R. A., Kjaer, M. S., and Glud, L. L. (2006). Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: a meta-analysis. *Am J Transplant* **6**(7), 1578-85.
- McKechnie, V. M., and McCrudden, E. A. (2001). Optimisation and sensitivity of single-stranded conformation polymorphism for the detection of hepatitis C virus quasi-species. *J Virol Methods* **92**(2), 131-9.
- Megjugorac, N. J., Gallagher, G. E., and Gallagher, G. (2010). IL-4 enhances IFN-lambda1 (IL-29) production by plasmacytoid DCs via monocyte secretion of IL-1Ra. *Blood* **115**(21), 4185-90.
- Meng, X. J. (2009). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* **140**(3-4), 256-65.
- Meng, X. J. (2011). From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* **161**(1), 23-30.
- Meng, X. J. (2013). Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**(1), 41-9.
- Meng, X. J., Anderson, D., Arankalle, A., Emerson, S., Harrison, T. J., Jameel, S., and Okamoto, H. (2012). Hepeviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB; Lefkowitz EJ, eds. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. . San Diego: Elsevier., 1021-8.
- Meng, X. J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**(12), 9714-21.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J., and 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**(18), 9860-5.
- Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* **40**(1), 117-22.
- Minutello, M. A., Pileri, P., Unutmaz, D., Censini, S., Kuo, G., Houghton, M., Brunetto, M. R., Bonino, F., and Abrignani, S. (1993). Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* **178**(1), 17-25.

- Mishra, N., and Arankalle, V. A. (2011). Association of polymorphisms in the promoter regions of TNF-alpha (-308) with susceptibility to hepatitis E virus and TNF-alpha (-1031) and IFN-gamma (+874) genes with clinical outcome of hepatitis E infection in India. *J Hepatol* **55**(6), 1227-34.
- Mishra, N., Walimbe, A. M., and Arankalle, V. A. (2013). Hepatitis E virus from India exhibits significant amino acid mutations in fulminant hepatic failure patients. *Virus Genes* **46**(1), 47-53.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2005). 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* **76**(3), 341-9.
- Moal, V., Textoris, J., Ben Amara, A., Mehraj, V., Berland, Y., Colson, P., and Mege, J. L. (2013). Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis* **207**(1), 125-32.
- Moin, S. M., Panteva, M., and Jameel, S. (2007). The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J Biol Chem* **282**(29), 21124-33.
- Muhlbauer, M., Bosserhoff, A. K., Hartmann, A., Thasler, W. E., Weiss, T. S., Herfarth, H., Lock, G., Scholmerich, J., and Hellerbrand, C. (2003). A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* **125**(4), 1085-93.
- Myara, A., Imbert-Bismut, F., Piton, A., Schilliger, O., and Antoniotti, G. (1998). [Role of biology in the follow up of viral hepatitis]. *Ann Biol Clin (Paris)* **56**(5), 527-37.
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2011). A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **92**(Pt 2), 269-78.
- Nagy, P. D., and Simon, A. E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**(1), 1-9.
- Naik, S. R., Aggarwal, R., Salunke, P. N., and Mehrotra, N. N. (1992). A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* **70**(5), 597-604.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M., and Mishiro, S. (2006). Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* **34**(3), 137-40.

- Nanda, S. K., Panda, S. K., Durgapal, H., and Jameel, S. (1994). Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J Med Virol* **42**(3), 237-40.
- Nei, M., and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**(5), 418-26.
- Nguyen, H. T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R. E., Thompson, E., Bonkovsky, H. L., and 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**(Pt 3), 526-30.
- Norris, S., Collins, C., Doherty, D. G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J., and O'Farrelly, C. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* **28**(1), 84-90.
- Oliveira-Filho, E. F., Konig, M., and Thiel, H. J. (2013). Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol* **165**(1-2), 148-54.
- Ollier, L., Tieulie, N., Sanderson, F., Heudier, P., Giordanengo, V., Fuzibet, J. G., and Nicand, E. (2009). Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med* **150**(6), 430-1.
- Olsen, B., Axelsson-Olsson, D., Thelin, A., and Weiland, O. (2006). Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* **38**(1), 55-8.
- Osterman, A., Vizoso Pinto, M. G., Haase, R., Nitschko, H., Jager, S., Sander, M., Motz, M., Mohn, U., and Baiker, A. (2012). Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virol J* **9**, 28.
- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S. R., Das, V., Das, S., and Naik, S. (2005). Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* **20**(7), 1094-101.
- Palmer, S., Kearney, M., Maldarelli, F., Halvas, E. K., Bixby, C. J., Bazmi, H., Rock, D., Falloon, J., Davey, R. T., Jr., Dewar, R. L., Metcalf, J. A., Hammer, S., Mellors, J. W., and Coffin, J. M. (2005). Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol* **43**(1), 406-13.
- Pan, Q., de Ruiter, P. E., Metselaar, H. J., Kwekkeboom, J., de Jonge, J., Tilanus, H. W., Janssen, H. L., and van der Laan, L. J. (2012). Mycophenolic acid augments interferon-

- stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**(6), 1673-83.
- Patra, S., Kumar, A., Trivedi, S. S., Puri, M., and Sarin, S. K. (2007). Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med* **147**(1), 28-33.
- Pavio, N., Meng, X. J., and Renou, C. (2010). Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* **41**(6), 46.
- Payne, C. J., Ellis, T. M., Plant, S. L., Gregory, A. R., and Wilcox, G. E. (1999). Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol* **68**(1-2), 119-25.
- Peppia, D., Gill, U. S., Reynolds, G., Easom, N. J., Pallett, L. J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H. D., Adams, D. H., Kennedy, P. T., and Maini, M. K. (2013). Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *J Exp Med* **210**(1), 99-114.
- Perales, C., Martin, V., Ruiz-Jarabo, C. M., and Domingo, E. (2005). Monitoring sequence space as a test for the target of selection in viruses. *J Mol Biol* **345**(3), 451-9.
- Peralta, B., Biarnes, M., Ordonez, G., Porta, R., Martin, M., Mateu, E., Pina, S., and Meng, X. J. (2009). Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol* **137**(1-2), 31-6.
- Peron, J. M., Bureau, C., Poirson, H., Mansuy, J. M., Alric, L., Selves, J., Dupuis, E., Izopet, J., and Vinel, J. P. (2007). Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat* **14**(5), 298-303.
- Peron, J. M., Dalton, H., Izopet, J., and Kamar, N. (2011). Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *J Hepatol* **54**(6), 1323-4; author reply 1324-5.
- Perttala, J., Spuul, P., and Ahola, T. (2013). Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J Gen Virol* **94**(Pt 4), 807-16.
- Pischke, S., Stiefel, P., Franz, B., Bremer, B., Suneetha, P. V., Heim, A., Ganzenmueller, T., Schlue, J., Horn-Wichmann, R., Raupach, R., Darnedde, M., Scheibner, Y., Taubert, R., Haverich, A., Manns, M. P., Wedemeyer, H., and Bara, C. L. (2012). Chronic hepatitis e in heart transplant recipients. *Am J Transplant* **12**(11), 3128-33.

- Prabhu, S. B., Gupta, P., Durgapal, H., Rath, S., Gupta, S. D., Acharya, S. K., and Panda, S. K. (2011). Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat* **18**(8), 587-94.
- Protzer, U., Maini, M. K., and Knolle, P. A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* **12**(3), 201-13.
- Pudupakam, R. S., Huang, Y. W., Opriessnig, T., Halbur, P. G., Pierson, F. W., and Meng, X. J. (2009). 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* **83**(1), 384-95.
- Pudupakam, R. S., Kenney, S. P., Cordoba, L., Huang, Y. W., Dryman, B. A., Leroith, T., Pierson, F. W., and Meng, X. J. (2011). Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol* **85**(19), 10031-40.
- Purcell, R. H., Engle, R. E., Rood, M. P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H. T., Govindarajan, S., St Claire, M., and Emerson, S. U. (2011). Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis* **17**(12), 2216-22.
- Purdy, M., Tam, A., Huang, C., Yarbough, P., and Reyes, G. (1993). Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the “alpha-like” RNA virus supergroup. *Sem Virol* **4**, 319-326.
- Purdy, M. A., Lara, J., and Khudyakov, Y. E. (2012). The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLoS One* **7**(4), e35974.
- Raj, V. S., Smits, S. L., Pas, S. D., Provacia, L. B., Moorman-Roest, H., Osterhaus, A. D., and Haagmans, B. L. (2012). Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **18**(8), 1369-70.
- Ray, R., Aggarwal, R., Salunke, P. N., Mehrotra, N. N., Talwar, G. P., and Naik, S. R. (1991). Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. *Lancet* **338**(8770), 783-4.
- Ray, S. C., Wang, Y. M., Laeyendecker, O., Ticehurst, J. R., Villano, S. A., and Thomas, D. L. (1999). Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* **73**(4), 2938-46.
- Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H., and Panda, S. K. (2008). Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* **370**(1), 77-92.
- Renou, C., Cadranet, J. F., Bourliere, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carencu, P., Harafa, A., Bertrand, J. J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, J. P., Decoppet, A., Eloit,

- M., and Pavio, N. (2007). Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg Infect Dis* **13**(7), 1094-6.
- Reuter, G., Fodor, D., Forgach, P., Katai, A., and Szucs, G. (2009). Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol* **44**(4), 277-81.
- Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E., and Bradley, D. W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **247**(4948), 1335-9.
- Robson, S. C., Adams, S., Brink, N., Woodruff, B., and Bradley, D. (1992). Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet* **339**(8806), 1424-5.
- Rocha, E. P., Smith, J. M., Hurst, L. D., Holden, M. T., Cooper, J. E., Smith, N. H., and Feil, E. J. (2006). Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J Theor Biol* **239**(2), 226-35.
- Rogee, S., Talbot, N., Caperna, T., Bouquet, J., Barnaud, E., and Pavio, N. (2013). New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol* **94**(Pt 3), 549-58.
- Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y., Choo, Q. L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M., and Abrignani, S. (1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5), 1759-63.
- Rossi-Tamisier, M., Moal, V., Gerolami, R., and Colson, P. (2013). Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J Clin Virol* **56**(1), 62-4.
- Rostaing, L., Izopet, J., Baron, E., Duffaut, M., Puel, J., and Durand, D. (1995). Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha in kidney transplant recipients. *Transplantation* **59**(10), 1426-31.
- Roux, L., Simon, A. E., and Holland, J. J. (1991). Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv Virus Res* **40**, 181-211.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmis, C., and Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J Virol* **74**(8), 3543-7.
- Rutjes, S. A., Lodder, W. J., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H. H., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., and de Roda Husman, A. M. (2009). Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* **15**(3), 381-7.

- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H. L., Walsh, A., Ramsay, M., and Morgan, D. (2009). Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis* **15**(11), 1738-44.
- Saksela, K., Cheng, G., and Baltimore, D. (1995). Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *Embo J* **14**(3), 484-91.
- Saliou, A., Delobel, P., Dubois, M., Nicot, F., Raymond, S., Calvez, V., Masquelier, B., and Izopet, J. (2011). Concordance between two phenotypic assays and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6), 2831-6.
- Salonen, A., Ahola, T., and Kaariainen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**, 139-73.
- Sandres, K., Dubois, M., Pasquier, C., Payen, J. L., Alric, L., Duffaut, M., Vinel, J. P., Pascal, J. P., Puel, J., and Izopet, J. (2000). Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* **74**(2), 661-8.
- Saravanabalaji, S., Tripathy, A. S., Dhoot, R. R., Chadha, M. S., Kakrani, A. L., and Arankalle, V. A. (2009). Viral load, antibody titers and recombinant open reading frame 2 protein-induced TH1/TH2 cytokines and cellular immune responses in self-limiting and fulminant hepatitis e. *Intervirology* **52**(2), 78-85.
- Schaub, M., and Keller, W. (2002). RNA editing by adenosine deaminases generates RNA and protein diversity. *Biochimie* **84**(8), 791-803.
- Schlosser, B., Stein, A., Neuhaus, R., Pahl, S., Ramez, B., Kruger, D. H., Berg, T., and Hofmann, J. (2011). Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol* **56**(2), 500-2.
- Schmid, R. (2001). History of viral hepatitis: a tale of dogmas and misinterpretations. *J Gastroenterol Hepatol* **16**(7), 718-22.
- Schofield, D. J., Glamann, J., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2000). Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* **74**(12), 5548-55.
- Serratrice, J., Disdier, P., Colson, P., Ene, N., de Roux, C. S., and Weiller, P. J. (2007). Acute polyarthritis revealing hepatitis E. *Clin Rheumatol* **26**(11), 1973-5.
- Shao, W., Boltz, V. F., Spindler, J. E., Kearney, M. F., Maldarelli, F., Mellors, J. W., Stewart, C., Volfovsky, N., Levitsky, A., Stephens, R. M., and Coffin, J. M. (2013). Analysis of

- 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA. *Retrovirology* **10**, 18.
- Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kanematu, T., Fujiwara, K., Wong, D. C., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1997). Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol* **71**(8), 5769-73.
- Shrestha, M. P., Scott, R. M., Joshi, D. M., Mammen, M. P., Jr., Thapa, G. B., Thapa, N., Myint, K. S., Fourneau, M., Kuschner, R. A., Shrestha, S. K., David, M. P., Seriwatana, J., Vaughn, D. W., Safary, A., Endy, T. P., and Innis, B. L. (2007). Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* **356**(9), 895-903.
- Shukla, P., Nguyen, H. T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R. E., and Emerson, S. U. (2012). Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol* **86**(10), 5697-707.
- Shukla, P., Nguyen, H. T., Torian, U., Engle, R. E., Faulk, K., Dalton, H. R., Bendall, R. P., Keane, F. E., Purcell, R. H., and 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**(6), 2438-43.
- Si, X., Gao, G., Wong, J., Wang, Y., Zhang, J., and Luo, H. (2008). Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3. *PLoS One* **3**(7), e2585.
- Simmonds, P., Balfe, P., Ludlam, C. A., Bishop, J. O., and Brown, A. J. (1990). Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**(12), 5840-50.
- Singh, N. K., and Gangappa, M. (2007). Acute immune thrombocytopenia associated with hepatitis E in an adult. *Am J Hematol* **82**(10), 942-3.
- Smith, D. B., Purdy, M. A., and Simmonds, P. (2013). Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* **87**(8), 4161-9.
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J., and Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* **331**(5), 991-1004.
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Bhagat, M. R., Chowdhury, A., and Naik, S. (2008). Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat* **15**(12), 910-6.

- Srivastava, R., Aggarwal, R., Jameel, S., Puri, P., Gupta, V. K., Ramesh, V. S., Bhatia, S., and Naik, S. (2007). Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol* **20**(1), 56-65.
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Sachdeva, S., Alam, M. I., Jameel, S., and Naik, S. (2010). Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* **26**(2), 306-11.
- Stegmann, K. A., Bjorkstrom, N. K., Ciesek, S., Lunemann, S., Jaroszewicz, J., Wiegand, J., Malinski, P., Dustin, L. B., Rice, C. M., Manns, M. P., Pietschmann, T., Cornberg, M., Ljunggren, H. G., and Wedemeyer, H. (2012). Interferon alpha-stimulated natural killer cells from patients with acute hepatitis C virus (HCV) infection recognize HCV-infected and uninfected hepatoma cells via DNAX accessory molecule-1. *J Infect Dis* **205**(9), 1351-62.
- Steyer, A., Naglic, T., Mocilnik, T., Poljsak-Prijatelj, M., and Poljak, M. (2011). Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect Genet Evol* **11**(7), 1732-7.
- Sullivan, D. G., Bruden, D., Deubner, H., McArdle, S., Chung, M., Christensen, C., Hennessy, T., Homan, C., Williams, J., McMahon, B. J., and Gretch, D. R. (2007). Hepatitis C virus dynamics during natural infection are associated with long-term histological outcome of chronic hepatitis C disease. *J Infect Dis* **196**(2), 239-48.
- Sun, Z. F., Larsen, C. T., Dunlop, A., Huang, F. F., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. (2004). Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J Gen Virol* **85**(Pt 3), 693-700.
- Suneetha, P. V., Pischke, S., Schlaphoff, V., Grabowski, J., Fytily, P., Gronert, A., Bremer, B., Markova, A., Jaroszewicz, J., Bara, C., Manns, M. P., Cornberg, M., and Wedemeyer, H. (2011). Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* **55**(3), 695-708.
- Surjit, M., Jameel, S., and Lal, S. K. (2004). The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol* **78**(1), 320-8.
- Surjit, M., Varshney, B., and Lal, S. K. (2012). The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF-kappaB activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of IkappaBalpha in human hepatoma cells. *BMC Biochem* **13**, 7.

- Swetina, J., and Schuster, P. (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys Chem* **16**(4), 329-45.
- Takahashi, H., Tanaka, T., Jirintai, S., Nagashima, S., Takahashi, M., Nishizawa, T., Mizuo, H., Yazaki, Y., and Okamoto, H. (2011a). A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* **157**(2), 235-46.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N., and Mishiro, S. (2004). Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* **330**(2), 501-5.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Sato, H., Sato, Y., Jirintai, Nagashima, S., and Okamoto, H. (2011b). Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* **92**(Pt 4), 902-8.
- Takahashi, M., Tanaka, T., Takahashi, H., Hoshino, Y., Nagashima, S., Jirintai, Mizuo, H., Yazaki, Y., Takagi, T., Azuma, M., Kusano, E., Isoda, N., Sugano, K., and Okamoto, H. (2010). Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* **48**(4), 1112-25.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., and Reyes, G. R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**(1), 120-31.
- Tam, A. W., White, R., Reed, E., Short, M., Zhang, Y., Fuerst, T. R., and Lanford, R. E. (1996). In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* **215**(1), 1-9.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., and Okamoto, H. (2007). Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* **88**(Pt 3), 903-11.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Nagashima, S., Mizuo, H., and 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**(6), 1906-10.
- Taub, D. D., Anver, M., Oppenheim, J. J., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996). T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of

- neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **97**(8), 1931-41.
- Tavitian, S., Peron, J. M., Huynh, A., Mansuy, J. M., Ysebaert, L., Huguet, F., Vinel, J. P., Attal, M., Izopet, J., and Recher, C. (2010). Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol* **49**(2), 141-4.
- Teshale, E. H., Grytdal, S. P., Howard, C., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hill, V. R., Okware, S., Hu, D. J., and Holmberg, S. D. (2010). Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin Infect Dis* **50**(7), 1006-10.
- Thapa, R., Mallick, D., and Ghosh, A. (2009). Childhood hepatitis E infection complicated by acute immune thrombocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol* **31**(2), 151.
- Tracey, K. J., and Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* **45**, 491-503.
- TrehanPati, N., Sukriti, S., Geffers, R., Hissar, S., Riese, P., Toepfer, T., Guzman, C. A., and Sarin, S. K. (2011). Gene expression profiles of T cells from hepatitis E virus infected patients in acute and resolving phase. *J Clin Immunol* **31**(3), 498-508.
- Tripathy, A. S., Das, R., Rathod, S. B., and Arankalle, V. A. (2012). Cytokine Profiles, CTL Response and T Cell Frequencies in the Peripheral Blood of Acute Patients and Individuals Recovered from Hepatitis E Infection. *PLoS One* **7**(2), e31822.
- Tripathy, A. S., Das, R., Rathod, S. B., Gurav, Y. K., and Arankalle, V. A. (2011). Peripheral T regulatory cells and cytokines in hepatitis E infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(2), 179-84.
- Tyagi, S., Jameel, S., and Lal, S. K. (2001). The full-length and N-terminal deletion of ORF2 protein of hepatitis E virus can dimerize. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(1), 214-21.
- Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S., and Lal, S. K. (2002). 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* **277**(25), 22759-67.
- Tyagi, S., Surjit, M., Roy, A. K., Jameel, S., and Lal, S. K. (2004). The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBp) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem* **279**(28), 29308-19.

- Vallbracht, A., Gabriel, P., Maier, K., Hartmann, F., Steinhardt, H. J., Muller, C., Wolf, A., Manncke, K. H., and Flehmig, B. (1986). Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection. *Hepatology* **6**(6), 1308-14.
- van Cuyck, H., Fan, J., Robertson, D. L., and Roques, P. (2005). Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J Virol* **79**(14), 9306-14.
- van der Heijden, M. W., and Bol, J. F. (2002). Composition of alphavirus-like replication complexes: involvement of virus and host encoded proteins. *Arch Virol* **147**(5), 875-98.
- Vandenbroucke, I., Van Marck, H., Verhasselt, P., Thys, K., Mostmans, W., Dumont, S., Van Eygen, V., Coen, K., Tuefferd, M., and Aerssens, J. (2011). Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications. *Biotechniques* **51**(3), 167-77.
- Versluis, J., Pas, S. D., Agteresch, H. J., de Man, R. A., Maaskant, J., Schipper, M. E., Osterhaus, A. D., Cornelissen, J. J., and van der Eijk, A. A. (2013). Hepatitis E virus: an underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood in press*.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**(7074), 344-8.
- Vishwanathan, R. (1957). Infectious hepatitis in Delhi (1955–1956). A critical study: epidemiology. *Indian J. Med. Res.* **45**(suppl. 1), 1-29.
- Vishwanathan, R., and Sidhu, A. (1957). Infectious hepatitis: clinical findings. *Indian J. Med. Res.* **45**(suppl. 1), 49-58.
- Wald, O., Weiss, I. D., Galun, E., and Peled, A. (2007). Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* **39**(1), 50-62.
- Wang, H., Zhang, W., Ni, B., Shen, H., Song, Y., Wang, X., Shao, S., Hua, X., and Cui, L. (2010). Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virol J* **7**, 129.
- Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M., and Shimotohno, K. (2003). Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* **38**(5), 1282-8.
- Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., and et al. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein

- variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8), 3468-72.
- Wenzel, J. J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., and Jilg, W. (2013). Test Performance Characteristics of Anti-HEV IgG Assays Strongly Influence Hepatitis E Seroprevalence Estimates. *J Infect Dis* **207**(3), 497-500.
- Wilke, C. O. (2005). Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol Biol* **5**, 44.
- Wilke, C. O., Wang, J. L., Ofria, C., Lenski, R. E., and Adami, C. (2001). Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest. *Nature* **412**(6844), 331-3.
- Williams, T. P., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E., and Meng, X. J. (2001). Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* **39**(9), 3040-6.
- Withers, M. R., Correa, M. T., Morrow, M., Stebbins, M. E., Seriwatana, J., Webster, W. D., Boak, M. B., and Vaughn, D. W. (2002). Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* **66**(4), 384-8.
- Wolinsky, S. M., Korber, B. T., Neumann, A. U., Daniels, M., Kunstman, K. J., Whetsell, A. J., Furtado, M. R., Cao, Y., Ho, D. D., and Safrit, J. T. (1996). Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* **272**(5261), 537-42.
- Xiaofang, L., Zafrullah, M., Ahmad, F., and Jameel, S. (2001). A C-Terminal Hydrophobic Region is Required for Homo-Oligomerization of the Hepatitis E Virus Capsid (ORF2) Protein. *J Biomed Biotechnol* **1**(3), 122-128.
- Xing, L., Kato, K., Li, T., Takeda, N., Miyamura, T., Hammar, L., and Cheng, R. H. (1999). Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* **265**(1), 35-45.
- Xing, L., Li, T. C., Mayazaki, N., Simon, M. N., Wall, J. S., Moore, M., Wang, C. Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., and Cheng, R. H. (2010). Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem* **285**(43), 33175-83.
- Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., and Okamoto, H. (2009). ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **90**(Pt 8), 1880-91.

- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R. H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2009). Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31), 12986-91.
- Yang, Z., and Bielawski, J. P. (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol* **15**(12), 496-503.
- Yu, C., Boon, D., McDonald, S. L., Myers, T. G., Tomioka, K., Nguyen, H., Engle, R. E., Govindarajan, S., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (2010). Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol* **84**(21), 11264-78.
- Yu, H., Li, S., Yang, C., Wei, M., Song, C., Zheng, Z., Gu, Y., Du, H., Zhang, J., and Xia, N. (2011). Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78. *J Mol Model* **17**(5), 987-95.
- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K., and Jameel, S. (1999). Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* **73**(5), 4074-82.
- Zagordi, O., Daumer, M., Beisel, C., and Beerenwinkel, N. (2012). Read length versus depth of coverage for viral quasispecies reconstruction. *PLoS One* **7**(10), e47046.
- Zein, N. N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* **13**(2), 223-35.
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T. J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A., and Wang, Y. (2009). A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* **81**(8), 1371-9.
- Zheng, Z. Z., Miao, J., Zhao, M., Tang, M., Yeo, A. E., Yu, H., Zhang, J., and Xia, N. S. (2010). Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J Gen Virol* **91**(Pt 7), 1728-36.
- Zhou, Y. H., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (2005). A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine* **23**(24), 3157-65.
- Zhu, F. C., Zhang, J., Zhang, X. F., Zhou, C., Wang, Z. Z., Huang, S. J., Wang, H., Yang, C. L., Jiang, H. M., Cai, J. P., Wang, Y. J., Ai, X., Hu, Y. M., Tang, Q., Yao, X., Yan, Q., Xian, Y. L., Wu, T., Li, Y. M., Miao, J., Ng, M. H., Shih, J. W., and Xia, N. S. (2010).

Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **376**(9744), 895-902.

Annexes



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

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



Review

Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits

Sébastien Lhomme^{a,b}, Martine Dubois^{a,b}, Florence Abravanel^{a,b}, Sokunthea Top^a, Stéphane Bertagnoli^{c,d}, Jean-Luc Guerin^{c,d}, Jacques Izopet^{a,b,*}

^aINSERM, UMR 1043, F-31300 Toulouse, France

^bLaboratoire de Virologie, CHU Purpan, 330 Avenue de Grande Bretagne, F-31300 Toulouse, France

^cUniversité de Toulouse, INP, ENVT, 31076 Toulouse, France

^dINRA, UMR 1225, 31076 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2012

Received in revised form 14 January 2013

Accepted 8 February 2013

Keywords:

Hepatitis E virus

Rabbit

Zoonosis

ABSTRACT

Hepatitis E virus strains from rabbits indicate that these mammals may be a reservoir for HEVs that cause infection in humans. Further issues remain to be clarified, including whether the genotype of rabbit HEV differs from human and swine HEV genotype 3 and whether rabbit HEV can infect human and other animals.

HEV was found in farmed rabbits in several geographic areas of China, in USA and more recently in France. The prevalence of antibodies against HEV was 36%, 57% and 55% in rabbits from Virginia (USA), Gansu Province and Beijing (China), respectively. HEV RNA was detected in 16.5% of serum samples from farmed rabbits in Virginia, 7.5% in Gansu Province and 7.0% in Beijing. HEV RNA was detected in 7% of bile samples from farmed rabbits and in 23% of liver samples from wild rabbits in France. The full-length genomic sequences analysis indicates that all the rabbit strains belong to the same clade. Nucleotide sequences were 72.2–78.2% identical to HEV genotypes 1–4. Comparison with HEV sequences of human strains circulating in France and reference sequences identified a human strain closely related to rabbit HEV. A 93-nucleotide insertion in the X domain of the ORF1 of the human strain and in all the rabbit HEV strains was found. Moreover, the ability of rabbit HEV to cause cross-species infection in a pig model has recently been demonstrated. Rabbit HEV can replicate efficiently in human cell lines. Collectively, these data support the possibility of zoonotic transmission of HEV from rabbits.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

Contents

1. Introduction.....	00
2. Geographical distribution of rabbit hepatitis E virus.....	00
3. Experimental transmission of rabbit HEV.....	00
4. Antigenic and genetic studies.....	00
5. Potential mechanisms of transmission to human.....	00
6. Conclusion.....	00
Funding.....	00
Competing interest.....	00
Ethical approval.....	00
References.....	00

Abbreviation: HEV, hepatitis E virus.

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie, CHU Purpan, 330 Avenue de Grande Bretagne, F-31300 Toulouse, France. Tel.: +33 5 67 69 04 24; fax: +33 5 67 69 04 25.

E-mail address: izopet.j@chu-toulouse.fr (J. Izopet).

1386-6532/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier B.V.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.006>

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of acute hepatitis in many developing countries in Asia and Africa where it is transmitted by the fecal–oral route due to poor sanitation.¹ Acute hepatitis E is also increasingly reported in industrialized countries where the transmission is mainly zoonotic.^{2,3} The initial discovery of HEV transmission from domestic pigs⁴ has been followed by evidence

Please cite this article in press as: Lhomme S, et al. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J Clin Virol* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.006>

that other mammals like wild boar and deer are also potential reservoirs of HEV.⁵

The course of HEV infections is generally self-limiting and asymptomatic. Fulminant hepatitis can occur in pregnant women and people with underlying liver disease.^{6–8} Symptomatic infection may be misdiagnosed. For instance, HEV can be mistaken for drug-induced liver injury.^{9,10} Extra hepatic manifestations have also been described in association with HEV infection. For instance, neurological manifestations can occur occasionally in patients with hepatitis E infection.^{11,12} HEV infections can become chronic in immunocompromised patients, such as recipients of solid-organ transplants,^{13–15} those with hematological diseases,^{16–18} and patients infected with the human immunodeficiency virus.^{19–21}

HEV is a positive-sense, single-stranded RNA non-enveloped virus. It is a member of the genus *Hepevirus* in the family *Hepeviridae*.²² The HEV genome is approximately 7.2 kb long and contains three open reading frames (ORFs) as well as 5' and 3' untranslated regions. ORF1 encodes non-structural proteins, with putative functional domains including methyltransferase, papain-like cysteine protease (PCP), helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domains. Besides these, other domains are homologous to other plant and animal positive-strand RNA viruses: Y domain, X or macro domain and the polyproline region (PPR). ORF2 encodes the capsid protein, and ORF3 encodes a small phosphoprotein. Although all HEV isolates are believed to belong to a single serotype,²³ phylogenetic analysis of HEV sequences has led to the recognition of at least four major genotypes that infect a variety of mammalian species. Genotypes 1 and 2 HEVs are restricted to humans and transmitted *via* contaminated water in developing countries. Genotypes 3 and 4 HEVs have an extended host range including humans, pigs and other mammals and are responsible for sporadic cases of hepatitis E in both developing and industrialized countries.²³ Genotype 3 HEV has a worldwide distribution whereas genotype 4 HEV is largely confined to Asia. Genotypes 3 and 4 HEV infections have been linked to the consumption of raw or undercooked meats such as pig liver sausages or game meats.^{24,25}

The full spectrum of species that are reservoirs of HEV is still unknown. Avian HEV from chickens and cutthroat trout virus from trout likely represent new genus.^{26,27} Recent studies have also characterized new HEV genotypes in rats in Germany,²⁸ bats worldwide,²⁹ wild boars in Japan,³⁰ and farmed rabbits in China.^{31,32} Further issues remain to be clarified, including whether rabbit HEV genotype differs from human and swine HEV genotype 3, whether HEV genotypes 1–4 can infect rabbits, and whether rabbit HEV can infect human and other animals. The aim of this review is to provide a look at the worldwide prevalence of serological and genetic markers of HEV in rabbits, the ability to cause cross species infection and the risk of zoonotic transmission of rabbit HEV strains.

2. Geographical distribution of rabbit hepatitis E virus

HEV was found in farmed rabbits in several geographic areas of China.^{31,32} A recent study also reported that farmed rabbits in the United States were infected.³³ Antibodies against HEV and HEV RNA were detected in various breeds of rabbits from 2 farms in Gansu province and in Beijing, China and 2 farms in Virginia, USA. The overall prevalence of antibodies against HEV in rabbits from the United States (36%) was lower than that in rabbits from Gansu and Beijing, China (57% and 55% respectively). By contrast, the prevalence of HEV RNA in serum and fecal samples in rabbits farms in the United States (16.5% and 15.3% respectively) was higher than that on farms in Gansu and Beijing, China (7.5% and 7.0% respectively). Neutralizing antibodies could play a role in this marker pattern.³⁴ Observed differences may be explained by the ages of the rabbits, due to variation in the duration of exposure. The difference may

also be explained by housing practices. In the US study, the prevalence of the antibodies was higher in rabbits caged in groups of 2–9 than in rabbits caged individually.³³ Because HEV is transmitted by the fecal–oral route, virus likely spreads easier between cage mates, thus increasing the numbers of HEV-positive rabbits.

A recent study has shown that rabbits in Europe were also naturally infected with HEV.³⁵ In France where cases of autochthonous hepatitis E are commonly reported,^{36,37} the prevalence of HEV in both farmed and population of wild rabbits was recently determined. HEV RNA was found in 7.0% of the farmed rabbits and in 23% of the wild rabbits. However, the ages of the rabbits – less than 3 months for farmed rabbits *versus* over 6 months for wild rabbits – and the tissues tested – bile for farmed rabbits and liver for wild rabbits – may explain the observed difference in HEV prevalence. Nevertheless, previous studies have shown that the virus loads in liver and bile samples from swine infected with HEV are similar.^{38,39} Although the greater prevalence of HEV in wild rabbit could be linked to their older age, a relationship between the prevalence of HEV in the various farms and warrens and rabbit age could not be tested for because their precise ages were unknown.

3. Experimental transmission of rabbit HEV

It has been shown that rabbits experimentally inoculated with the rabbit HEV seroconverted to HEV, shed virus in feces, became viremic and had serum liver enzyme elevation. Experimental inoculation of rabbits with human HEV genotype 4 showed seroconversion, viremia and fecal virus shedding in 2 of 9 rabbits and in none inoculated with genotype 1 human HEV.⁴⁰ This study indicates that rabbits could be a useful animal model for studying some aspects of rabbit HEV infection, although rabbits may likely be of a limited use as a model for studies of human HEV genotype 1.

Recently, Cossaboom et al. assessed the ability of rabbit HEV to cause cross-species infections in a pig model.⁴¹ They demonstrated that rabbit HEV strains from China and the United States were able to infect pigs when inoculated intravenously, as approximately half of the inoculated pigs developed transient viremia and sporadic fecal shedding. The infection of pigs by rabbit HEV was further verified by effective transmission of the virus recovered from pig feces to naive rabbits. Finally, it has been recently shown that rabbit HEV can replicate efficiently in human cell lines, PLC/PRF/5 and A549 cell lines.⁴² PLC/PRF/5 cells originating from human hepatocellular carcinoma and A549 cells derived from human lung cancer were previously shown to support efficient propagation of HEV strains not only from human but also from pigs and wild boars. All these data suggest that rabbit HEV may potentially cross the barrier species and infect humans. The identification of HEV receptor would also contribute to better understand the zoonotic transmission of HEV.

4. Antigenic and genetic studies

A recent study suggests that rabbit HEV is antigenically related to other HEV strains.⁴¹ A recombinant capsid protein of rabbit HEV showed cross reaction with antibodies raised against HEV strains from mammals such as rat, swine and human HEV, but also avian HEV. Conversely, it was shown that anti rabbit HEV antibodies cross reacted with capsid protein derived from human, swine, rat, and chicken HEV.

In the recent French study,³⁵ partial and complete nucleotide sequences of the HEV strains from rabbits were analyzed and compared with those of human HEV strains circulating in France to determine whether rabbits could be a reservoir for human infection. The genome organization of rabbit HEV is similar to those of other mammalian HEVs, with a 5' untranslated region,

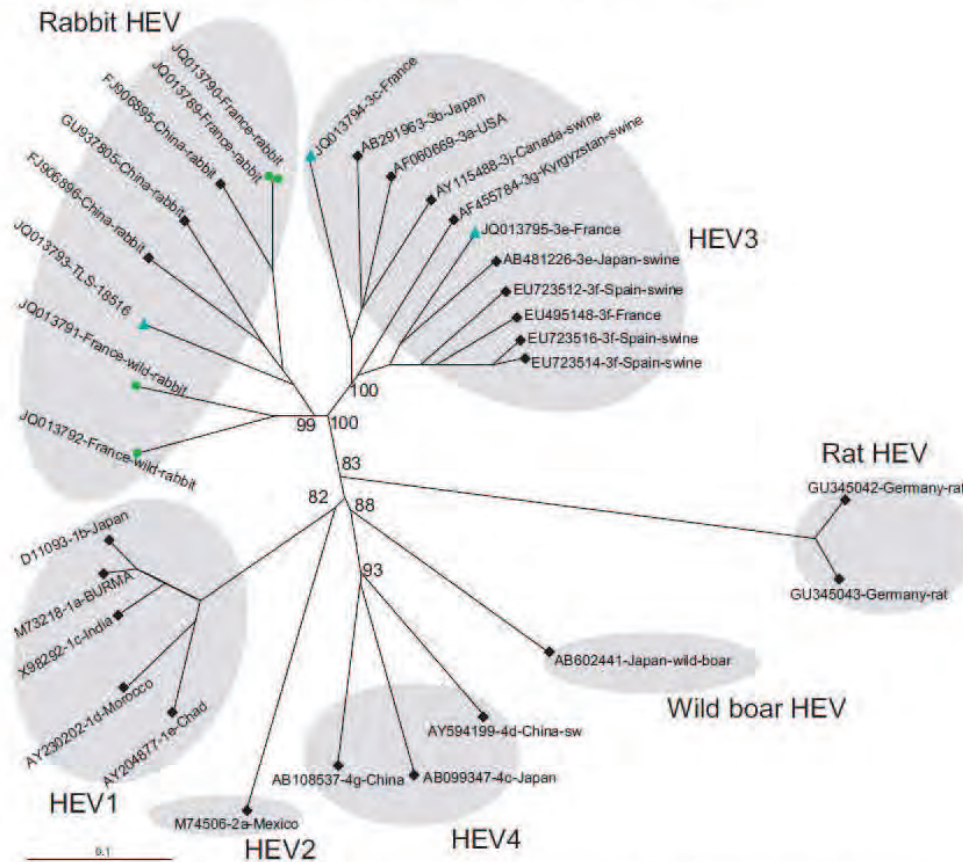


Fig. 1. Phylogenetic tree for the 1400-bp sequence of open reading frame 1 of the non-structural protein. Round: rabbit HEV. Triangle: human strains circulating in France. Diamond: reference strains. Genbank accession numbers are shown for each HEV strain. Scale bar indicates the nucleotide substitutions per site.

followed by ORF1, ORF2, ORF3 which partially overlaps ORF2 and the 3'UTR. ORF3 encodes a 113 amino acid protein, which has a length similar to genotype 3 HEV. Phylogenetic analyses based on ORF1 (~1400 bp) (Fig. 1) and the full-length genome (Fig. 2) indicated that all the rabbit strains from China and France belonged to the same clade. One human strain, TLS-18516-human, clustered with the rabbit strains and appeared to be somewhat different from the 4 major mammalian HEV genotypes and the newly described HEV genotypes from rats and wild boar (Fig. 2). Although the full length sequences of the genomes of the rabbit strains and TLS-18516-human strain are more similar to that of genotype 3 HEV than to those of genotype 1, 2 and 4 HEVs, they do not seem to belong to the established HEV genotype 3 found in humans and swine, as recently suggested.^{30,43} Differences in the classification of rabbit HEV could be due to the full-length genomic sequences

used as the reference for phylogenetic analyses. Genotype 3 is very diverse, with 10 identified subtypes.⁴⁴ The analysis included the full-length genomes of subtypes 3f, 3c, and 3e, which account for approximately 74%, 13% and 5% of the human and swine HEV strains circulating in France.^{45,46} The other full-length genomes representative of genotype HEV subtypes were also included, but subtypes 3d, 3h, and 3i were not yet available in GenBank. The data indicated that the genomes of rabbit HEV or TLS-18516-human were less than 80% identical with genotype 3 HEV, whatever the method used to align the sequences (Table 1). This is compatible with the definition of a new genotype, as previously proposed.^{31,32}

A 93-nucleotide insertion in the X domain of the ORF1 of the human strain TLS-18516-human and of all the rabbit HEV strains was found³⁵ (Fig. 3). This insertion was also found in the rabbit HEV strains from China⁴⁷ and USA⁴⁸ and was not present

Table 1
Percent identities of full-length sequences among HEV strains from rabbits and HEV strains from humans.

Rabbit HEV strains	Human HEV strains, %identity				
	TLS-18516	HEV1	HEV2	HEV3	HEV4
GU937805 – China-rabbit	85.0	73.0–73.7	72.2	76.3–78.2	72.9–73.9
JQ013792 – France-rabbit	80.3	72.7–73.4	73.5	76.2–77.6	73.2–73.6
JQ013791 – France-rabbit	80.6	73.2–73.7	73.4	76.1–78.0	74.2–74.9

HEV1 (M73218-1a-Burma, D11093-1b-Japan, X98292-1c-India, AY204877-1e-Chad, AY230202-1d-Morocco); HEV2 (M774506-2a-Mexico); HEV3 (AF060669-3a-USA, AY115488-3j-Canada-Sw, AB291963-3b-Japan, TLS-TR19-3c, TLS-TR02-3e, AB481226-3e-Japan-Sw, EU495148-3f-France, AF455784-3g-Kyrgyzstan-Sw); HEV4 (AB099347-4c-Japan, AB108537-4g-China, AY594199-4d-China-Sw), JQ013791–JQ013792: W1-11 and W7-57-wild rabbits, respectively. Sw: swine.

Please cite this article in press as: Lhomme S, et al. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J Clin Virol* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.006>

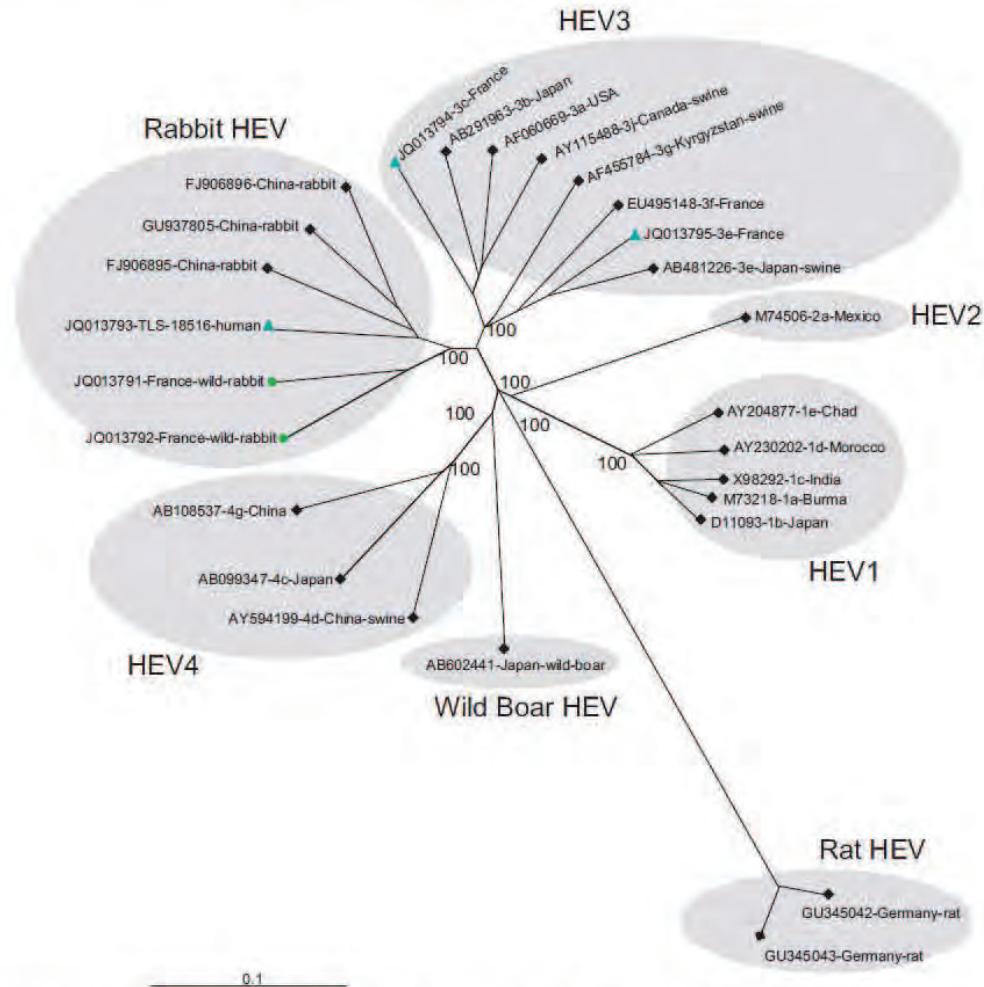


Fig. 2. Phylogenetic tree based on full-length sequences of hepatitis E virus (HEV) (taken from Izopet et al., Emerg Infect Dis, 2012; 18(8)-1274-81). Round: rabbit HEV. Triangle: human strains circulating in France. Diamond: reference strains, Genbank accession numbers are shown for each HEV strain. Scale bar indicates the nucleotide substitutions per site.

in any known strain of HEV genotypes 1–4 or in the new HEV genotypes from rats, wild-boar and bats. The X domain corresponds to a macro domain found in the non-structural polyproteins of several positive-stranded viruses such as togaviruses and coronaviruses.^{49–51} This domain can bind poly (ADP-ribose) and could play a role in the replication and/or transcription of virus RNA. Whether or not the insertion in the X domain influences

the function of the HEV macro domain warrants further investigation. Several determinants, including this insertion, could be important for specifying the host range, zoonotic transmission and pathogenesis of rabbit HEV.⁴⁷ The characterization of the human HEV strain that is closely related to rabbit HEV supports the potential zoonotic transmission from rabbits to human.



Fig. 3. Molecular signature of rabbit HEV in ORF1. The rabbit HEV strains present a 93-nucleotide insertion in the X domain of the ORF1 in comparison with other strains. A human strain (TLS-18516) also presents this insertion, supporting the potential zoonotic transmission from rabbits to human.

Please cite this article in press as: Lhomme S, et al. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J Clin Virol* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.006>

5. Potential mechanisms of transmission to human

Similar to swine HEV in pigs, rabbit HEV is widespread in the rabbit population. So, like swine HEV,⁵² one can speculate that direct contact with infected rabbits, consumption of undercooked or raw rabbit meats and water contaminated by rabbit HEV may represent sources for human infections.

The contribution of rabbit HEV to the epidemiology of hepatitis E in humans is uncertain. HEV is endemic in southwest France and the annual incidence of locally acquired HEV infections has been estimated to be 3.2%.^{53,54} A case-control study found that the only factor independently associated with HEV infection was the consumption of game meat, mostly wild boar, deer, and wild rabbits.³⁶ However, molecular data from various studies carried out in France indicate that the majority of HEV strains identified belong to genotypes 3f, 3c or 3e that are prevalent in pigs and wild boar.^{36,45,55} A recent study indicated the same proportions of genotypes 3f, 3c, and 3e in the human and pig populations.⁴⁶ Although this could indicate that rabbit HEV is less readily transmitted to humans than HEV genotype 3, the primers used for PCR amplification were not specifically designed for rabbit HEV. Therefore, the true prevalence of HEV RNA in rabbits and humans may have been underestimated. In addition, it may have been difficult to genotype rabbit HEV because reference sequences have become available only recently.

6. Conclusion

In conclusion, farmed and wild rabbits can be infected with HEV. Phylogenetic analysis based on full length genomes and a molecular signature in the X domain of ORF1 both indicate that rabbit HEV could be a new genotype. The identification of a human HEV strain that is closely related to rabbit HEV strains and the ability of rabbit HEV to cause cross species infections in pigs reinforce the potential zoonotic risk of this virus. Further studies are needed to evaluate the contribution of the rabbit reservoir to human HEV infection and disease.

Funding

This work was funded by INSERM U1043.

Competing interest

None declared.

Ethical approval

Not required.

References

- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008;48:494–503.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet* 2012;379:2477–88.
- Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *New Engl J Med* 2012;367:1237–44.
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9860–5.
- Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2009;140:256–65.
- Dalton HR, Hazeldine S, Banks M, Ijaz S, Bendall R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* 2007;369:1260.
- Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* 2003;10:61–9.
- Peron JM, Bureau C, Poirson H, Mansuy JM, Alric L, Selves J, et al. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat* 2007;14:298–303.
- Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, Joseph M, Thurairajah PH, Warshaw U, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:1429–35.
- Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2011;141:1665–72e1–9.
- Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis* 2011;17:173–9.
- Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Coıntault O, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant* 2010;10:1321–4.
- Gerolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *New Engl J Med* 2008;358:859–60.
- Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008;14:547–53.
- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *New Engl J Med* 2008;358:811–7.
- Ollier L, Tielie N, Sanderson F, Heudier P, Giordanengo V, Fuzibet JG, et al. Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med* 2009;150:430–1.
- Peron JM, Mansuy JM, Recher C, Bureau C, Poirson H, Alric L, et al. Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1223–4.
- Mansuy JM, Huynh A, Abravanel F, Recher C, Peron JM, Izopet J. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* 2009;48:373–4.
- Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* 2009;45:269–71.
- Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *New Engl J Med* 2009;361:1025–7.
- Kenfak-Foguena A, Schoni-Affolter F, Burgisser P, Witteck A, Darling KE, Kovari H, et al. Hepatitis E virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1074–8.
- Meng X, Anderson D, Arankalle A, Purdy M, Schaulder G, Tsarev S. Hepeviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2011.
- Emerson SU, Purcell RH. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med* 2001;7:462–6.
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 2010;202:825–34.
- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371–3.
- Bilic I, Jaskulska B, Basic A, Morrow CJ, Hess M. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *J Gen Virol* 2009;90:863–73.
- Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* 2011;158:116–23.
- Johne R, Heckel G, Plenge-Bonig A, Kindler E, Maresch C, Retz J, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats. *Germany Emerg Infect Dis* 2010;16:1452–5.
- Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbiniati R, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* 2012;86:9134–47.
- Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, et al. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 2011;92:902–8.
- Geng Y, Zhao C, Song A, Wang J, Zhang X, Harrison TJ, et al. The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infect Gene Evol* 2011;11:476–82.
- Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z, et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 2009;81:1371–9.
- Cossaboom CM, Cordoba L, Dryman BA, Meng XJ. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis* 2011;17:2047–9.
- Zhang J, Li SW, Wu T, Zhao Q, Ng MH, Xia NS. Hepatitis E virus: neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity. *Rev Med Virol* 2012;22:339–49.
- Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeau S, Boucher S, et al. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1274–81.
- Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM, et al. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* 2010;202:835–44.
- Mansuy JM, Abravanel F, Miedouge M, Mengelle C, Merviel C, Dubois M, et al. Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol* 2009;44:74–7.
- de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 2007;119:105–14.

39. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol* 2010;**139**:206–9.
40. Ma H, Zheng L, Liu Y, Zhao C, Harrison TJ, Ma Y, et al. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoS ONE* 2010;**5**:e9160.
41. Cossaboom CM, Cordoba L, Sanford BJ, Pineyro P, Kenney SP, Dryman BA, et al. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol* 2012;**93**:1687–95.
42. Jirintai S, Jinshan, Tanggis, Manglai D, Mulyanto, Takahashi M, Nagashima S, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* 2012;**170**(1–2):126–37.
43. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 2010;**41**:46.
44. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;**16**:5–36.
45. Legrand-Abravanel F, Mansuy JM, Dubois M, Kamar N, Peron JM, Rostaing L, et al. Hepatitis E virus genotype 3 diversity. *France Emerg Infect Dis* 2009;**15**:110–4.
46. Bouquet J, Tesse S, Lunazzi A, Eloit M, Rose N, Nicand E, et al. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:2018–25.
47. Geng J, Fu H, Wang L, Bu Q, Liu P, Wang M, et al. Phylogenetic analysis of the full genome of rabbit hepatitis E virus (rbHEV) and molecular biologic study on the possibility of cross species transmission of rbHEV. *Infect Gene Evol* 2011;**11**:2020–5.
48. Cossaboom CM, Cordoba L, Cao D, Ni YY, Meng XJ. Complete genome sequence of hepatitis e virus from rabbits in the United States. *J Virol* 2012;**86**:13124–5.
49. Egloff MP, Malet H, Putics A, Heinonen M, Dutartre H, Frangeul A, et al. Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* 2006;**80**:8493–502.
50. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:8259–63.
51. Neuvonen M, Ahola T. Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J Mol Biol* 2009;**385**:212–25.
52. Meng XJ. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 2011;**161**:23–30.
53. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F, et al. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:30–7.
54. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:2309–12.
55. Renou C, Moreau X, Pariente A, Cadranet JF, Maringe E, Morin T, et al. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;**27**:1086–93.

TITLE: Pathogenesis and adaptation of hepatitis E virus in immunocompromised patients .

Identification of factors influencing HEV persistence and liver fibrosis is needed. The relationship between quasispecies heterogeneity and the outcome of the acute phase was studied in the non structural polyprotein (ORF1) and the capsid protein (ORF2). We have shown that great quasispecies heterogeneity was associated with HEV persistence. In addition, weak inflammatory response, low T-cell activation and high serum concentrations of the chemokines implicated in leukocyte recruitment to the liver were also associated with HEV persistence. Patients with chronic infection and progressing liver fibrosis had less quasispecies diversification during the first year. Study of the genome evolution during a chronic infection has shown a limited number of mutations over time and a virus-host recombinant was found.

AUTEUR: Sébastien LHOMME

TITRE : Pathogénèse et adaptation du virus de l'hépatite E chez l'immunodéprimé.

DIRECTEUR DE THESE : Pr Jacques IZOPET

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 12 décembre 2013

RESUME en français:

Les facteurs virologiques et immunologiques impliqués dans la persistance du virus de l'hépatite E (VHE) et dans la fibrose hépatique nécessitent d'être mieux caractérisés. L'hétérogénéité de la quasi-espèce virale au moment de la phase aiguë a été étudiée au niveau de la polyprotéine non structurale (ORF1) et de la protéine de capsid (ORF2). Nos résultats ont montré qu'une plus grande hétérogénéité de la quasi-espèce à la phase aiguë était associée à la persistance du VHE. Chez les patients développant une infection chronique, une plus faible concentration sérique de cytokines inflammatoires, une plus faible activation des lymphocytes T et de fortes concentrations sériques en chimiokines ont été observées. Chez les patients chroniquement infectés, la plus faible diversification de la quasi-espèce lors de la première année d'infection était associée à la progression de la fibrose hépatique. Lors du suivi de l'évolution du génome du VHE chez un patient chroniquement infecté, peu de variations de la séquence consensus ont été observées mais une insertion de fragment de gène humain a été caractérisée. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'adaptation du VHE à son hôte.

Titre et résumé en anglais au recto de la dernière page

MOTS CLES :

Virus de l'hépatite E ; hépatite chronique ; fibrose hépatique ; quasi-espèce virale ; génome complet ; cytokines ; chimiokines.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Immunologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Virologie, INSERM UMR 1043, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Purpan.