

Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPÉCIALISÉES D'INNOVATION
PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

TENANT LIEU DE

THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 5 novembre 2019 par

Nicolas CAPELLI

Né le 12 octobre 1989 à Château-Thierry

**Optimisation de la culture du virus de l'hépatite E et
application à la quantification de l'infectiosité des
particules virales.**

Thèse dirigée par le Docteur Sabine CHAPUY-REGAUD

Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie Rogez.....Présidente

Madame le Docteur Sabine Chapuy-Regaud.....Directrice

Monsieur le Professeur Jacques Izopet.....Juge

Madame le Docteur Florence AbravanelJuge

Monsieur le Docteur Sébastien Lhomme.....Juge



Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPÉCIALISÉES D'INNOVATION
PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE
TENANT LIEU DE
THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 5 novembre 2019 par
Nicolas CAPELLI
Né le 12 octobre 1989 à Château-Thierry

**Optimisation de la culture du virus de l'hépatite E et
application à la quantification de l'infectiosité des
particules virales.**

Thèse dirigée par le Docteur Sabine CHAPUY-REGAUD

Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie Rogez.....Présidente

Madame le Docteur Sabine Chapuy-Regaud.....Directrice

Monsieur le Professeur Jacques Izopet.....Juge

Madame le Docteur Florence AbravanelJuge

Monsieur le Docteur Sébastien Lhomme.....Juge



Liste des enseignants

Le 1^{er} novembre 2018

DOYEN DE LA FACULTÉ :

Monsieur le Professeur **DUROUX** Jean-Luc

VICE-DOYEN :

Madame le Professeur **FAGNERE** Catherine

ASSESEURS :

Madame le Professeur **ROGEZ** Sylvie

Monsieur le Professeur **BATTU** Serge

PROFESSEURS :

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
INFORMATIQUE

FAGNERE Catherine

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE

LIAGRE Bertrand

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

MAMBU Lengo

PHARMACOGNOSIE

ROUSSEAU Annick

BIOSTATISTIQUE

TROUILLAS Patrick

CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

VIANA Marylène

PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

PICARD Nicolas

PHARMACOLOGIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

SAINT-MARCOUX Franck

TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine

HEMATOLOGIE
(Renouvelé jusqu'au 1^{er} novembre 2018)

JOST Jérémy

PHARMACIE CLINIQUE
(1^{er} novembre 2016 pour 2 ans)

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BEGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGENIERIE APPLIQUEE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LAVERDET-POUCH Betty	PHARMACIE GALENIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES

POUGET Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

(du 01.09.2018 au 31.08.2019)

MICROBIOLOGIE

RIOUX Benjamin

(du 01.09.2018 au 31.08.2019)

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

PROFESSEUR CERTIFIÉ :

VERCELLIN Karen

ANGLAIS

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

(jusqu'au 30.09.2019)

DREYFUSS Gilles

(jusqu'au 30.09.2019)

MOESCH Christian

(jusqu'au 01.01.2019)

Remerciements

À Madame le Professeur Sylvie Rogez.

Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider mon jury de thèse et de juger mon travail. Acceptez mon profond respect et mon entière reconnaissance.

À ma directrice de thèse et mon mentor, Mme le Docteur Sabine Chapuy-Regaud.

Je te remercie pour ton esprit critique, méthodique et inventif ainsi que pour tes innombrables qualités humaines à savoir la bienveillance, l'altruisme et la patience pour n'en citer que quelques unes. Sabine, je te remercie pour tes enseignements et d'avoir su garder la tête sur les épaules dans les moments où les expériences infructueuses me faisaient perdre la mienne.

À Monsieur le Professeur Jacques Izopet.

Je vous remercie pour m'avoir intégré à l'équipe dès mon arrivée en master et je suis touché de votre accueil ainsi que de l'intérêt que vous avez toujours porté à nos échanges. Je vous remercie de m'avoir poussé à me dépasser au quotidien et d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

À Madame le Docteur Florence Abravanel.

Je te suis très reconnaissant d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je te remercie également pour tous ces conseils qui m'ont incité à m'améliorer dans mon travail. Soit assuré de ma profonde gratitude.

À Monsieur le Docteur Sébastien Lhomme.

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je te suis également très reconnaissant pour tous ces bons échanges partagés toutes ces années, avec toujours beaucoup d'humour.

À Martine Dubois.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans les travaux que tu as accomplis. Je te remercie également pour tout ce que tu m'as enseigné à la paillasse et pour l'énergie dont tu fais preuve jours après jours.

À Mélanie et Isabelle,

Je vous remercie également pour tous votre travail. Nous ne pourrions pas accomplir autant sans vos conseils et votre soutien quotidien.

A mes trois plus proches compagnons de P3 : **Manon, Olivier et Marie**. C'est un plaisir de travailler à vos côtés et nos conversations vont me manquer terriblement. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, au Canada, à la clinique au labo.

Au biologiste de virologie de l'IFB : Stéphanie Raymond, Florence Nicot, Catherine Mengelle, Karine Saune, Jean-Michel Mansuy, Marcel Miedouge et Christophe Pasquier. Merci pour tous les bons conseils que vous m'avez apportés ces trois dernières années. Bientôt, vous n'aurez plus à vous inquiéter de me retrouver séché dans le P3.

À l'équipe de l'aquarium : Michelle, Nicolas, Chloé, Luce, Julie, Venicia, Mariel, Mary, Romain, Pauline, Agnès et Caroline et au **personnel du PTI Viro :** Laurence, Eliane, Kevin, Carole, Lucie, Allan, Catherine, Laetitia. Votre modeste serviteur ne sera bientôt plus là pour vous empêcher de prendre des calories à la pause café.

À nos deux futures thésardes : Marion et Camille. Avec Olivier et Manon, nous avons répondu à quelques questions et nous en avons soulevées des centaines d'autres. Nous vous laissons la lourde responsabilité de répondre à quelques autres. Je vous souhaite de vous épanouir autant que moi dans votre travail.

À Marie-Pierre Panero. Pour ton aide quotidienne dans le P3 qui nous permet de travailler dans les meilleures conditions. Au-delà de ça, je te remercie pour tous les bons moments partagés en surblouse verte taillée « vieille endive flétrie » et aux discussions grivoises du lundi matin.

À Sophie Allart, Danièle Daviaud et Astrid Canivet du plateau d'imagerie cellulaire, pour m'avoir mis la tête dans les étoiles.

À mes compagnons de la fac de Reims : Antoine, Benoit, Edouard, Elodie, Floriane, Pascal, Pauline, Pierre, Rachel, Remi et Stanislas. Merci pour tous ces fous rires et toutes ces soirées pendant lesquelles nous avons refait le monde.

Aux internes de Limoges : Maud, Pierre, Martine, Vanessa, Novissi, Isabelle, Jérémie, Anne-Sophie, Alexia, Alexine, Antoine, Ariane, Florian, Tiphaine, Marc, Emilie... Merci pour toutes ces soirées endiablées et la nostalgie partagée à la salle de repas de Limoges.

À Erwan Ruttiman. Compagnon d'arme Suisso-Limougeaud-Bordelais. Contre vents et marées, tu as choisi de faire ta vie à Limoges. Tu fais parti des amis les plus précieux dénichés pendant mon internat.

À Celia, Raji, Ines, Jean-Baptiste, Mayé et Nicolas. Ces années toulousaines n'auraient pas eu la même saveur sans vous. Je vous remercie de vos encouragements, d'avoir écouté les nombreuses explications sur mon sujet de thèse et de m'avoir fait découvrir la beauté de votre région.

À mes stagiaires, Eleonore Gawel, Jean Cébron, Marine Tambon et Awatif Raji. Merci à vous de l'intérêt, de l'engouement et de la curiosité dont vous avez fait preuve.

À mes parents. Pour avoir rendu possible ces longues années d'études. Je vous remercie de m'avoir encouragé.

À mes deux sœurs, Emilie et Joséphine. Pour tous ces instants inestimables, ces difficultés qui nous ont rapprochés et pour leur soutien indéfectible ainsi qu'à **Xav** pour ses xaveries et **Ju** pour ses juleries.

A ma nièce et mes deux neveux : **Chloé**-patre, ça Sam-jesté **Samuel** et au Grand **Alexandre**. Je vous remercie pour tous les moments de naïveté et d'innocence que vous parsemez dans ma vie.

À Coline Léger. Ces quatre intenses années d'internat ont été bien plus doux à tes côtés. Je te suis infiniment reconnaissant pour le soutien immense et quotidien que tu m'as offert. Merci simplement d'exister dans ma vie.

J'adresse également ma reconnaissance à mes professeurs de Reims, de Limoges et de Toulouse dans les disciplines pharmaceutiques, médicales et scientifiques pour la richesse et la diversité des enseignements prodigués, ainsi qu'à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre ces onze dernières années.

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Marie Curie

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des enseignants.....	4
Remerciements	7
Table des matières.....	12
Table des illustrations.....	14
Table des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	16
Introduction	18
Partie I Etude bibliographique.....	19
I. Hépatite E	20
I.1. Historique de l'hépatite E et découverte du virus.....	20
I.2. Classification phylogénétique et génotypes du HEV	21
I.3. Répartition mondiale du HEV	23
I.4. Transmission du virus de l'hépatite E.....	25
I.5. Manifestations cliniques	26
I.5.1. Symptomatologie commune	26
I.5.2. Pouvoir pathogène des génotypes 1 et 2 du HEV	27
I.5.3. Pouvoir pathogène des génotypes 3 et 4 du HEV	28
I.6. Traitement de l'infection par le HEV	28
II. Le HEV : un virus quasi-enveloppé.....	29
II.1. Organisation du génome.....	29
II.1.1. <i>orf1</i> code une protéine non-structurale	29
II.1.2. <i>orf2</i> code la protéine de capsid virale et une protéine soluble glycosylée	29
II.1.3. <i>orf3</i> code pour une protéine impliquée dans la sortie des particules virales.....	30
II.2. Cycle cellulaire du virus de l'hépatite E	31
II.2.1. Entrée du virus	31
II.2.2. Réplication de l'ARN viral et assemblage de la capsid virale	31
II.2.3. Bourgeonnement et libération des particules virales.....	32
II.2.4. Influence de la polarisation cellulaire sur le bourgeonnement du HEV.....	34
II.3. Composition et infectiosité des particules virales quasi-enveloppées.....	35
II.3.1. Composition lipidique de la quasi-enveloppe du HEV.....	35
II.3.2. Composition protéique des particules virales quasi-enveloppées	36
II.3.3. Infectiosité des particules des selles et des particules quasi-enveloppées.	36
III. Propagation du virus de l'hépatite E chez l'animal et en culture	37
III.1. Modèles animaux.....	37
III.2. Systèmes cellulaires	39
III.2.1. Lignées cellulaires pour la culture du HEV	39
III.2.2. Modèles de cellules polarisées en culture	39
III.2.3. Milieux de culture pour la propagation du HEV	40
III.2.4. Transfection et infection à partir de souches adaptées en culture.....	40
IV. Quantification de l'infectiosité des particules virales.....	41
IV.1. Utilité de la quantification de l'infectiosité du HEV.....	41
IV.2. Méthodes permettant de quantifier <i>in vitro</i> l'infectiosité des suspensions virales	41
IV.2.1. Plaques Forming Unit (PFU)	42

IV.2.2. Focus Forming Unit (FFU).....	44
IV.2.3. Dilution limite et Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)	45
IV.3. Sélection de la méthode pour le HEV	47
Partie II Etude Expérimentale	49
I. Objectifs	50
II. Matériel et méthodes	51
II.1. Recueil des données	51
II.2. Lignées cellulaires et souches virales.	51
II.3. Composition des différents milieux de culture	52
II.4. Ensemencement des lignées cellulaires	53
II.5. Infection des cellules.....	53
II.6. Lyse des cellules.....	53
II.7. Quantification de l'ARN HEV.....	53
II.8. Calcul de la TCID50.....	55
II.9. Marquage des cellules par immunofluorescence indirecte.	55
II.10. Analyses statistiques.....	56
III. Résultats	57
III.1. Amélioration de la propagation des souches cliniques du HEV en culture.....	57
III.1.1. Effet du DMSO sur la propagation du HEV en culture	57
III.1.2. Utilisation du DMSO dans le milieu de culture pour la propagation de souches cliniques du HEV.....	60
III.2. Mise au point de la méthode des TCID50	61
III.2.1. Comparaison de la lyse cellulaire à des temps précoces et tardifs	61
III.2.2. Effets des paramètres d'infection et de culture sur la TCID50.....	62
III.2.3. Comparaison de l'infectiosité du HEV de génotype 3 sur les lignées HepG2/C3A et HepG2/F2.....	63
III.3. Quantification de l'infectiosité de différentes souches disponibles au laboratoire avec la méthode optimisée.....	65
III.3.1. Quantification de l'infectiosité des souches de génotypes 3f, 3chi et 1 dans différentes matrices biologiques.	65
III.3.2. Quantification de l'infectiosité des particules virales de génotype 1 et 3 produites dans un système d'hépatocytes polarisés en culture.....	67
IV. Discussion	68
Conclusion	72
Références bibliographiques	73
Serment De Galien.....	90

Table des illustrations

Figure 1 : Classification phylogénétique du virus de l'hépatite E.	22
Figure 2 : Répartition géographique des géotypes 1 à 4 du virus de l'hépatite E.	24
Figure 3 : Cinétique de l'infection par le virus de l'hépatite E.	26
Figure 4 : Organisation du génome du virus de l'hépatite E.	30
Figure 5 : Cycle cellulaire du virus de l'hépatite E.	33
Figure 6 : Libération des particules virales quasi-enveloppées dans les deux pôles de l'hépatocytes et perte de la quasi-enveloppe des particules dans l'arbre biliaire.	34
Figure 7 : Principaux modèles mammifères pour l'étude du HEV.	38
Figure 8 : Formation des plaques de lyse avec différentes dilutions d'une suspension de la souche CTN-81 du virus de la rage sur cellules BHK 21.	42
Figure 9 : Phénotype de l'infection des cellules MDCK par des dilutions sérielles d'une souche du virus Influenza A observée en microscopie de fluorescence.	44
Figure 10 : Arbre décisionnel pour la sélection de la méthode de titrage du HEV.	48
Figure 11 : Influence du DMSO sur la production extracellulaire et intracellulaire d'ARN viral du HEV.	57
Figure 12 : Pourcentage de cellules exprimant le marquage ORF2.	59
Figure 13 : Production d'ARN HEV dans le surnageant de culture de cellules HepG2/C3A infectée avec une souche de géotype 3f,3chi ou 1 en milieu WED ou MCCI.	60
Figure 14 : Influence de la durée de culture sur l'infectiosité du nHEV.	61
Figure 15 : Influence des conditions d'infection et de culture virale sur l'infectiosité des particules virales issues des selles et du surnageant de culture.	62
Figure 16 : Infectiosité d'une souche de selle de géotype 3 sur la lignée HepG2/C3A et HepG2/F2.	64
Figure 17 : Infectiosité des souches de HEV issue des selles, du surnageant de culture de cellules infectées, du plasma ou des urines.	65
Figure 18 : Infectiosité des surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules F2 polarisées en culture puis infectées par le HEV.	67

Table des tableaux

Tableau 1 : Souches du virus de l'hépatite E utilisées dans les expérimentations.....	51
Tableau 2 : Milieux utilisés pour la culture des cellules, l'infection et le maintien de la culture virale.	52
Tableau 3 : Séquences des amorces et sonde utilisées.....	53
Tableau 4 : Mélange réactionnel de la RT-qPCR pour la quantification de l'ARN HEV.	54
Tableau 5 : Protocole de la RT-qPCR pour la quantification de l'ARN HEV.	54

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection
CD	Cluster de différenciation
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
FFU	Focus forming unit ou unités formant foci.
G6PD	Glucose-6-phosphate désydrégénase
HRS	Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate
JAK-STAT	Janus kinase – Signal transducers and activators of transcription
kB	Kilobase
MOI	Multiplicity of infection
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MVB	Multivésiculaire body ou corps multivésiculaire
NPC1	Niemann-Pick type C1.
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyéthylène glycol
PFU	Plaque forming unit ou unités formant plages.
SVF	Sérum de veau foetal
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
TGN46	Trans Golgi Network 46
TLR	Toll Like receptor

TSG101	Tumor susceptibility gene 101
TCID50	Tissue culture infectious dose 50
UV	Ultraviolet
HAV	Virus de l'hépatite A
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HEV	Virus de l'hépatite E
nHEV	Virus de l'hépatite E sous forme nue
eHEV	Virus de l'hépatite E sous forme quasi-enveloppée
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
VHP1	Virus produit sur HepG2/C3A au passage 1
VPP1	Virus produit sur PLC/PRF/5 au passage 1

Introduction

Le virus de l'hépatite E (HEV) est un problème croissant de santé publique. Il est responsable d'hépatites virales chroniques chez les patients immunodéprimés dans les pays de l'hémisphère Nord (1) et de mortalité chez la femme enceinte dans les pays à faible niveau d'hygiène (2). L'infection par le HEV peut aussi aggraver des hépatopathies sous-jacentes (3). Bien que le HEV ait été découvert depuis plus de 30 ans (4), la physiopathologie de l'infection et les interactions entre le HEV et son hôte sont encore incomplètement connues.

Le HEV existe sous deux formes chez son hôte : une forme nue dans les selles et une forme associée aux lipides dans le sérum des patients infectés (5). Il n'y a pas de protéines virales décrites à la surface des particules virales associées aux lipides, d'où son appellation de virus « quasi-enveloppé » (6). La quasi-enveloppe des particules virales n'est pas nécessaire à leur infectiosité (5,7–9). Enfin, bien que ce virus soit décrit comme un virus hépatotrope, il a en réalité un tropisme tissulaire plus varié qu'attendu (10,11).

La mise au point d'une méthode de quantification de l'infectiosité des particules virales du HEV pourrait avoir des applications pour la sécurité sanitaire ainsi que pour tester l'efficacité de traitements contre l'infection par le HEV.

Récemment au laboratoire, nous avons mis au point des conditions de culture permettant de propager efficacement l'infection (12). Nous avons mis à profit ces conditions pour l'adaptation au HEV d'une méthode de mesure de l'infectiosité des particules virales (12). L'objectif de cette thèse est de déterminer, à travers une étude rétrospective menée au sein du Centre National de Référence du virus de l'Hépatite E, les conditions optimales de mesure de l'infectiosité des particules virales du HEV.

Nous aborderons, dans une première partie, les caractéristiques cliniques et fondamentales du HEV. Dans la deuxième partie, nous présenterons les résultats de notre étude rétrospective sur les conditions optimales de détermination de l'infectiosité des particules virales et l'utilisation de cette méthode pour mesurer expérimentalement l'infectiosité de souches difficiles à propager en culture jusqu'à présent.

Partie I Etude bibliographique

I. Hépatite E

I.1. Historique de l'hépatite E et découverte du virus

Les premières traces historiques d'hépatites infectieuses datent du 4^{ème} siècle avant J.C. avec la description de la fièvre dite catarrhale par Hippocrate (13). Au Moyen Âge, les catastrophes humanitaires comme les guerres, les tremblements de terre ou les famines sont associées à des épidémies d'hépatites infectieuses. Des épidémies d'hépatites aiguës sont rapportées dans plusieurs pays du monde pendant le XVIII^{ème} et le XIX^{ème} siècle (13). Deux formes d'hépatites ont d'abord été identifiées :

- L'hépatite infectieuse transmissible par voie fécale orale qui sera rebaptisée hépatite virale A.
- L'hépatite sérique responsable d'une épidémie d'hépatite virale chez l'adulte après l'injection d'un vaccin contre la fièvre jaune contenant du sérum humain infecté et qui sera rebaptisée hépatite virale B (14).

Dans les années 1970, d'autres agents causals d'hépatites infectieuses sérologiquement distincts du HAV et du HBV ont été mis en évidence par la transmission sanguine d'hépatites (15) et par des épidémies d'hépatites aiguës entériques (16,17).

Le virus de l'hépatite E a été caractérisé pour la première fois comme un des agents causals des hépatites non-A et non-B lors d'une épidémie d'hépatites aiguës en Ouzbékistan en 1983 par le Docteur Mikhail Balayan. Le Docteur Balayan a inoculé par voie orale les selles purifiées et concentrées d'un patient à un volontaire sain qui a développé une hépatite aiguë 36 jours plus tard. À partir des selles de ce volontaire, il a décrit, par microscopie électronique, des particules virales sphériques ayant une taille de 27 à 30 nm (4). Ces particules ont été isolées à une densité de 1,35 dans un gradient de chlorure de césium ce qui correspond à la densité d'un virus nu. En 1990, Reyes a partiellement cloné le génome du HEV à partir de bile de macaque cynomolgus infecté (*Macaca fascicularis*). Il a déterminé que le HEV est un virus à ARN simple brin polyadénylé et a estimé sa taille à environ 7600 kb (18).

Des approches de datation moléculaire ont permis de déterminer que la population des individus infectés par le HEV a augmenté au cours du XX^{ème} siècle et que les génotypes 1 à 4 du HEV ont commencé à émerger à partir de leur ancêtre commun entre 666 et 1474 (19). La première épidémie d'hépatite E avérée est celle de New Delhi en Inde. L'agent causal a été identifié rétrospectivement grâce à l'analyse des sérums des patients conservés (20).

Le virus de l'hépatite E est endémique. Il est aussi responsable d'épidémies, comme celles de la vallée indienne du Kashmir en 1978 (16,17), du Népal en 1999 (21) ou du Nigeria en 2017 (22).

I.2. Classification phylogénétique et génotypes du HEV

Le virus de l'hépatite E fait partie de la famille des *Hepeviridae*. Cette famille est divisée en deux genres : *Orthohepevirus* et *Piscihepevirus* (Figure 1). Le genre *Piscihepevirus* a pour représentant unique un virus infectant la truite (23).

Le genre *Orthohepevirus* regroupe les virus infectant les mammifères (espèces *Orthohepevirus* A, C et D) et les oiseaux (espèce *Orthohepevirus* B). Les *Orthohepevirus* B infectent les poulets et les aigrettes, les *Orthohepevirus* C infectent les rats, les musaraignes, les bandicoots, les visons et les furets, les *Orthohepevirus* D infectent les chauves-souris (24–26). Seules les souches appartenant aux espèces *Orthohepevirus* A et C ont été associées à des cas humains.

L'espèce *Orthohepevirus* A est divisée en 8 génotypes mais un seul sérotype (27,28). Les génotypes 1 et 2 ont une transmission strictement interhumaine, les génotypes 3 et 4 ont un réservoir zoonotique (29).

Le génotype 3 peut infecter l'homme, le porc, le sanglier, le cerf et le lapin (30–34), la mangouste, la chèvre, le mouton, le cheval, et le dauphin pourraient aussi être des hôtes naturels du HEV de génotype 3 (35–42). Le génotype 3 comporte plusieurs sous-génotypes appartenant à 3 clades. Le premier clade contient 2 groupes phylogénétiques : le premier contenant les sous-génotypes 3a, 3b, 3j et 3k, rares en Europe, et le second contenant les sous-génotypes 3c, 3h et 3i. Le deuxième clade contient les sous-génotypes 3e, 3f et 3g. Enfin, le troisième clade correspond au sous-génotype 3ra (lapin) (43).

Le génotype 4 peut infecter l'homme, le porc, le sanglier (30,44,45). Des cas ont été récemment décrits pour le yak, la vache et la chèvre (46–48). Les génotypes 5 et 6 ont été détectés chez le sanglier au Japon mais pas chez l'homme (49). Les génotypes 7 et 8 ont été détectés chez les dromadaires et les chameaux et peuvent infecter l'homme (50). Parmi les *Orthohepevirus* C, une souche pouvant infecter l'homme provenant du rat a été identifiée récemment (51).

Via des études de transmission de porcs infectés vers des porcs non-infectés enfermés dans le même enclos, nous savons que le HEV de génotype 3 est très infectieux d'un porc à l'autre (52). Cependant, l'infectiosité des différents génotypes de HEV les uns par rapport aux autres est à ce jour inconnue.

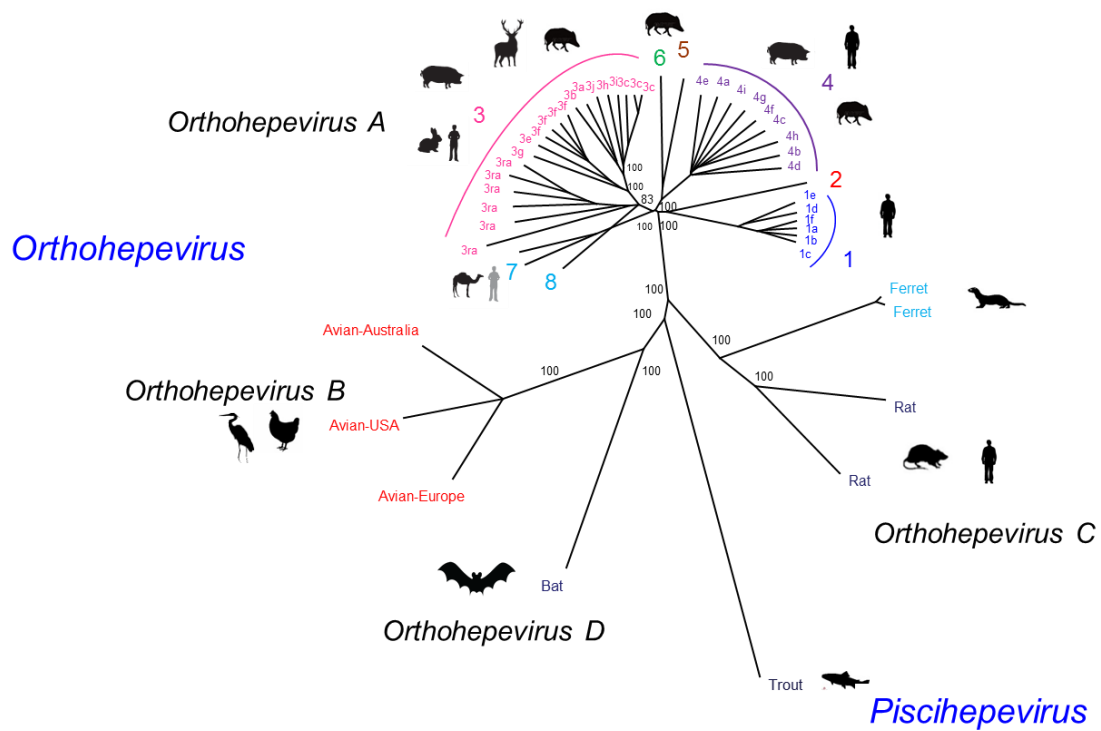


Figure 1 : Classification phylogénétique du virus de l'hépatite E.

D'après Lhomme et al. Virologie 2018 (53)

I.3. Répartition mondiale du HEV

Le virus de l'hépatite E a une répartition ubiquitaire (Figure 2). Parmi les 4 principaux génotypes infectant l'homme, les génotypes 1 et 2 sont prévalents au Mexique (54), en Afrique (55–58) et en Asie (59–62), le génotype 3 sur tout le continent américain (63–66), en Europe (67), en Russie (68), en Afrique du sud (69) au Japon (70–72) et en Australie (73,74) et le génotype 4 en Chine (75,76), au Japon (70,77,78) , à Taïwan (79) et au Vietnam (80,81). Le Sud-Ouest de la France et la Corse sont deux régions hyperendémiques pour le HEV de génotype 3 (82).

Parmi les autres génotypes infectant l'homme, le génotype 7 a été détecté chez le chameau et chez un patient transplanté, infecté chroniquement, qui a consommé du lait et de la viande de chameau. L'infection a évolué vers la chronicité (50).

L'*Orthohepevirus C* provenant du rat (HEV-C) a été détecté à Hong-Kong chez un patient greffé d'organe solide ayant développé une hépatite chronique (51) et chez un patient immunocompétent au Canada, ce dernier ayant contracté la maladie soit au Gabon soit en République Démocratique du Congo (83). L'HEV-C ayant été détecté très récemment, les méthodes diagnostiques ne sont pas encore répandues dans tous les laboratoires. Nous ignorons actuellement si les deux cas décrits sont dus à une transmission exceptionnelle et limitée, si l'HEV-C est déjà prévalent dans la population mais non diagnostiqué jusqu'ici à cause du manque de moyen diagnostique ou s'ils correspondent à l'émergence de l'HEV-C. La mesure de l'infectiosité du HEV-C pourrait apporter des éléments de réponse à ces questions.

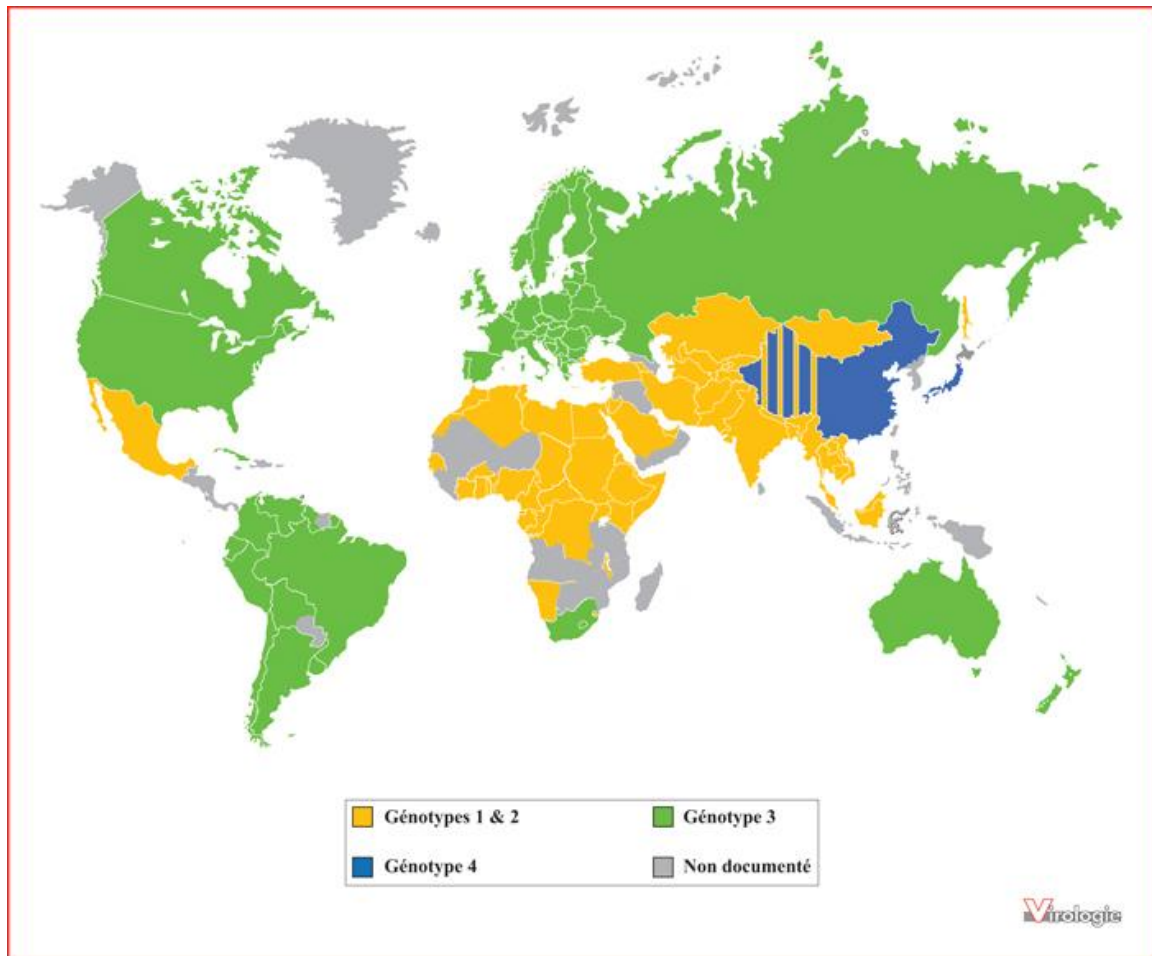


Figure 2 : Répartition géographique des génotypes 1 à 4 du virus de l'hépatite E.
D'après Lhomme et al. Virologie 2018 (53)

I.4. Transmission du virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E se transmet par voie fécale-orale mais les différents génotypes ont des caractéristiques épidémiologiques que l'on peut regrouper en deux catégories :

Les génotypes 1 et 2 du HEV ont une transmission interhumaine stricte. La consommation d'eaux contaminées et d'aliments souillés par les selles infectées sont les principales voies de transmission pour ces deux génotypes (16,17). Des épidémies de HEV de génotypes 1 ou 2 se sont produites dans des camps de réfugiés à cause de l'accès limité aux infrastructures d'hygiène et à de l'eau potable (22,58).

Les génotypes 3 et 4 sont anthroponotiques. L'infection se transmet principalement par la consommation de foie de porc contaminé cru ou mal cuit (84–86). Des études chez le porc d'élevage ont montré qu'il y a une grande dissémination du virus à travers le monde. La séroprévalence du HEV dans les élevages de porc avoisine les 100 % dans certaines aires géographiques européennes et chinoises (30,87). Le contact direct ou indirect avec les animaux infectés peut aussi transmettre l'infection (88). Des transmissions zoonotiques sont avérées comme avec le sanglier (89,90), le cerf (31,32) ou le lapin (33,34,91) ou suspectées comme avec le mouton (42), la chèvre (40) et la vache (47) ainsi que le chat et le chien domestique (92). Les fruits de mer peuvent aussi transmettre l'infection. Cette contamination est certainement due à la propriété des fruits de mer de filtrer et concentrer les particules virales (44,93).

Pour le HEV de génotype 3 et 4, l'infection peut aussi se transmettre par la transfusion de produits sanguins infectés posant ainsi des problèmes de sécurité transfusionnelle (94–98). L'ARN du HEV de génotype 1 a aussi été retrouvé dans des produits sanguins et suggère une transmission possible par les dons sanguins (99).

I.5. Manifestations cliniques

I.5.1. Symptomatologie commune

Pour la plupart des patients immunocompétents, l'infection par le HEV se manifeste par une infection asymptomatique ou une hépatite aiguë spontanément résolutive. Néanmoins, elle peut évoluer vers une hépatite fulminante rapidement fatale en cas d'hépatopathie sous-jacente. Des études d'administration de selles infectées ont montré que la phase d'incubation varie de 30 à 36 jours, la phase ictérique dure environ 90 jours et se termine par une phase de convalescence progressive allant jusqu'à 20 semaines (4,100).

La symptomatologie de l'hépatite E est très similaire aux autres formes d'hépatites virales. Sur le plan clinique, la phase symptomatique associe asthénie, douleurs abdominales, nausées, vomissements, anorexie suivie par de la fièvre, des urines foncées, des selles décolorées, une hépatomégalie, un ictère et un prurit (4,101).

Sur le plan biologique l'infection sera associée à une augmentation des transaminases et à une hyperbilirubinémie. L'ARN viral est détectable dans le sang et dans les selles dès la 2^{ème} semaine post-infection et persiste 4 semaines dans le sang et 5 semaines dans les selles en moyenne. Les IgM et les IgG apparaissent respectivement dès la 4^{ème} et 5^{ème} semaine post-infection (Figure 3) (102).

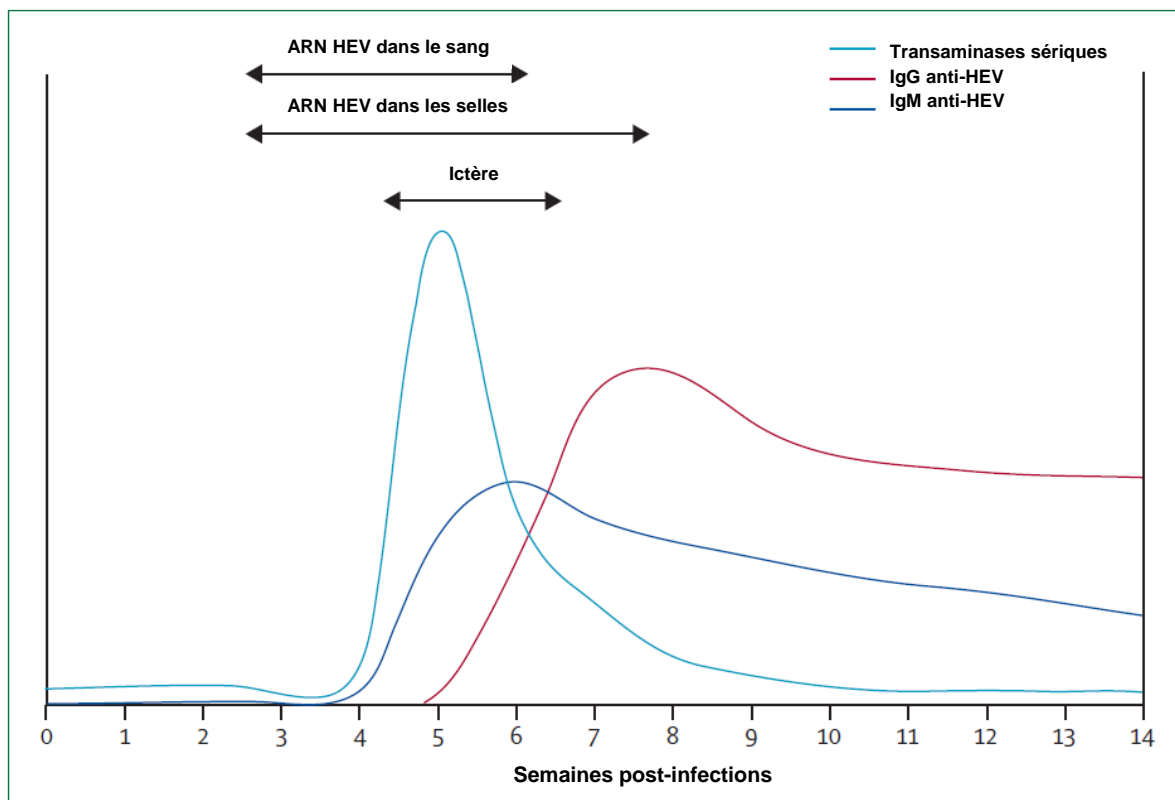


Figure 3 : Cinétique de l'infection par le virus de l'hépatite E.
Adapté de Dalton et al. The Lancet Infectious Disease 2008 (102)

L'infection par le HEV peut aussi provoquer un large éventail de manifestations extra-hépatiques (103). Les manifestations les plus fréquemment observées sont :

- Les atteintes neurologiques: syndromes de Guillain-Barré, encéphalites et méningites pour les génotypes 1 et 3 et uniquement pour le génotype 3 des douleurs neuropathiques, troubles sensoriels indolores, syndromes de Parsonage Turner, (104). Ces manifestations sont plus fréquentes chez les patients immunocompétents, suggérant une physiopathologie auto-immune (105). Des études portant sur les quasi-espèces de l'hépatite E chez des patients ont montré une grande variabilité génétique des variants du virus (106). Une compartimentalisation des variants du HEV entre le sang et le liquide céphalo-rachidien a été découverte chez un patient chroniquement infecté et développant des manifestations neurologiques. Cette étude suggère que les symptômes neurologiques pourraient être liés à l'émergence d'un variant neurotrophique (107), l'infectiosité de ce variant reste à démontrer.
- Les atteintes rénales : glomérulonéphrites membranoprolifératives (génotype 1 et 3), néphropathies à IgA (génotype 3) et cryoglobulinémie (génotype 3) (108,109). Des particules virales infectieuses ont été détectées dans l'urine de patients chroniquement infectés par du HEV de génotype 3 sans atteinte rénale avérée. Ces particules sont trop volumineuses pour traverser la barrière de filtration glomérulaire et pourraient provenir d'une infection et d'une réplication du HEV dans l'arbre rénal ou urinaire (110).
- Les manifestations hématologiques : anémie hémolytique liée à un déficit en G6PD (génotype 1), thrombocytopenie (génotype 1 et 3), anémie hémolytique auto-immune, et gammopathies monoclonales de signification indéterminée (génotype 3) (111–116).

I.5.2. Pouvoir pathogène des génotypes 1 et 2 du HEV

Les infections par le génotype 1 et 2 du HEV touchent surtout les enfants jusqu'à deux ans et les adultes jeunes entre 15 et 30 ans.

L'infection par le génotype 1 chez la femme enceinte peut entraîner une hépatite aiguë fulminante fatale ainsi qu'une coagulation intravasculaire disséminée, une éclampsie, une rupture des membranes, un avortement spontané et une mort fœtale in-utero (117). Les complications obstétricales se produisent majoritairement lorsque l'infection survient pendant le 3^{ème} trimestre de grossesse. Des études ont montré qu'environ 60 % des femmes infectées par le génotype 1 du HEV développeront une hépatite aiguë pouvant évoluer vers une hépatite fulminante avec une létalité variant de 15 à 25% (16,60,118,119). Enfin, des transmissions verticales de l'hépatite E ont été décrites (2).

L'infection et la réplication du HEV de génotypes 1 et 3 ont été avérées sur un modèle d'explant de placenta et de décidua humain. Ces travaux suggèrent d'une part que la réplication du génotype 1 du HEV est plus efficace dans ces tissus que le génotype 3 et d'autre part que l'infection par le génotype 1 induit un environnement pro-inflammatoire (10). Les différences observées entre le génotype 1 et 3 du HEV pourraient expliquer les formes sévères observées avec le génotype 1 du HEV chez la femme enceinte (10).

I.5.3. Pouvoir pathogène des génotypes 3 et 4 du HEV

Contrairement aux génotypes 1 et 2, la séroprévalence des IgG anti-HEV augmente avec l'âge pour les génotypes 3 et 4 (82). La plupart des infections par le HEV de génotype 3 ou 4 sont asymptomatiques. Cependant, chez les patients immunodéprimés la primo-infection peut évoluer vers une infection chronique définie par la persistance de la virémie pendant au moins 3 mois (96). Les populations concernées sont les patients transplantés d'organes solides (1,120,121), les patients infectés par le HIV avec un faible taux de lymphocyte T CD4+ (122–124) et les patients atteints d'affections hématologiques (125–127). En l'absence de traitement, l'infection chronique peut évoluer vers une fibrose hépatique et une cirrhose en 2 à 5 ans (128,129).

Enfin, des études rétrospectives ont montré que des cas d'atteintes hépatiques classés parmi les hépatites induites par les médicaments sont en réalité des cas d'hépatites virales E. Les caractéristiques cliniques des patients sensibles à l'infection et les classes médicamenteuses concernées sont inconnues (130).

I.6. Traitement de l'infection par le HEV

Les hépatites E aiguës chez l'adulte immunocompétent sont spontanément résolutive et ne nécessitent pas de traitement particulier. Chez les patients sous traitement immunosuppresseur atteints d'hépatite E chronique, la stratégie thérapeutique consiste à diminuer la posologie des immunosuppresseurs pendant 3 mois. Si l'ARN du HEV est encore retrouvé dans les selles ou le sang du patient, il est alors recommandé de poursuivre le traitement par la ribavirine en monothérapie à la posologie de 600 à 800 mg par jour *per os* en deux prises quotidiennes pendant 3 mois (96,131).

En cas de rechute, avérée par la réapparition de la virémie dans les 12 semaines, le patient est retraité par ribavirine en monothérapie pendant encore 6 mois (132). Le PEG-interféron- α pendant 3 mois constitue une alternative en cas d'échec du traitement par ribavirine pour les patients transplantés de foie (96). Les patients sont dans une impasse thérapeutique en cas d'échec de ces deux thérapies (96).

La ribavirine est fréquemment associée à des effets indésirables parmi lesquelles une anémie hémolytique dose-dépendante, une dyspnée, de la toux et des réactions cutanées (96,133). La posologie de la ribavirine chez les patients atteints d'hépatite E chronique doit prendre en compte les co-morbidités associées comme l'anémie et le débit de filtration glomérulaire (134).

La ribavirine et le Peg-Interféron- α sont tératogènes et ne peuvent pas être utilisés en cas d'infection par le HEV chez la femme enceinte au 3^{ème} trimestre de grossesse. Ces patientes sont d'emblée dans une impasse thérapeutique (135).

Un vaccin (Hecolin[®]) est disponible en Chine. Il est efficace chez le jeune adulte, cependant la durée d'efficacité du vaccin et la concentration protectrice en anticorps sont inconnues. De plus, l'efficacité et l'innocuité du vaccin vis-à-vis des femmes enceintes, des personnes âgées, des patients immunodéprimés n'ont pas été déterminées (136).

II. Le HEV : un virus quasi-enveloppé

II.1. Organisation du génome

Le virus de l'hépatite E est un virus à ARN simple brin de polarité positive de 7200 paires de bases. Son génome est coiffé à l'extrémité 5' par une 7-méthyl guanosine et polyadénylé à l'extrémité 3' ; il est organisé en trois cadres ouverts de lecture (Figure 4, *Open Reading Frame : orf*) (137).

II.1.1. *orf1* code une protéine non-structurale

La séquence d'*orf1* code une protéine non-structurale de 1693 acides aminés. Cette protéine possède plusieurs domaines fonctionnels avec des activités méthyl transférase, cystéine protéase, ARN hélicase avec une activité 5' nucléoside triphosphatase, ARN polymérase dépendante de l'ARN, des domaines de liaison au zinc ou au magnésium et deux régions X et Y dont les fonctions sont inconnues (138–141). ORF1 possède aussi une région hypervariable riche en proline qui code pour une protéine intrinsèquement désordonnée ayant une grande plasticité fonctionnelle. Cette région est impliquée dans l'adaptation des souches cliniques en culture et dans la persistance du HEV dans son hôte, elle constitue un site d'insertion d'ARNm de l'hôte qui pourrait contribuer à cette adaptation (142,143). L'électroporation de cellules Hep293T avec un réplicon possédant la séquence de l'épitope de l'hémagglutinine sur *orf1* a permis de prouver en Western blot que la protéine ORF1 n'est pas clivée dans la cellule (144).

II.1.2. *orf2* code la protéine de capsid virale et une protéine soluble glycosylée

La séquence d'*orf2* code pour la protéine de capsid virale. Cette dernière est constituée de 660 acides aminés. Les études structurales ont montré que l'ARN génomique viral est encapsidé dans une capsid icosahédrique formée de 180 protéines ORF2 assemblées en décamères (pentamères de dimères), avec un nombre de triangulation $T=3$ (145). La structure de la protéine de capsid ORF2 est divisée en trois parties, le domaine S (shell), le domaine M (middle) et le domaine P (protruding) (146,147). Le domaine S forme la structure interne de la particule virale directement en contact avec l'ARN viral alors que les domaines M et P sont en contact avec le milieu extérieur. C'est dans le domaine P que sont situés les épitopes immunodominants d'ORF2 (146).

Plusieurs travaux récents ont décrit une forme glycosylée de la protéine de capsid ORF2. Cette forme possède un peptide signal qui permet à la protéine ORF2 d'être N-glycosylée puis O-glycosylée afin d'être sécrétée via la voie de sécrétion classique. Cette forme glycosylée se retrouve dans le sérum des patients infectés et pourrait servir de leurre immunitaire afin de diriger la réponse immunitaire humorale envers la protéine ORF2 (148,149). D'autre part, cette forme soluble d'ORF2 et les particules virales infectieuses ne rentrent pas en compétition sur leurs récepteurs lors de l'étape d'attachement du virus (148,149).

Des travaux portant sur la souche de laboratoire Kernow-C1/p6 sur des modèles d'hépatocarcinomes ont montrés qu'une partie d'ORF2 est transloquée dans le noyau. Les effets de cette protéine dans le noyau restent à explorer (150).

II.1.3. *orf3* code pour une protéine impliquée dans la sortie des particules virales.

La séquence d'*orf3* chevauche partiellement celle d'*orf2* et code pour une protéine de 114 acides aminés. La protéine ORF3 est impliquée dans la morphogénèse des particules virales et leur bourgeonnement sous une forme quasi-enveloppée (151).

Des travaux effectués à partir de la transfection du clone infectieux Kernow-C1/p6 et d'expériences de mutagenèse dirigée des modèles d'hépatocarcinomes humains ont montré que la protéine ORF3 est capable de s'oligomériser et d'être palmitoylée sur sa partie N-terminale riche en cystéine (152). La palmitoylation de ORF3 va lui permettre de s'enchâsser dans la membrane plasmique des corps multivésiculaires (152). Il a été mise en évidence, sur la base de travaux d'expression hétérologue d'ORF3 dans des oocytes, la propriété d'ORF3 de former des complexes multimériques avec une activité de canal ionique (153).

De plus, ORF3 aurait un effet immunomodulateur. ORF3 inhibe la phagocytose des macrophages en inhibant la voie de signalisation JAK1/STAT1 (154). Des travaux portant sur la surexpression d'ORF3 ont montré qu'il inhibe l'expression du TLR3 et du TLR7 provoquant ainsi une diminution de la production des interférons de type I (155).

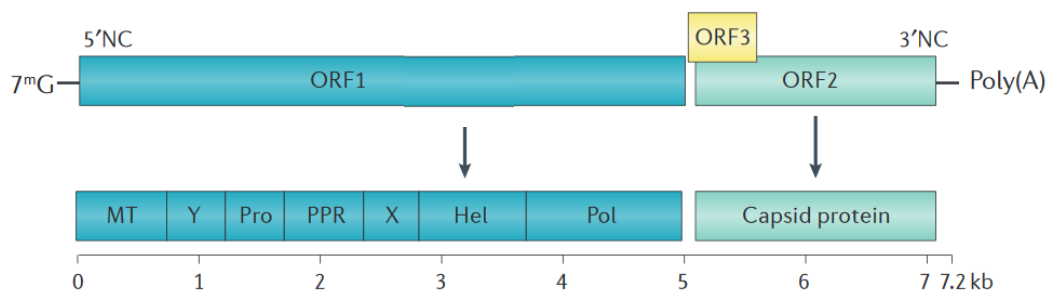


Figure 4 : Organisation du génome du virus de l'hépatite E.

Adapté de Kamar et al. 2017 Nat Rev Dis Primers (100)

MT : Méthyl transférase, PPR : région riche en proline, Pro : cystéine protéase, Hel : Hélicase, Pol : ARN polymérase dépendante de l'ARN et Y et X : deux régions dont la fonction est inconnue.

II.2. Cycle cellulaire du virus de l'hépatite E

Les principales étapes du cycle intracellulaire du HEV, de l'entrée à la libération des particules virales, sont schématisées dans la Figure 5.

II.2.1. Entrée du virus

Chez l'hôte, le HEV est retrouvé sous deux formes, nue ou associé aux lipides. Le ou les récepteurs de ces deux formes de particules virales sont inconnus à ce jour.

Sur les cellules d'hépatocarcinome Huh-7 et HepG2, les protéines ORF2 adhèrent de façon non-spécifique aux héparanes sulfates à la membrane cellulaire (8,156). L'effet des héparanes sulfates est plus modéré sur l'entrée des particules virales quasi-enveloppées (8).

L'entrée des particules virales nues et quasi-enveloppées se fait par endocytose dans des vésicules recouvertes de clathrine, ce processus implique aussi la dynamine-2, le cholestérol membranaire et un remodelage du cytosquelette (8,157). Concernant les particules virales quasi-enveloppées, le transporteur du cholestérol NPC1 extrait alors le cholestérol de la membrane et permet la déstabilisation et l'extraction de cette membrane. La fusion de cette l'endosome avec le lysosome acidifie son contenu et permet la décapsidation des particules virales pour libérer son ARN (8). Actuellement, nous ignorons le mécanisme de décapsidation de l'ARN viral.

II.2.2. Réplication de l'ARN viral et assemblage de la capsid virale

Le modèle proposé pour le cycle viral du HEV est basé sur l'analyse des différentes régions du génome et les analogies avec les autres virus à ARN positif simple brin (Figure 5). Cependant, des études *in vitro* sur différents systèmes cellulaires et l'utilisation de réplicons ont mis en évidence de nouveaux éléments.

Suite à la décapsidation de l'ARN viral, la réplication du HEV se produit dans le cytoplasme. Le brin d'ARN positif est traduit, à partir de sa coiffe, en polyprotéine non structurale ORF1. A partir du génome viral, les activités ARN polymérase dépendante de l'ARN et hélicase d'ORF1 vont permettre la synthèse d'un ARN simple brin négatif qui va servir de matrice pour la synthèse des ARN génomique et subgénomique. L'ARN subgénomique porte les séquences *orf2* et *orf3* et sert de matrice pour la traduction des protéines ORF2 et ORF3 (158,159).

La séquence *orf2* possède deux codons d'initiation de la traduction qui vont permettre la traduction de cette protéine en deux formes: ORF2 de capsid et ORF2 glycosylée.

La protéine de capsid d'ORF2 encapside le génome viral grâce à la liaison à un signal d'encapsidation de 76 nucléotides situé près de l'extrémité 5' du génome viral (141). Des études en microscopie confocale ont montré la colocalisation d'ORF1 avec ORF2, ORF3 et l'ARN viral, ainsi qu'avec les marqueurs des endosomes tardifs CD63 et CD151 (144). Les endosomes tardifs pourraient être le site de réplication et d'assemblage du HEV.

II.2.3. Bourgeonnement et libération des particules virales

Lorsque les cellules d'hépatocarcinome humain PLC/PRF/5 sont infectées par un virus dont le codon d'initiation d'ORF3 a été substitué par un codon alanine, il n'y a pas de libération de particules virales associées aux lipides dans le surnageant de culture, ce qui indique qu'ORF3 est nécessaire à la libération de ces particules (151).

Des travaux, effectués à partir de la transfection du clone infectieux Kernow-C1/p6 et d'expériences de mutagenèse dirigée, ont montré que la protéine ORF3 est capable de s'oligomériser et d'être palmitoylée sur sa partie N-terminale riche en cystéine (152). La palmitoylation d'ORF3 va lui permettre de s'enchaîner dans la membrane plasmique des MVB (152).

Des expériences d'immunoprécipitation ont montré l'interaction d'ORF3 avec TSG101, une protéine accessoire du système ESCRT (160). Le motif PSAP d'ORF3 est nécessaire à cette interaction (160) et permet la libération des particules virales associées aux lipides hors de la cellule pour les génotype 1 et 3 du HEV (160–162). Les particules virales portant la mutation du motif PSAP et issues du lysat cellulaire, migrent à une densité de 1,22 sur gradient de sucrose, ce qui correspond à la densité des particules virales nues retrouvées dans les selles des patients infectées. Sur la base de ces travaux, ORF3 est donc nécessaire à la morphogénèse des particules virales quasi-enveloppées (Figure 5) (151,161,162).

L'inhibition de la voie d'exocytose par le GW4869 inhibe la libération de l'ARN du HEV dans le surnageant de culture des cellules PLC/PRF/5 infectées par le HEV de génotype 3 (163). La bafilomycine stimule la voie d'exocytose et augmente la libération d'ARN HEV dans les mêmes conditions (163). De plus, l'inhibition de l'expression des protéines Rab27a et HRS par transfection de siRNA inhibe la libération de l'ARN du HEV dans le surnageant des cellules PLC/PRF/5 (163). Cela suggère que HRS, protéine associée au système ESCRT, et Rab27a, protéine accessoire impliquée dans le recyclage des MVB (164), sont impliquées dans la libération des particules virales via les corps multivésiculaires. Les MVB sont alors transportés jusqu'à la membrane plasmique et fusionnent avec la membrane pour libérer les particules virales dans le milieu extracellulaire (Figure 5) (9,163).

Bien que la quantité d'ARN viral du HEV puisse être élevée dans le surnageant de culture, rapporté à la quantité d'ARN viral il y a une faible proportion de particules virales infectieuses présentes dans les selles et dans le surnageant de culture (9,12). La quantité d'ARN viral ne reflète donc pas parfaitement la quantité de particules virales infectieuses et les méthodes de quantification par RT-qPCR doivent être appuyées par des méthodes mesurant l'infectiosité des suspensions virales.

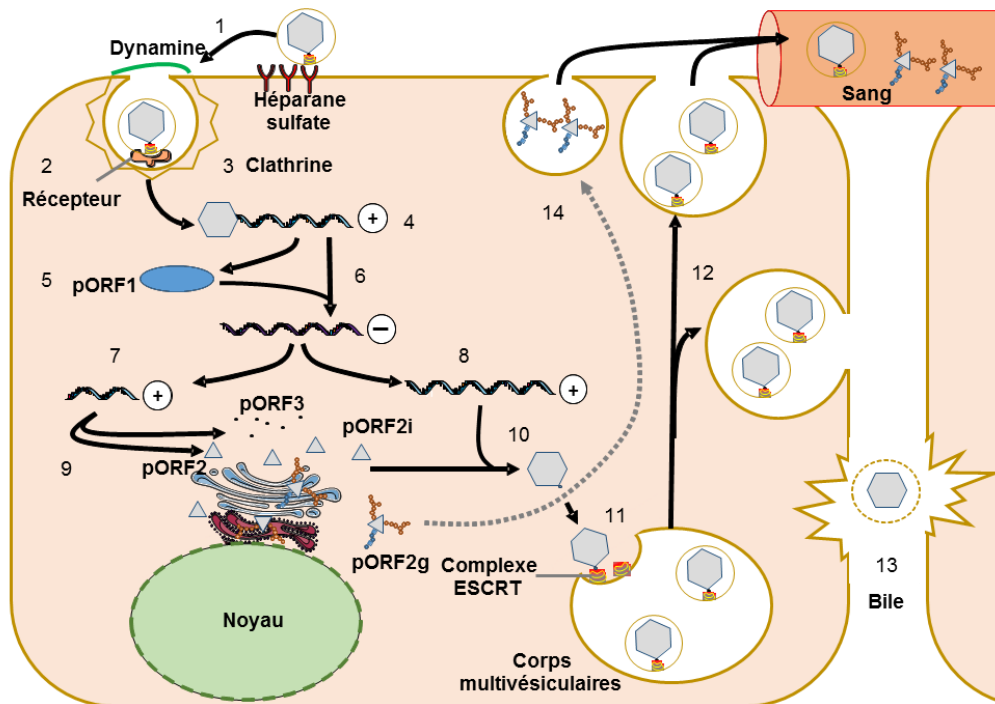


Figure 5 : Cycle cellulaire du virus de l'hépatite E.

Adapté de Lhomme et al. Virologie 2018 (53)

Le schéma illustre les étapes de (1) : attachement non-spécifique aux héparanes sulfates, (2) : attachement au récepteur spécifique, (3) : endocytose médié par la clathrine, (4) : décapsidation des particules virales, (5) : synthèse d'ORF1 portant notamment l'activité ARN polymérase dépendante de l'ARN, (6) : synthèse de l'ARN simple brin négatif (7) : synthèse d'ARN simple brin positif subgénomique polycistronique et (8) : réplication du génome complet du virus, (9) : traduction des protéines ORF2, ORF2 glycosylée et ORF3, (10) : encapsidation de la particule virale pour former la particule virale, (11) : bourgeonnement des virions dans les vésicules intraluminales des corps multivésiculaires, (12) : libération des particules dans le flux sanguin ou le flux biliaire, (13) : perte de la quasi-enveloppe virale sous l'action détergente des acides biliaires et (14) : sécrétion de la forme soluble d'ORF2.

II.2.4. Influence de la polarisation cellulaire sur le bourgeonnement du HEV

Les cellules épithéliales et endothéliales ont une structure polarisée avec un pôle apical en contact avec la lumière et un pôle basolatéral en contact avec le flux sanguin. Les voies d'endocytose-exocytose sont polarisées dans ces épithéliums avec une endocytose-exocytose dirigée vers le pôle apical et une autre, distincte, vers le pôle basolatéral (165). Les exosomes sécrétés dans ces deux pôles ont des propriétés différentes en terme de densité, de composition protéique (166–169) et de fonctions physiologiques (170,171).

De nombreux virus infectant les épithélia tirent parti de la polarisation cellulaire pour leur entrée ou leur libération (172–177). Contrairement à celle des autres virus hépatotropes (178–180), la libération du virus de l'hépatite E se fait préférentiellement au pôle apical des cellules polarisées en culture (12,161). Les particules virales sont associées aux lipides dans le surnageant apical et basolatéral des hépatocytes polarisés mais les particules virales apicales sont plus denses dans le surnageant apical (12). Les particules virales infectieuses sont sécrétées préférentiellement du côté apical des hépatocytes par la voie d'exocytose (12).

Ces données suggèrent qu'il existe un mécanisme de tri permettant au HEV d'être libéré vers le pôle vasculaire ou vers le pôle biliaire des hépatocytes. Les particules virales libérées dans les canalicules biliaires pourraient répandre l'infection dans l'arbre biliaire. Dans l'arbre biliaire et le duodenum, ces particules virales subirait l'action des sels biliaires et des protéases de l'hôte pour donner les particules virales nues retrouvées dans les selles des patients infectées. Les particules libérées dans le flux sanguin pourrait répandre l'infection du HEV dans son hôte (Figure 6) (5,9,181).

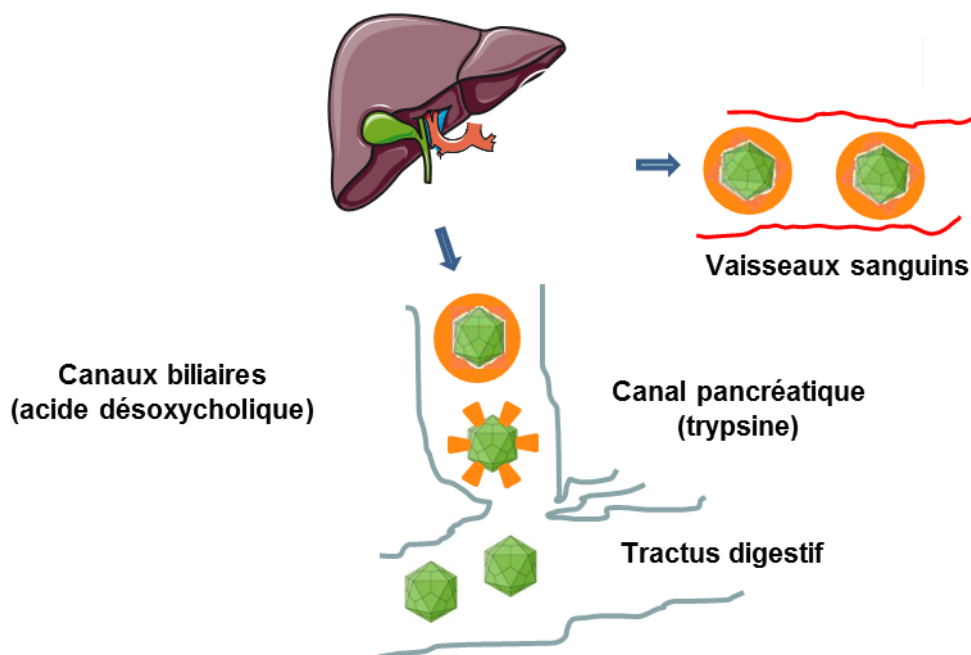


Figure 6 : Libération des particules virales quasi-enveloppées dans les deux pôles de l'hépatocytes et perte de la quasi-enveloppe des particules dans l'arbre biliaire.

Adapté de Okamoto Hiroaki Journal of Gastroenterology 2013 (181)

II.3. Composition et infectiosité des particules virales quasi-enveloppées

Les données de la littérature suggèrent que les particules virales utilisent la voie d'exocytose pour être empaquetées dans les exosomes. Selon cette hypothèse, le tropisme et l'infectiosité des particules virales quasi-enveloppées dépendrait des propriétés des exosomes. Cependant, les mécanismes qui déterminent le tropisme cellulaire des exosomes sont actuellement insuffisamment documentés (182,183).

II.3.1. Composition lipidique de la quasi-enveloppe du HEV

Les particules quasi-enveloppées du HEV sont isolées par ultracentrifugation dans une fraction correspondant à la densité des exosomes (5,9,12). A partir de culture d'hépatocarcinome infectée par du HEV de génotype 3, une étude de lipidomique a comparé la composition lipidique des exosomes isolés par ultracentrifugation avec celle des cellules mères (9). La fraction contenant les exosomes est enrichie en cholestérol, en phosphatidylsérine, sphingomyéline et en céramides et elle est appauvrie en phosphoinositides et en acides gras polyinsaturés, ce qui est une caractéristique des exosomes (9,182). L'infection par le HEV ne modifie pas la proportion des lipides isolés dans la fraction de densité contenant les exosomes et appuie ainsi l'hypothèse de la sécrétion des particules virales grâce à la voie d'exocytose cellulaire (9,163). Nous ignorons actuellement si l'infection stimule la production et/ou la libération des exosomes. De plus, nous ignorons l'influence de la composition lipidique des particules virales sur leur infectiosité.

Des études suggèrent que les particules virales bourgeonnent dans différentes sous populations d'exosomes. Ces sous populations pourraient avoir des propriétés biologiques différentes les unes des autres en terme de tropisme tissulaire, d'infectiosité et de sensibilité à l'immunité humorale (9,12,184). La caractérisation des propriétés et des infectiosités de ces sous-populations virales pourrait permettre la compréhension des mécanismes sous-tendant la physiopathologie de l'infection.

II.3.2. Composition protéique des particules virales quasi-enveloppées

Les données décrivant la composition du HEV proviennent d'expériences de séroneutralisation et d'immunocapture.

Le rendement d'immunocapture des particules virales quasi-enveloppées par des anticorps dirigés contre ORF2 et ORF3 est faible. Un traitement solvant-détergent par la déoxycholate augmente le rendement de capture avec des anticorps spécifiques d'ORF2 ou d'ORF3 (185). Ces résultats indiquent que les protéines virales sont absentes de la surface des particules virales quasi-enveloppées.

Les particules virales quasi-enveloppées isolées par ultracentrifugation dans la fraction des exosomes peuvent être immunoprécipitées par des anticorps anti-CD63, anti-CD9, anti-CD8, anti-EpCAM et par des protéines se liant aux phosphatidylsérines (184,186). Ces protéines sont retrouvées dans les exosomes (182) et seraient intégrées à la membrane des particules virales quasi-enveloppées au cours de leur biogénèse. Les particules virales quasi-enveloppées peuvent aussi être immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre TGN46 (186). TGN46 est un marqueur du réseau trans-golgien et suggère que cet organite pourrait contribuer à la biogénèse de la membrane du HEV (184). L'infectiosité des particules virales capturées par immunocapture n'a pas été évaluée et ces particules virales capturées pourrait correspondre à des sous-populations de particules défectives.

II.3.3. Infectiosité des particules des selles et des particules quasi-enveloppées.

Les populations de particules virales nues issues des selles des patients infectés contiennent une proportion plus importante de particules virales infectieuses que les populations de particules virales quasi-enveloppées obtenues en culture (7–9).

Bien qu'il y ait moins de particules virales infectieuses dans le sérum des patients, les particules virales quasi-enveloppées sont protégées des anticorps neutralisants grâce à leur quasi-enveloppe. Lorsque ces particules sont traitées par des solvants-détergents, leur infectiosité augmente mais en contrepartie, elles redeviennent sensibles à l'action neutralisante des anticorps anti-HEV (163).

Ces sous populations pourraient avoir des propriétés biologiques différentes les unes des autres en terme de tropisme tissulaire, d'infectiosité et de sensibilité à l'immunité humorale (9,12,184). La caractérisation des propriétés et des infectiosités de ces sous-populations virales pourrait permettre la compréhension des mécanismes sous-tendant la physiopathologie de l'infection.

III. Propagation du virus de l'hépatite E chez l'animal et en culture

La mesure de l'infectiosité des particules du HEV nécessite soit de disposer de modèles animaux, soit de système de culture performants. Des avancées dans la propagation du HEV ont eu lieu depuis sa découverte en 1983 (4). Les modèles animaux ou *in vitro* rendent possible la mesure de son infectiosité et ont permis des avancées dans la compréhension de la physiopathologie de l'infection.

III.1. Modèles animaux

L'avantage d'utiliser un modèle animal pour tester l'infectiosité des inocula du HEV est que l'infection peut être vérifiée sans équivoque en surveillant l'apparition des signes de l'infection comme les signes cliniques, l'excrétion fécale du virus, la virémie ou la séroconversion des animaux. Plusieurs espèces animales sont sensibles à l'infection avec une ou plusieurs souches humaines de HEV de génotype 1 à 4 ou avec des souches circulant chez l'animal. L'infection des primates non-humains (4,187–191), des porcs (52,192), des rongeurs (193) et des lapins (194,195) permet d'obtenir une excrétion fécale et/ou une virémie (Figure 7).

Il y a une variabilité interindividuelle de la symptomatologie entre les animaux même au sein d'un même lot. L'éventail des manifestations est variable, les signes de l'infection peuvent être transitoires, subcliniques ou infracliniques (192). Dans ce cas, des méthodes complexes comme la RT-qPCR ou des tests ELISA doivent être mises en œuvre pour détecter la présence de l'ARN viral, des antigènes viraux ou la séroconversion des animaux.

Les rats et les souris ne semblent pas être sensibles à l'infection par les génotypes 1 à 4 mais le sont aux souches du HEV circulant chez le rat (193). Les gerbilles de Mongolie et les lapins sont de petits animaux qui semblent adaptés à l'évaluation de l'infectiosité du HEV mais le nombre d'études réalisées est encore trop faible (196). La concentration virale nécessaire pour infecter un modèle n'est pas toujours clairement indiquée. Dans la plupart des études, seule la quantité d'ARN du HEV dans l'inoculum est déterminée et ne correspond pas à la quantité de particules infectieuses présentes.

L'utilisation de modèles animaux présente d'autres inconvénients pour évaluer en routine l'infectiosité des inocula du HEV. Le délai nécessaire à la manifestation clinique des symptômes peut être long, de l'ordre de plusieurs jours à plusieurs semaines et peut ne pas être identique pour tous les animaux infectés. À cause des besoins en infrastructure, en personnel et en matériel, la reproduction des expérimentations est rare et limite la significativité statistique des résultats. La main-d'œuvre nécessaire à l'entretien des animaux de laboratoire, en particulier les gros animaux tels que les porcs ou les primates non-humains, peut être considérable. En outre, si les animaux sont logés ensemble, le risque d'infection croisée est important, notamment pour le porc (52) rendant ainsi l'interprétation des résultats difficile.

Enfin, l'utilisation expérimentale d'animaux de laboratoire entraîne des implications éthiques (197–199).

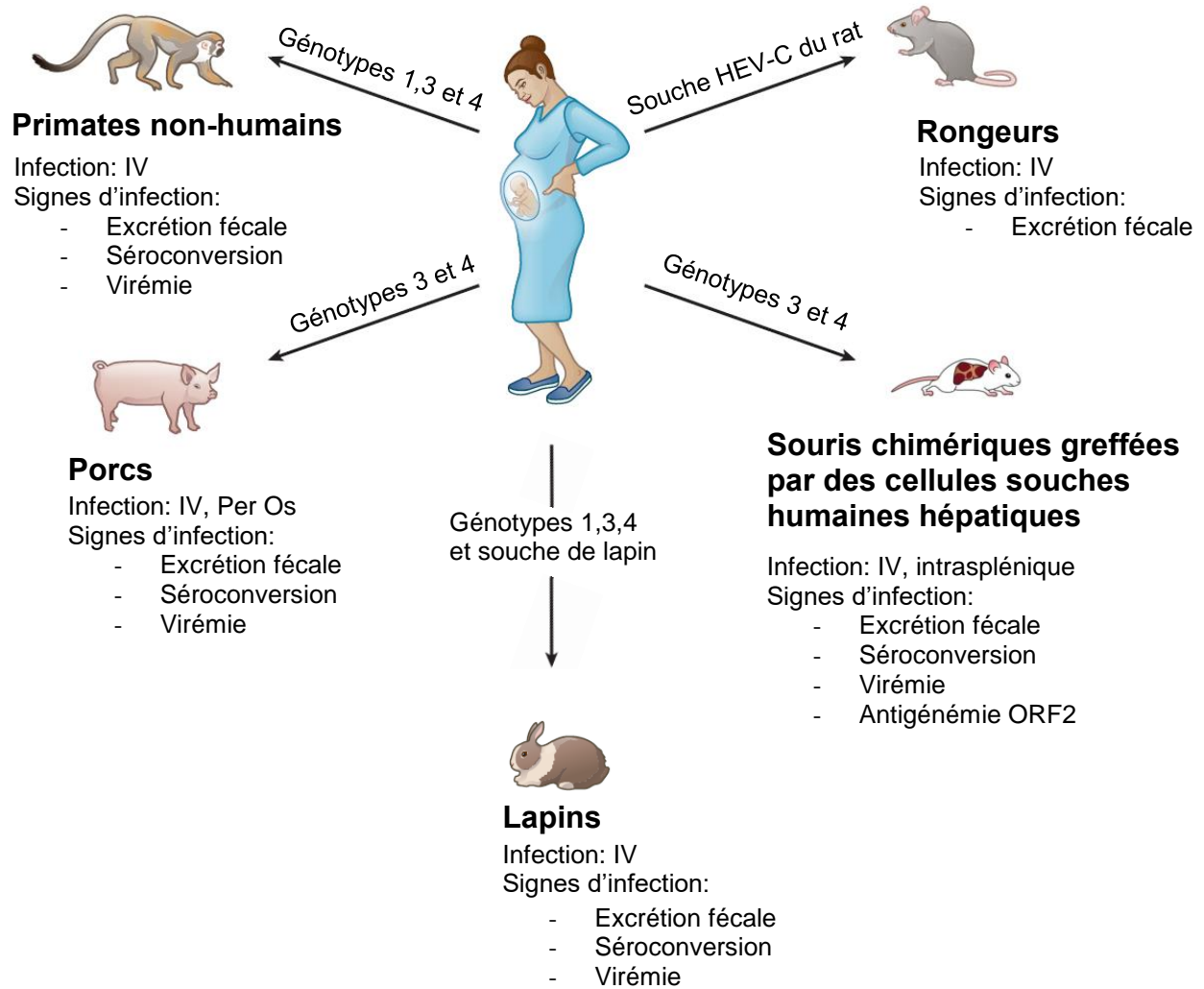


Figure 7 : Principaux modèles mammifères pour l'étude du HEV.

Adapté de Kenney et al., Annual Review of Animal Biosciences 2019 (200)

III.2. Systèmes cellulaires

III.2.1. Lignées cellulaires pour la culture du HEV

En tant que virus hépatotrope, le HEV a d'abord été cultivé sur des lignées d'hépatocarcinomes humains. La culture du HEV est longue et difficile. Très peu d'isolats cliniques peuvent être efficacement cultivés (181).

La première propagation réussie du HEV a eu lieu en 1987 sur la lignée PLC/PRF/5. Cette lignée a été infectée avec des extraits fécaux de patients ayant une hépatite non-A et non-B (201). Dans des travaux ultérieurs, les PLC/PRF/5 ont été infectées avec des souches cliniques du HEV de génotype 1,3 et 4 (202–204). Par la suite, la propagation des souches cliniques du HEV a été mise au point sur les lignées HepG2/C3A et Huh.7 pour les génotypes 1 à 3 du HEV (7,205). Les lignées PLC/PRF/5 et HepG2/C3A ont permis la propagation des souches de HEV provenant du porc, du lapin et du rat et ont contribué à prouver le caractère anthroozoonotique du HEV (206–208).

La culture des isolats cliniques du HEV de génotype 1 à 4 est possible grâce à l'utilisation d'hépatocytes dérivés de cellules souches humaines (209). Bien que ce modèle se rapproche de la physiopathologie humaine, il est difficile à mettre en œuvre.

Le tropisme tissulaire du HEV ne se limite pas au foie. Cette propriété a été mise à profit pour cultiver le HEV sur différentes lignées dérivées de carcinome humain. Par exemple, les lignées Caco-2 (colon) et A549 (poumon) ont permis la propagation du HEV (7,203). Des explants de placenta et de décida humains ont aussi permis la culture du HEV de génotype 1 et 3 (10).

Enfin, le HEV étant zoonotique, des lignées cellulaires d'origine animale ont été utilisées pour la propagation du HEV. Parmi elles, les cellules primaires dérivées de rein ou d'hépatocytes de macaque cynomolgus permettent la propagation du HEV (210,211).

III.2.2. Modèles de cellules polarisées en culture

Le HEV peut aussi se propager sur des modèles cellulaires polarisés en culture. La transfection du sous-clone C25j des cellules Caco-2 par du HEV de génotype 1 a permis de montrer l'accumulation intracellulaire apicale de la protéine ORF3 (161).

La transfection du HEV a été expérimentée sur les modèles de cellules polarisés HepaRG et sur le sous-clone PLC3 de la lignée PLC/PRF/5 (148,212). Bien qu'utilisant des cellules polarisables en culture, ces études ne se sont pas intéressées au rôle de la polarisation dans la physiopathologie du HEV.

Un sous-clone de HepG2/C3A a été développé au laboratoire appelé HepG2/F2. Ce sous-clone est permissif aux souches cliniques de HEV de génotype 1 et 3 sous forme nue ou quasi-enveloppée et permet l'étude de la sécrétion du HEV (12).

III.2.3. Milieux de culture pour la propagation du HEV

Le développement de la culture du HEV s'est aussi faite grâce à l'amélioration des conditions de culture. L'ajout de 30 mmol/L de MgCl₂ augmente l'infectiosité des particules virales nues de génotype 1 sur les cellules A549 en culture (213). En 2007, l'équipe d'Okamoto s'est servie d'un milieu appauvri en sérum contenant du M199, du DMEM et du MgCl₂ pour propager l'infection. Il y a stimulation de la production d'ARN viral en culture lorsque les cellules infectées sont maintenues à 35,5 °C (203). Les travaux de Yin et al. ont montré que l'entrée des particules virales quasi-enveloppées est plus longue que celle des particules nues et nécessite 6 H d'incubation à 34,5°C. Dans leurs travaux, Yin et al. ont utilisé un milieu d'entretien des cellules composé de DMEM avec 10% de SVF et 2 % de DMSO (8). L'effet du DMSO sur la propagation de l'infection n'a pas été étudié dans ces travaux.

III.2.4. Transfection et infection à partir de souches adaptées en culture

Un des variants de la quasi-espèce de l'isolat clinique de la souche de génotype 3 Kernow possède une insertion de 171 nucléotides de génome humain dans la région hypervariable d'*orf1*. Ce variant est devenu majoritaire après 6 repiquages en culture (7,214). Cette insertion provient du gène codant pour la protéine S17 de la sous-unité 40S des ribosomes et permet d'améliorer la propagation en culture de la souche Kernow (7,214).

Pour surmonter les difficultés liées à la culture du HEV, l'insertion S17 à été introduite dans la région hypervariable de la souche de génotype 1 Sar55 et les ADN des souches Kernow-C1/p6 et Sar55/S17 ont été clonés dans un vecteur d'expression. Ces deux ADN complémentaires permettent la transfection du HEV dans des lignées cellulaires cancéreuses immortalisées.

Les ADN des souches Sar55/S17 (génotype 1) et Kernow-C1/p6 (génotype 3) sont régulièrement utilisés parmi la communauté scientifique (214,215). Bien que la transfection de ces souches permette d'obtenir un niveau d'expression de protéine ORF2 et ORF3 élevé et un titre viral important, l'étendu des effets cellulaires de cette insertion est inconnue et pourrait éloigner les souches Sar55/S17 et Kernow-C1/p6 du comportement des souches cliniques du HEV. La pertinence de ces souches dans l'étude de la physiopathologie de l'infection est remise en question (216).

IV. Quantification de l'infectiosité des particules virales

IV.1. Utilité de la quantification de l'infectiosité du HEV

La mise au point d'une méthode de mesure de l'infectiosité des particules virales de HEV permettrait d'un point de vue expérimental :

- D'obtenir une méthode standardisée et harmonisée pour faciliter la comparaison de l'infectiosité des souches des différents laboratoires
- D'étudier la différence d'infectiosité des particules virales nues et associées aux lipides et de standardiser les expérimentations avec ces deux formes de virus
- De mesurer l'infectiosité des particules virales issues de différents compartiments biologiques
- De tester des inocula désactivés et non-infectieux pour des contrôles expérimentaux

Pour l'étude de l'importance du HEV en santé publique, une méthode de mesure de l'infectiosité des particules virales de HEV contribuerait à:

- Déterminer la quantité minimale de particules virales permettant l'infection humaine et animale
- Evaluer l'infectiosité des particules virales dans la viande de porc, de gibier et d'autres produits alimentaires
- Mesurer la stabilité du HEV dans l'environnement
- Déterminer la résistance du HEV vis-à-vis des méthodes de désactivation des particules virales : Chaleur, UV et traitements chimiques
- Sécuriser le circuit des produits sanguins en mesurant le rendement d'inactivation des procédés actuels de désactivation des particules virales
- Mesurer l'infectiosité des particules virales en présence d'anticorps neutralisants
- Vérifier l'infectiosité de souches candidates pour des mises au point vaccinales
- Sélectionner des composés pharmacologiques interférant avec le cycle viral du HEV

IV.2. Méthodes permettant de quantifier *in vitro* l'infectiosité des suspensions virales

Le point commun entre toutes les méthodes permettant de quantifier *in vitro* l'infectiosité des suspensions virales est la dilution en série de ces suspensions virales jusqu'à une dilution permettant de détecter ou quantifier l'infection. Seule change la méthode pour quantifier la quantité de particules virales infectieuses. Les trois méthodes les plus souvent mises en œuvres sont les unités formant plages (PFU) qui dénombrent les plages de lyses dues à l'infection, les unités formant foci (FFU) qui dénombrent les foyers d'infection en immunofluorescence et les TCID₅₀ qui correspond à l'inverse de la dilution d'un inoculum qui permet d'infecter 50 % des puits de culture.

IV.2.1. Plaques Forming Unit (PFU)

La méthode des unités formant plaques (PFU) est utilisée pour les virus ayant un effet cytopathogène.

Des monocouches de cellules permissives sont infectées avec des dilutions sérielles d'un inoculum. L'infection par une particule virale infectieuse va provoquer la lyse cellulaire. La nappe cellulaire est recouverte d'un revêtement semi-solide comme de l'agarose ou des polymères de cellulose pour limiter la propagation des particules virales à l'environnement immédiat des cellules lysées. L'infection se propage de proche en proche et donne un foyer infectieux, formant ainsi une plaque de lyse.

Le comptage manuel des plaques de lyse cellulaire à une dilution donnée permet de déterminer l'infectiosité de l'inoculum en pfu/mL (217–219). Par exemple, pour une suspension virale à 500 pfu/mL, chaque mL de suspension contient assez de particules virales infectieuses pour former 500 plaques ou colonies en culture. Le contraste entre cellules viables et plaque de lyse peut être augmenté en marquant les cellules vivantes par des méthodes colorimétriques comme la coloration au cristal violet ou la coloration au MTT (Figure 8) (219). Un effet cytopathogène de la souche virale est nécessaire pour mettre en œuvre cette technique. L'effet cytopathogène est variable selon les souches d'un même virus (220,221) et peut disparaître selon les conditions de culture (222) limitant ainsi l'utilisation des PFU.

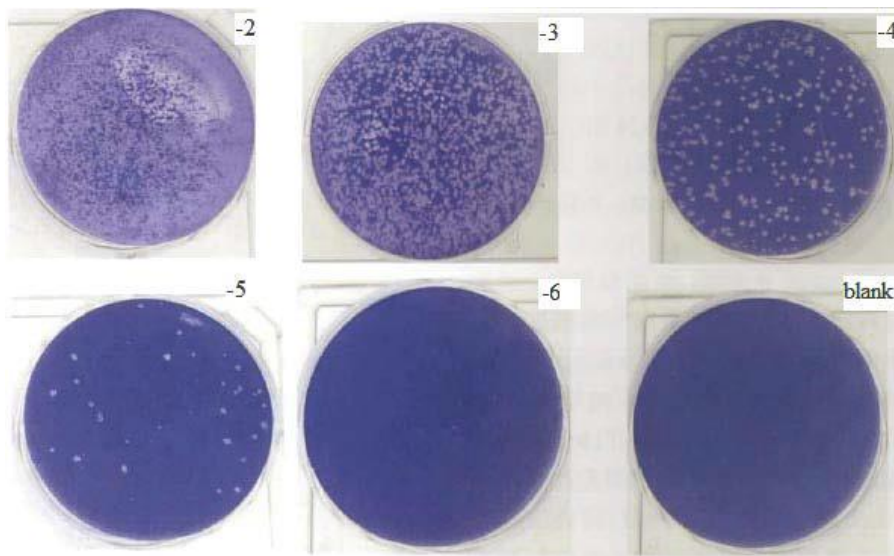


Figure 8 : Formation des plaques de lyse avec différentes dilutions d'une suspension de la souche CTN-81 du virus de la rage sur cellules BHK 21.

Le contraste a été augmenté grâce à un marquage au cristal violet.
D'après Wang et al. Journal of Applied Virology 2013 (223)

La formule des PFU/ml est la suivante :

$$\mathbf{PFU/mL} = \frac{\text{Nombre de plages de lyse}}{\text{Volume de l'inoculum(mL)}} \times \text{Facteur de dilution}$$

Elle permet de calculer la multiplicité d'infection (MOI) qui permet de déterminer le nombre de particules infectieuses par cellule dans une expérimentation :

$$\mathbf{MOI} = \frac{\text{PFU/mL} \times \text{volume de l'inoculum (mL)}}{\text{Nombre de cellulesensemencés}}$$

IV.2.2. Focus Forming Unit (FFU)

La méthode des unités formant foci (FFU) est dérivée de la méthode des PFU. Les cellules sont fixées et marquées par immunofluorescence ou marquage colorimétrique. Au lieu de mesurer l'effet cytopathogène du virus, le nombre de foci d'infection est compté et permet de calculer un titre en FFU/mL. Cette méthode est rapide et simple à mettre en œuvre.

Les méthodes des PFU et FFU nécessitent une inspection oculaire et une estimation de la positivité des cellules sur la base des plages de lyse ou de l'immunofluorescence (Figure 9).

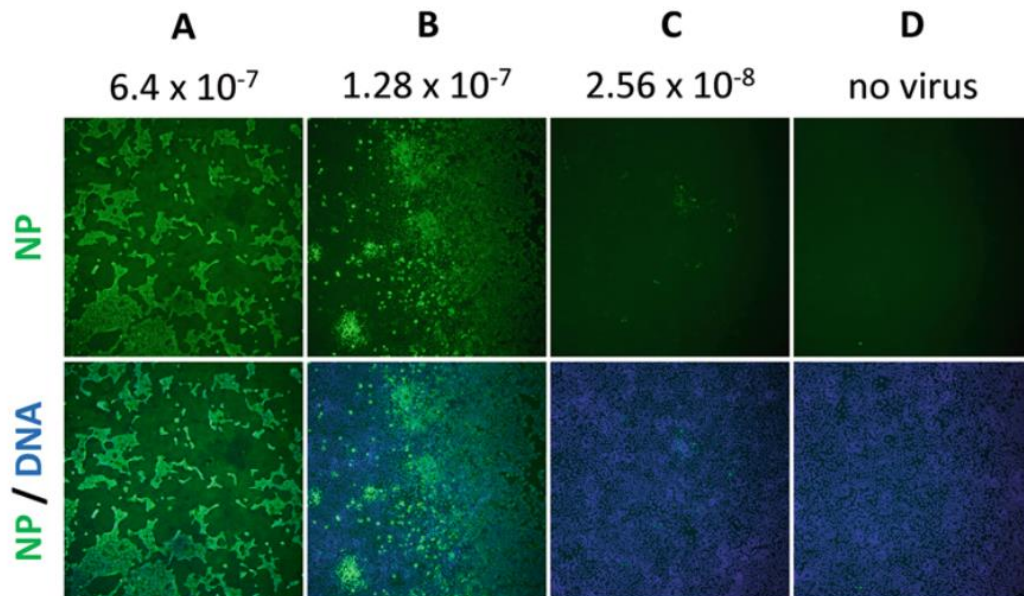


Figure 9 : Phénotype de l'infection des cellules MDCK par des dilutions sérielles d'une souche du virus Influenza A observée en microscopie de fluorescence.

D'après Karakus et al. Methods in molecular biology 2018 (224)

La nucléocapside (NP) est marquée en vert et le noyau (DNA) est marqué en bleu. **A.** Effet cytopathogène avec un décollement des cellules. **B.** Un effet cytopathogène est observable à droite de l'image alors que des foci d'infection sont observables à gauche. **C.** Infection avec des foci observable et pas d'effets cytopathogènes. **D.** Cellules non-infectées. Il n'y a pas de foci observable, cependant les anticorps peuvent s'agréger et former des amas brillants.

IV.2.3. Dilution limite et Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)

La TCID50 est définie comme l'inverse de la dilution d'une suspension virale permettant d'infecter 50% des puits de culture. En ce qui concerne les méthodes *in vitro*, des cellules sont infectées en plusieurs réplicats avec des dilutions sérielles d'une suspension virale jusqu'à obtenir une dilution permettant d'infecter 50% ou moins des puits de culture.

Cinq méthodes principales existent pour déterminer si un puits est infecté :

- La détection d'un effet d'hémagglutination
- La détection d'un effet cytopathogène
- La détection de foci en immunofluorescence
- La détection d'un antigène viral
- La quantification du matériel génétique viral

Deux formules existent pour calculer l'infectiosité d'une suspension virale : la formule de Reed et Muench et la formule de Spearman-Kärber (225,226).

La formule décrite par Reed et Muench permet de mesurer l'effet protecteur d'un sérum neutralisant. Elle a été définie comme étant l'inverse de la dilution d'un sérum neutralisant permettant de protéger la moitié des animaux face à une injection létale d'une dose constante d'un pathogène dans une expérimentation (226). Elle peut aussi s'appliquer pour mesurer la l'infectiosité d'une suspension d'un pathogène (226).

La formule originale et simplifiée de Reed et Muench est la suivante :

$$TCID50 = R^n \times R^{\left(\frac{50 - \%D}{\%D - \%d}\right)}$$

Avec :

$$R^n = \frac{1}{D}$$

R = La raison, c'est-à-dire l'inverse du facteur de dilution successif appliqué dans l'expérience. Pour une dilution en série de chaque inoculum au 1/10ème : **R** = 10.

D = Plus petite dilution d'un facteur **R** pour laquelle au moins 50% des animaux ont survécu.

n = Le nombre de dilution pour arriver jusqu'à D

d = dilution directement supérieure à D pour laquelle moins de 50 % des animaux ont survécu.

$$d = \frac{1}{R^{n+1}}$$

Exemple : Si pour arriver jusqu'à **D**, il a fallu diluer l'échantillon **4** fois d'un facteur **2**, alors **D** = $1/2^4 = 0,0625$ et **d** = $1/2^5 = 0,03125$.

% D = Pourcentage de mortalité à la dilution D

% d = Pourcentage de mortalité à la dilution d

Par exemple, dans les travaux originaux de Reed et Muench, à une TCID50/mL de 27 il faudrait diluer le sérum neutralisant au 1/27 pour sauver 50 % des animaux dans une expérimentation. Par analogie à une souche d'un pathogène en suspension, pour une TCID50/mL de 27, il faudrait diluer cette suspension au 1/27 pour infecter 50% des animaux dans une expérimentation (226).

La formule de Spearman-Karber est la suivante (227):

$$TCID50 = R \left(\log_{10} \frac{1}{D_{max}} - \frac{\log_{10}(R)}{2} + R \sum \frac{R_i}{N_i} \right)$$

Avec :

D_{max} = Plus petite dilution d'un facteur **R** pour laquelle tous les animaux sont infectés.

R_i = Nombre d'animaux infectés à la dilution D_{max} plus nombre d'animaux infectés aux dilutions expérimentales suivantes.

N_i = Nombre d'animaux utilisés par dilution de la suspension virale.

La formule de Spearman-Karber requiert une dilution de la suspension virale où tous les animaux sont infectés, par conséquent cette formule peut nécessiter un grand volume d'inoculum et elle n'est pas utilisable avec des suspensions virales ayant un titre trop faible pour infecter 100 % des animaux.

Plusieurs déclinaisons de ces formules sont apparues avec l'évolution des méthodes de culture cellulaire et virale. Toutes ces méthodes sont basées sur la dilution d'une suspension virale permettant d'obtenir 50% de l'effet à mesurer. Ainsi on peut déterminer la LD50 : la dose permettant de tuer 50% d'un modèle animal ; EID50 : la dose permettant d'infecter 50 % des embryons de poulet ou la TCID50 : la dose permettant d'infecter 50% des puits d'un réplicat de culture cellulaire. Par exemple, pour une suspension virale à 2500 TCID50/mL, alors il faut diluer cette suspension au 1/2500^{ème} pour infecter 50% des puits d'une culture cellulaire avec 1 mL de cette dilution.

Des études ont montré que la méthode des TCID50 est plus sensible que la méthode des PFU pour le virus Ebola et le virus de Tulane (228,229). Des travaux sur les herpesvirus humain de type 6 ont montré pour ce virus que la variabilité des méthodes de TCID50/mL basées sur la détection du matériel génétique par qPCR est plus faible comparée à la TCID50/mL mesurée par la présence des foyers infectieux en immunofluorescence indirect et aux techniques des FFU (230).

IV.3. Sélection de la méthode pour le HEV

Les modèles animaux permettent de mesurer l'infectiosité du virus chez son hôte naturel, cependant il n'existe pas de modèle de petits animaux simples à mettre en œuvre en animalerie pour le HEV. Cette approche nécessite du temps, des infrastructures adaptées, et pose des difficultés de reproductibilité des expérimentations ainsi que des problèmes éthiques (197–199).

La mesure de l'infectiosité à partir de systèmes de culture cellulaire est une méthode permettant de s'affranchir partiellement des difficultés des modèles animaux.

Les systèmes actuels nécessitent soit des souches de laboratoire soit de travailler avec des inocula avec un titre élevé en ARN viral. La culture virale à partir d'isolat clinique est longue et produit peu de particules virales infectieuses.

Le HEV n'ayant pas d'effet cytopathogène décrit, la méthode des plaques forming unit n'est pas adaptée. Les méthodes utilisées pour calculer des titres de FFU du HEV en laboratoire ont été faites avec des anticorps indisponibles dans le commerce et posent des problèmes de reproductibilité interlaboratoire (205,231). Les anticorps commerciaux dirigés contre les protéines du HEV sont peu nombreux et leurs performances variables, limitant ainsi la mise en œuvre de la technique des FFU.

Les systèmes de culture du HEV produisent dans le surnageant de culture un mélange de particules virales infectieuses et de protéines de capsid ORF2 soluble et potentiellement d'autres particules liées à l'infection comme des particules défectives et de l'ARN libre (148,232). Par conséquent, la production d'ARN viral et de protéine de capsid ORF2 dans du surnageant de culture de cellules infectées ne reflète pas l'infectiosité de l'inoculum utilisé pour infecter cette culture. Les méthodes restantes pour mesurer l'infectiosité des particules virales sont celles basées sur des dilutions limites de l'inoculum couplé à la RT-qPCR ou à la détection d'un antigène viral en ELISA. Dans ces travaux, nous avons concentré nos efforts sur l'amélioration de la technique déjà existante au laboratoire et qui repose sur la RT-qPCR.

Les principes qui nous ont conduits à choisir la méthode des TCID₅₀/mL pour la détermination de l'infectiosité des suspensions virales du HEV sont résumés dans la Figure 10.

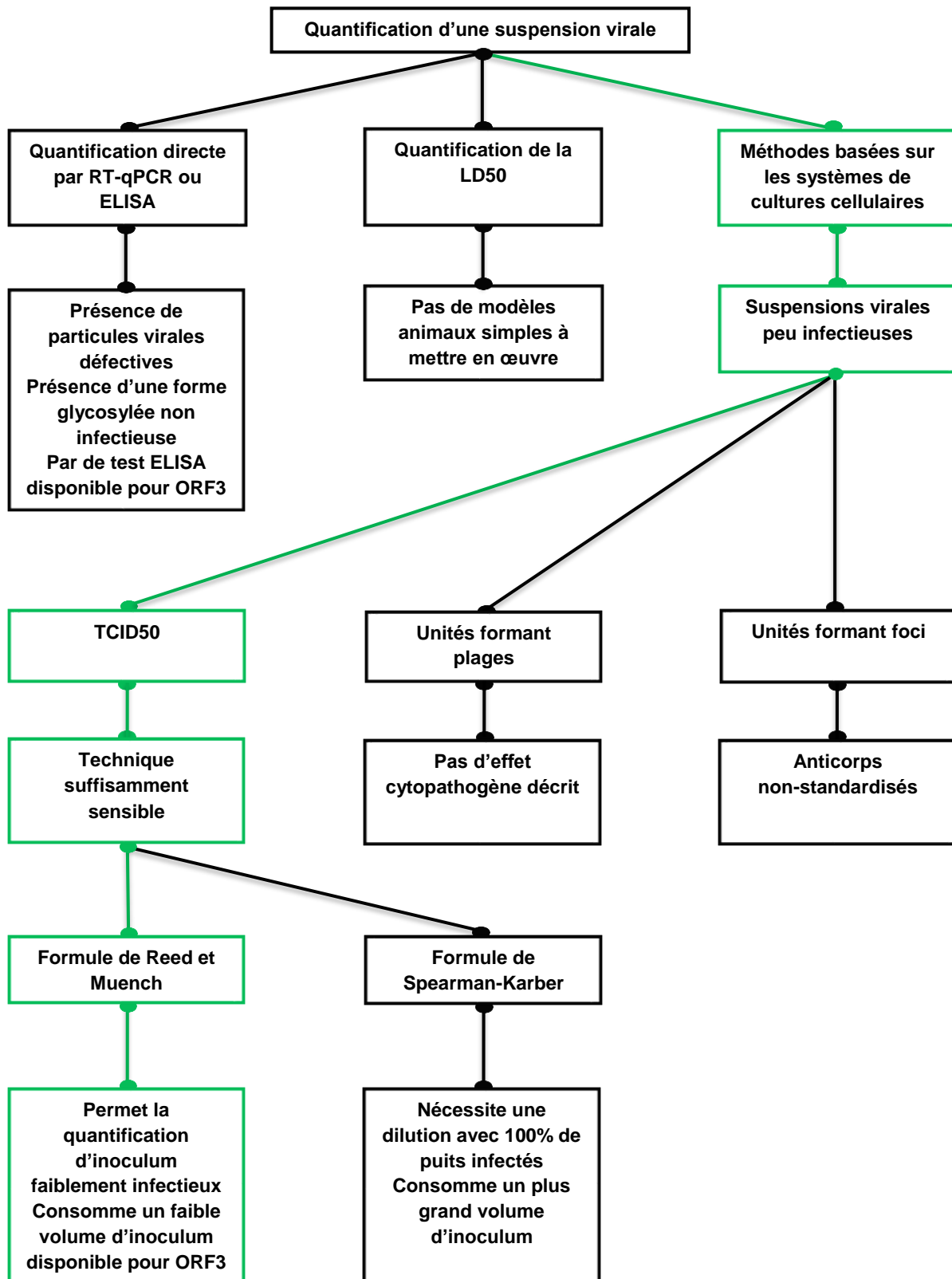


Figure 10 : Arbre décisionnel pour la sélection de la méthode de titrage du HEV.

Le trait vert représente la méthode choisie.

Partie II Etude Expérimentale

I. Objectifs

L'objectif de ce travail a été de développer une méthode de culture permettant une propagation efficace de l'hépatite E et d'appliquer cette méthode pour améliorer la technique de TCID50 dont nous disposons au Centre National de Référence du virus de l'hépatite E.

Dans une première partie, nous montrerons l'effet du DMSO dans l'amélioration de la propagation du HEV en culture. Ensuite, nous ferons une analyse rétrospective des résultats de TCID50 du Centre National de Référence du virus de l'hépatite E de 2014 à 2019.

Dans une dernière partie, nous illustrons l'apport de ce travail en mesurant de l'infectiosité des souches du virus de l'hépatite E issues des selles ou des surnageants de culture.

II. Matériel et méthodes

II.1. Recueil des données

Nous avons mené une étude rétrospective des résultats d'infectiosité des souches étudiées au Centre National de Référence de l'Hépatite E à l'Institut Fédératif de Biologie de Toulouse de 2014 jusqu'à 2019. Tous les résultats ont été calculés avec la formule de Reed et Muench.

II.2. Lignées cellulaires et souches virales.

Les lignées cellulaires PLC/PRF/5 (ATCC; CRL-8024), HepG2/C3A (ATCC; CRL-10741) ou son sous-clone HepG2/F2 (12) ont été cultivées dans le milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 37,5°C et 5 % de CO₂. Deux fois par semaine, les cellules ont été décollées par traitement à la trypsine et repiquées à la densité de 2,5.10⁶ cellules dans des flasques de 25 cm².

Les souches de HEV nues proviennent des selles des patients à la phase aiguë de l'infection. Deux souches de génotype 3 (Vil et Bou), une souche de génotype 3chi (Bal) et une souche de génotype 1 (Vic) ont été utilisées (**Tableau 1**). Les selles ont été collectées, suspendues dans 5 mL de DMEM, congelées à -20°C pendant 24h puis décongelées et centrifugées à 1200 g pendant 10 min. Les surnageants ont été filtrés grâce à un filtre de 0,22 µm et l'ARN HEV dans les filtrats a été quantifié par RT-qPCR. Les aliquots ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Nom de la souche	Génotype	Numéro d'accension GenBank	Autre dénomination	Référence
Vil	3f	KC166967	TLS-09/M0	Lhomme et al. 2014 (143)
Bou	3f	MN401237		
Bal	3chi	Non référencée		
Vic	1	MN401238		

Tableau 1 : Souches du virus de l'hépatite E utilisées dans les expérimentations.

Les surnageants de culture des lignées cellulaires ont été utilisés pour produire les particules virales quasi-enveloppées du HEV. Du jour 5 au jour 40 post-infection, les surnageants de culture ont été récoltés, centrifugés à 300 g, et ajouté à la même flasque congelée à -80°C. Les pools de surnageants ont été concentrés sur une unité de filtration par centrifugation Amicon (100 kD cut-off, Millipore, Molsheim, France). La densité des souches produites à été vérifiée par ultracentrifugation sur gradient d'iodixanol. Les souches ainsi produites ont été appelées VHP1 lorsqu'elles ont été produites à partir de cellules HepG2/C3A (**Virus de HepG2/C3A au Passage 1**) ou VPP1 lorsqu'elles ont été produites à partir de PLC/PRF/5 (**Virus de PLC/PRF/5 au Passage 1**)

Nous avons restreint notre analyse aux souches cliniques et éliminé la souche Kernow-C1/P6 ; en effet il s'agit d'une souche avec une insertion dans *orf1* sélectionnée en culture et qui s'éloigne du modèle physiologique (7,214).

II.3. Composition des différents milieux de culture

Trois milieux de culture ont été utilisés dans l'étude et sont nommés milieu MCCI, DSD et WED. La formule détaillée des milieux de culture et d'infection est décrite dans le **tableau 2** ci-dessous :

Composition	Milieu de Culture			Milieu d'infection		
	MCCI	DSD	WED	MCCI	DSD	WED
SVF	10 %	10 %	10 %	2 %	10 %	2 %
DMEM Glucose 1g/L	90 %			47 %		
DMEM Glucose 4,5 g/L		90 %			87 %	
Milieu de Williams			89 %			96 %
M199				47 %		
DMSO			1 %		2 %	1 %
MgCl ₂ 1 mol/L				3.10 ⁻² mol/L		
Penicillin G (10 U/L)				0,1 U/L	0,1 U/L	0,1 U/L
Streptomycin (10 U/L)				0,1 U/L	0,1 U/L	0,1 U/L
Amphotericin B (27,05 µmol/L)				0,2705 mol/L	0,2705 mol/L	0,2705 mol/L

Tableau 2 : Milieux utilisés pour la culture des cellules, l'infection et le maintien de la culture virale.

II.4. Ensemencement des lignées cellulaires

Les cellules ont étéensemencées à la densité de 100 000 cellules/puits en sixplicates dans une plaque 96 puits revêtue de collagène. Les cellules ont été cultivées 24 H, à 37°C et 5% de CO₂, afin qu'elles adhèrent au fond de la plaque en milieu MCCI, DSD ou WED.

Les inocula ont été préparés en diluant la suspension d'inoculum mère avec des dilutions sérielles de raison 10 en PBS, en milieu MCCI, DSD ou WED.

II.5. Infection des cellules

Les cellules ont été rincées avec 250 µL de PBS chaud puis infectées avec 100 µL de chaque dilution d'inoculum pendant 1h à température ambiante ou 6h à 35,5°C. L'inoculum a été retiré, remplacé par 290 µl de milieu d'infection puis incubé à 37°C, 5% CO₂.

À 24 H post-infection, les cellules ont été rincées 5 fois avec 200 µL de PBS chaud, délicatement pour ne pas décoller la nappe cellulaire. Le PBS a été retiré et remplacé par 290 µl de milieu d'infection puis incubé à 37°C, 5% CO₂. Tous les deux jours, 150 µL du surnageant de culture a été remplacé par du milieu d'infection neuf.

II.6. Lyse des cellules

À la fin de l'expérience, 150 µL de milieu de culture ont été enlevés de chaque puits, les cellules ont été lysées par congélation à -80°C. Les plaques ont été décongelées à température ambiante puis 140 µL du lysat ont été prélevés dans des eppendorf de 2 mL puis stockés à -80 °C jusqu'à extraction des ARN totaux.

II.7. Quantification de l'ARN HEV.

L'ARN total a été isolé et purifié en utilisant un kit d'extraction Qlamp viral RNA kit (Qiagen Courtaboeuf, France) puis stocké à -80°C. Les ARN HEV extraits ont été décongelés à température ambiante puis quantifiés par une RT-qPCR en temps réel développée au laboratoire (233). Les amorces et la sonde ciblent le gène ORF3 (**Tableau 3**). La quantification est réalisée grâce à une gamme préparée à partir d'un ARN transcrit préparé au laboratoire.

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>
Amorce sens	5' –GGTGGTTTCTGGGGTGAC – 3'
Amorce anti sens	5' –AGGGGTTGGTTGGATGAA – 3'
Sonde	5' -6 carboxyfluorescein (FAM) –TGATTCTCAGCCCTTCGC – 6 – carboxy – tetramethylrhodamine (TAMRA) – 3'

Tableau 3 : Séquences des amorces et sonde utilisées.

Dans chaque puits sont déposés 30 µL de mélange réactionnel et 20 µL d'échantillon d'ARN extrait à analyser. La composition du mélange réactionnel est détaillée dans le **tableau 4**. La RT-qPCR utilise la SuperScriptIII Platinum® (Invitrogen) qui assure successivement la rétrotranscription de l'ARN en ADN et l'amplification de l'ADN (233).

<i>Réactifs</i>	<i>Concentration initiale</i>	<i>Quantité pour 1 tube</i>
2X Réaction Mix	2X	25
Amorce Anti Sens	10 µM	2.5
Amorce sens	10 µM	1
Sonde	25 µM	0.3
Inhibiteur de RNase	40 U/µL	1
SuperScriptIII Platinum	40 U/µL	1

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la RT-qPCR pour la quantification de l'ARN HEV.

La RT-qPCR a été réalisée avec le thermocycleur Light Cycler 480 de Roche Diagnostics selon le protocole décrit dans le **tableau 5**.

	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>
Transcription Inverse	1	50°C	15 min
Dénaturation	1	95°C	10 min
Amplification	50	95°C	20 sec
		58°C	40 sec

Tableau 5 : Protocole de la RT-qPCR pour la quantification de l'ARN HEV.

La limite de détection de la méthode est de 50 copies d'ARN HEV /mL, cette limite est utilisée pour déterminer si les cellules sont infectées ou non-infectées pour le calcul des TCID50.

II.8. Calcul de la TCID50.

Les TCID50 ont été calculées par la méthode de Reed et Muench tel que présentée au paragraphe IV.3 mais rapportée au volume de suspension virale en prenant en compte le volume de l'inoculum (V_i) en μL selon la formule suivante :

$$TCID50/mL = TCID50 \times \frac{1000}{V_i}$$

Pour la suspension virale mère et chaque dilution sérielle, 140 μL de suspension virale ont été conservés pour quantifier l'ARN viral en RT-qPCR. Cela a permis de vérifier la justesse des dilutions en série et de calculer la TCID50/million de copie d'ARN HEV (en divisant la TCID50/mL par la concentration d'ARN HEV/mL).

II.9. Marquage des cellules par immunofluorescence indirecte.

Pour la détermination du nombre de cellules infectées, 400 000 cellules HepG2/C3A ou HepG2/F2 ont étéensemencées sur plaque 24 puits. Après 24 H, les cellules ont été infectées avec 0,5 mL d'une souche clinique de HEV quasi-enveloppée de génotype 3 issue du surnageant de culture de cellules PCL/PRF/5 après un premier passage. La souche virale a été titrée et diluée à 2500 TCID50/mL. Après 21 à 30 jours d'infection, les cellules ont été décollées etensemencées sur une lame équipée de chambres de culture amovibles (Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide System) à la densité de 50 000 cellules par puits. Après 24 H d'incubation, les cellules ont été rincées deux fois au PBS chaud puis fixées avec 100 μL de cytofix/cytoperm (BD Biosciences) contenant 3,75 % de paraformaldéhyde pendant 20 min à 4°C. Les cellules ont été perméabilisées avec deux rinçages de 250 μL de BD Perm/Wash pendant 5 min; l'agent perméabilisant de cette solution est la saponine.

Les cellules ont été saturées 30 min grâce à du PBS contenant 5% de sérum de chèvre. Les cellules ont ensuite été marquées 1 H à température ambiante avec un mélange d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine virale ORF2 (Clone 1E6 et 4B2, EMD Millipore) au 1/100 chacun puis ont été rincées 5 fois au PBS.

Les complexes immuns ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre couplé à un fluorochrome (Alexa 555 anti-IgG de souris, Life Technologies: A21422). L'anticorps secondaire a été incubé 1 H à 4°C puis les cellules ont été rincées 5 fois au PBS. Les noyaux ont été marqués au DAPI (NucBlue®, Life Technologies R37606) puis rincées 3 fois au PBS. Les chambres d'incubation ont été retirées et une lamelle montée sur la lame dans du milieu de montage (Fluoromont G SouthernBiotech 0100-01) enfin la lamelle a été scellée au vernis sur la lame.

Les cellules sont observées avec un microscope confocal Leica SP8 à l'objectif 63x (ouvertures numériques de 1,4) à immersion à l'huile. Le marquage anti-ORF2 a été réalisé sur cellules non-infectées pour vérifier la fixation spécifique du mélange d'anticorps anti-ORF2, sans anticorps primaire pour vérifier la fixation spécifique de l'anticorps secondaire et sur cellules infectées sans anticorps pour vérifier l'absence d'autofluorescence des cellules.

Dix champs distincts ont été acquis et le pourcentage de cellules infectées en immunofluorescence déterminé en comptant le nombre de noyaux et de cellules exprimant ORF2 grâce au logiciel ImageJ (234).

II.10. Analyses statistiques.

Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism 7 (version 7.03; GraphPad Software, La Jolla, CA). Les valeurs des TCID₅₀/million de copies d'ARN HEV ont été comparées grâce à un test non-paramétrique de Mann-Whitney. Les pourcentages de cellules infectées ont été comparés grâce à un test du chi-deux d'homogénéité. Une p value inférieure ou égale à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les p-values sont symbolisées selon le code suivant : *, p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

III. Résultats

III.1. Amélioration de la propagation des souches cliniques du HEV en culture

III.1.1. Effet du DMSO sur la propagation du HEV en culture

Le DMSO est un solvant aprotique non-polaire servant de véhicule à des molécules hydrophobes. L'ajout du DMSO dans le surnageant de culture des HepG2 ou HeparRG permet de se rapprocher d'un phénotype plus physiologique (235,236). Pour les virus des hépatites B et C, l'ajout de DMSO dans le milieu de culture augmente la production d'ARN viral (237,238). Le DMSO est donc un composé qui pourrait stimuler la propagation du HEV en culture.

Pour évaluer l'effet du DMSO sur le cycle viral, nous avons quantifié la concentration d'ARN du HEV par RT-qPCR dans le surnageant de culture et le lysat cellulaire avec différentes conditions de culture (Figure 11).

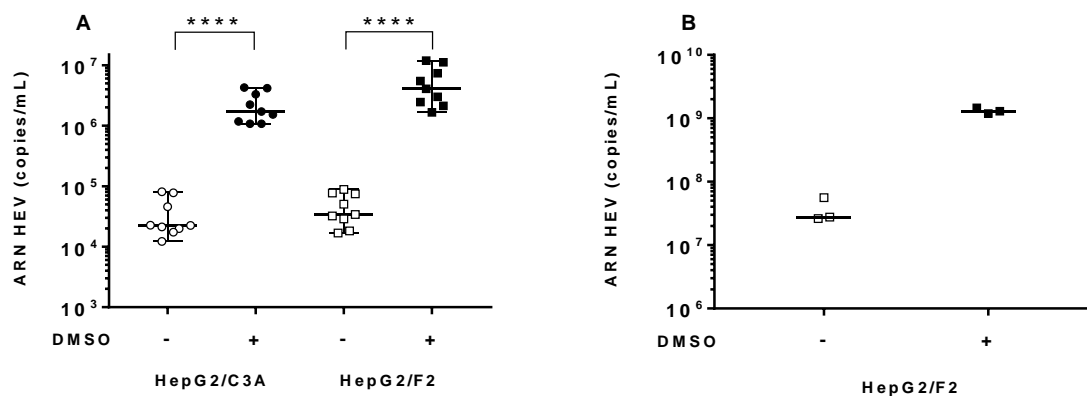


Figure 11 : Influence du DMSO sur la production extracellulaire et intracellulaire d'ARN viral du HEV.

(A) Les HepG2/C3A (cercle) ou les HepG2/F2 (carré) ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à la densité de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits et infectées pendant 1 H avec la même suspension d'une souche de VPP1 de génotype 3 (Souche Vil). Cette suspension virale à été dilué en milieu MCCI (symbole vide) ou en milieu WED (symbole plein). Les cellules ont été maintenues dans le même milieu. A J15 post-infection, l'ARN HEV à été quantifié par RT-qPCR dans le surnageant de culture. $n=9$ dans toutes les conditions. La barre horizontale représente la médiane et les extrêmes. **** $p < 0,0001$ (B) Dans les mêmes conditions de culture et d'infection qu'en (A), les HepG2/F2 ont été rincées et lysées à J36 post-infection par congélation/décongélation de la plaque et l'ARN HEV à été quantifié dans le lysat cellulaire. La barre horizontale représente la médiane, $n=3$ dans toutes les conditions.

Sans DMSO, la concentration médiane d'ARN du HEV en copies/mL dans le surnageant de culture est de $2,25 \cdot 10^4$ [min : $1,22 \cdot 10^4$; max : $8,11 \cdot 10^5$] pour la lignée HepG2/C3A et de $3,4 \cdot 10^4$ [min : $1,69 \cdot 10^4$; max : $8,86 \cdot 10^4$] pour la lignée HepG2/F2. Le DMSO augmente la concentration extracellulaire d'ARN HEV indépendamment de la lignée cellulaire utilisée. En effet, avec du DMSO dans le milieu de culture, la concentration médiane d'ARN du HEV en copies/mL dans le surnageant de culture est de $1,72 \cdot 10^6$ [min : $1,08 \cdot 10^6$; max : $4,29 \cdot 10^6$] pour la lignée HepG2/C3A et de $4,29 \cdot 10^6$ [min : $1,66 \cdot 10^6$; max : $1,19 \cdot 10^7$] pour la lignée HepG2/F2 ($p < 0,0001$ pour HepG2/C3A et pour HepG2/F2).

L'augmentation de la concentration d'ARN HEV extracellulaire pourrait être la conséquence soit d'une augmentation de sa sécrétion, soit liée à une augmentation de la production d'ARN intracellulaire. Nous avons quantifié l'ARN du HEV dans le lysat des cellules HepG2/F2 infectées à J36 post-infection. Sans DMSO, la concentration médiane d'ARN du HEV en copies/mL dans le lysat cellulaire est de $2,76 \cdot 10^7$ [min: $2,63 \cdot 10^7$; max: $5,61 \cdot 10^7$] pour la lignée HepG2/F2 et avec du DMSO, cette concentration est de $1,29 \cdot 10^9$ [min: $1,19 \cdot 10^9$; max: $1,46 \cdot 10^9$].

Nous en concluons que le DMSO stimule la production de l'ARN du HEV intra- et extracellulaire. Cette propriété du DMSO peut être exploitée pour améliorer la propagation du HEV en culture. Pour déterminer si cette augmentation de production d'ARN HEV est due à une augmentation du nombre de cellules permissives ou à une stimulation de la synthèse de l'ARN viral et de sa sécrétion en culture, nous nous sommes intéressés à l'effet du DMSO sur le pourcentage de cellules infectées en marquant en immunofluorescence la protéine de capside (Figure 12).

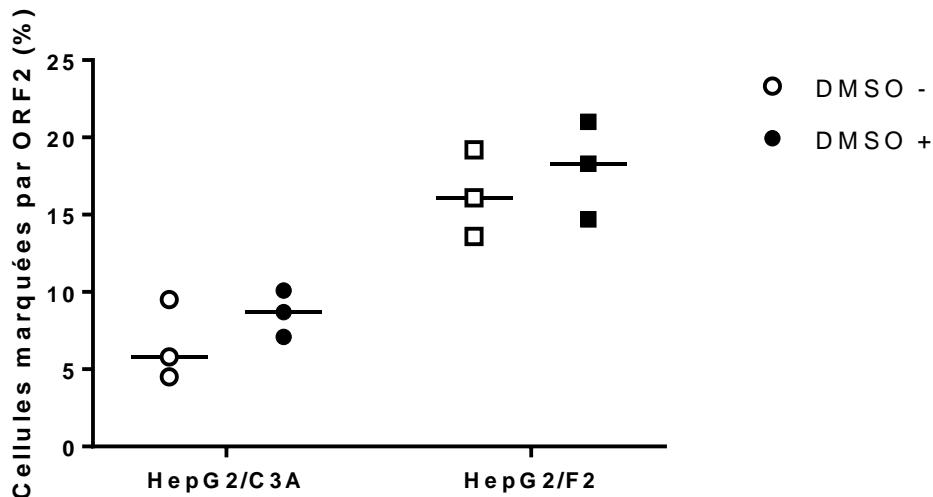


Figure 12 : Pourcentage de cellules exprimant le marquage ORF2

Les cellules HepG2/C3A (cercle) et HepG2/F2 (carré) ont été ensemencées à la densité de 4.10^5 cellules/puits dans des plaques 24 puits. Elles ont été infectées avec la même suspension d'une souche de eHEV (souche Vil) diluée en milieu MCCI (symbole vide) ou en milieu WED (symbole plein). Les cellules ont été maintenues dans le même milieu. Entre J21 et J30 post-infection, les cellules ont été décollées par incubation à la trypsine et ensemencées dans des chambres de culture amovible à la densité de 5.10^4 cellules par puits et marquée par immunofluorescence indirecte 24h après l'ensemencement. Les noyaux ont été marqués au DAPI et les résultats expriment le pourcentage des cellules marquées par ORF2 sur le nombre total de noyau dans 10 champs distincts de trois expériences indépendantes. La barre horizontale représente la médiane.

Pour la lignée HepG2/C3A, le pourcentage médian de cellules exprimant le marquage ORF2 est respectivement de 5,8 % [min : 4,51% ; max : 9,5%] avec un milieu sans DMSO et de 8,7 % [min : 7,1% ; max : 10 ; 1%] en présence de DMSO.

Pour la lignée HepG2/F2, le pourcentage médian de cellules exprimant le marquage ORF2 est respectivement de 16,1 % [min : 13,6% ; max : 19,2%] avec un milieu sans DMSO et de 18,3 % [min : 14,7% ; max : 21%] en présence de DMSO.

Notre technique de marquage en immunofluorescence est peu sensible et ne permet de détecter des cellules infectées sans équivoque qu'à partir de 21 jours post-infection. Sur la base du marquage ORF2, on obtient plus de cellules infectées avec la lignée HepG2/F2 qu'avec la lignée HepG2/C3A mais indépendamment de la présence de DMSO dans le milieu.

III.1.2. Utilisation du DMSO dans le milieu de culture pour la propagation de souches cliniques du HEV.

Puisque nous disposons d'une méthode de culture plus efficace pour la propagation du HEV, nous avons mis à profit cette méthode pour cultiver d'autres isolats cliniques du HEV (Figure 13).

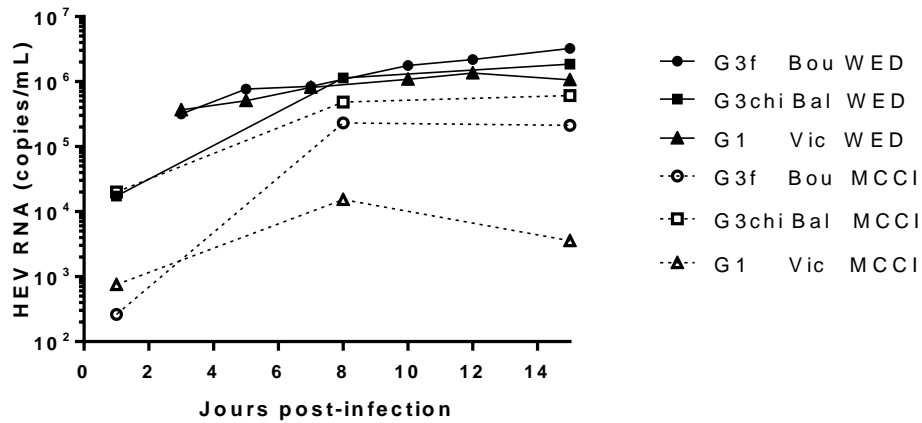


Figure 13 : Production d'ARN HEV dans le surnageant de culture de cellules HepG2/C3A infectée avec une souche de génotype 3f,3chi ou 1 en milieu WED ou MCCI.

Les cellules HepG2/C3A ont étéensemencées en plaque 6 puits, après 24h, elles ont été infectées avec des selles clarifiées et filtrées de patients infectés avec le HEV de génotype 3f (Bou), 3chi (Bal) ou de génotype 1 (Vic) en milieu MCCI (trait plein) ou en milieu WED (trait pointillé). L'ARN HEV dans le surnageant de culture à été quantifié par RT-qPCR jusqu'à 15 jours post-infection.

Dans les conditions WED, les cellules infectées libèrent plus d'ARN viral dans le surnageant de culture pour les souches de HEV de génotype 3f, 3chi et 1 dans la condition WED par rapport à la condition MCCI. La concentration d'ARN HEV quantifiée dans le surnageant de culture augmente du 2^{ème} au 14^{ème} jour post-infection et atteint un plateau entre 10⁵ et 10⁶ copies/mL pour ces génotypes en milieu WED (Figure 13). Le milieu WED contenant du DMSO à permis de propager l'infection par le HEV plus efficacement et de produire des surnageants de culture contenant des particules virales. Ces surnageants de culture nous permettront d'étudier l'infectiosité des particules virales en culture.

III.2. Mise au point de la méthode des TCID50

Afin d'améliorer notre méthode de quantification de l'infectiosité du HEV, nous avons évalué différentes conditions de culture (durée de culture, milieu de culture et type cellulaire). Nous avons ainsi établi des conditions optimisées de réalisation de la technique de TCID50.

III.2.1. Comparaison de la lyse cellulaire à des temps précoces et tardifs

À l'issue de la culture des différentes dilutions des échantillons testés, la nappe cellulaire subit un cycle de congélation-décongélation. L'ARN viral est ensuite extrait et quantifié par RT-qPCR. La culture du HEV étant longue, nous avons vérifié que la durée de culture n'influence pas la valeur de la TCID50 (Figure 14).

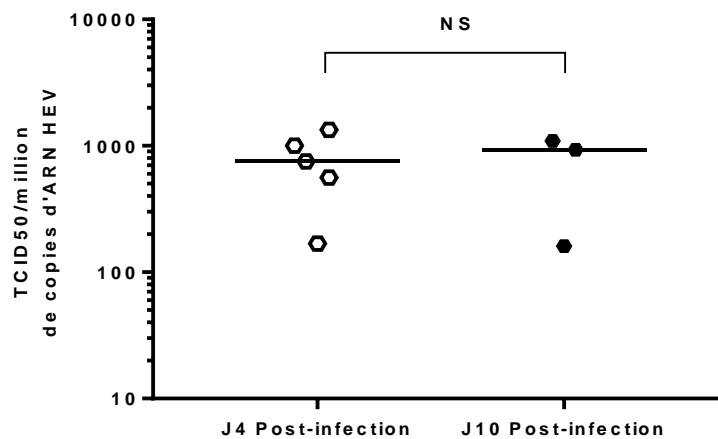


Figure 14 : Influence de la durée de culture sur l'infectiosité du nHEV.

Des dilutions successives au 1/10^{ème} dans du milieu MCCI d'une suspension virale de virus nu (souche Vil) ont été utilisées pour infecter des cellules HepG2/C3A à température ambiante pendant 1H et les cultures ont été maintenues dans le même milieu à 35,5°C. Les cellules ont été lysées à J4 (○) ou à J10 (●) après le dépôt des inocula et la TCID50/million de copies d'ARN HEV à été calculée. La barre horizontale représente la médiane.

À J4 post-infection, la médiane de la TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 750 [Min: 168; Max: 1334]. La médiane de la TCID50/million de copies d'ARN HEV de la souche nue à J10 post-infection est de 931 [Min: 160,8 ; Max:1093]. Il n'y a pas de différence entre les proportions de particules virales infectieuses mesurées à J4 et J10. Nous avons préalablement montré qu'après quatre jours d'infection toute trace de l'inoculum de départ a été éliminé par les multiples rinçages (9). Toutefois, le changement régulier de milieu ne nécessite pas beaucoup de besoin logistique et le risque de contamination est faible, par conséquent dans la suite des expérimentations, nous conservons la lyse à J10 post-infection pour augmenter la robustesse du test.

III.2.2. Effets des paramètres d'infection et de culture sur la TCID50

Nous avons voulu déterminer l'influence des trois principales conditions utilisées au laboratoire pour la propagation de l'infection du HEV sur le résultat de la TCID50 : la condition développée par Takahashi et al. avec 1 H d'incubation à température ambiante dans le milieu MCCI (9,181) et les conditions de culture les plus récentes au laboratoire : 6 H d'incubation à 35°C dans le milieu DSD ou WED (8,12) (Figure 15).

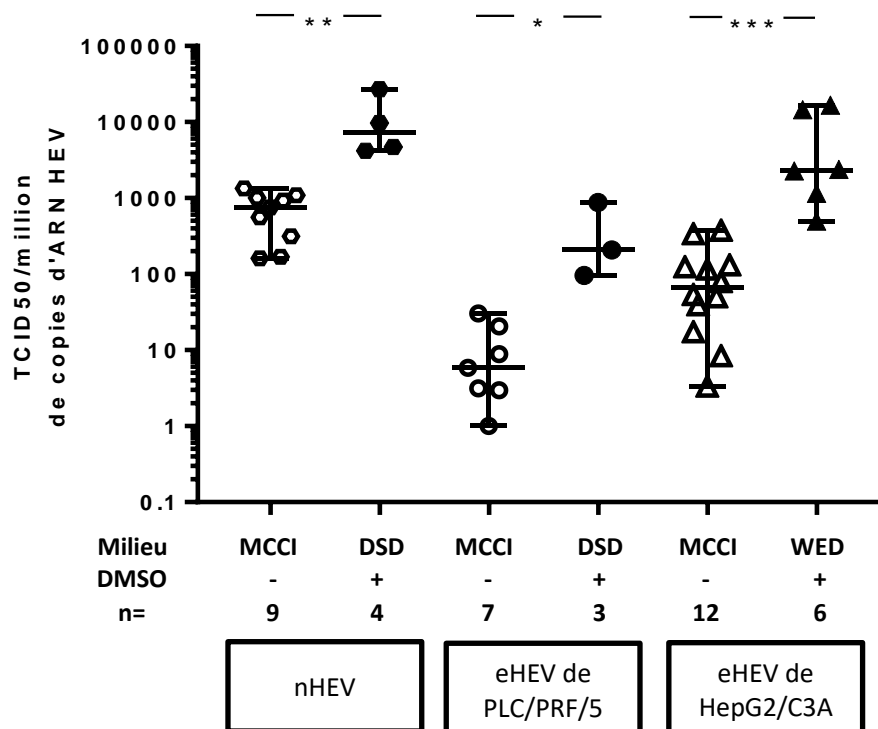


Figure 15 : Influence des conditions d'infection et de culture virale sur l'inféctiosité des particules virales issues des selles et du surnageant de culture.

Des dilutions successives au 1/10^{ème} des suspensions virales ont été utilisées pour inoculer les cellules HepG2/C3A soit pendant une heure à température ambiante dans du milieu MCCI (symbole vide) ou pendant 6h à 35,5°C dans du milieu DSD ou WED (symbole plein). À J10 post-infection la TCID50/million de copies d'ARN HEV a été calculée pour le HEV nu de génotype 3f (○ et ● : Souche Vil) ou à partir la souche de virus quasi-enveloppé VPP1 (○ et ●) ou VHP1 (△ et ▲). Les cellules sont maintenues dans le même milieu à 35,5°C. Le milieu de culture, la présence de DMSO et la population sont indiqués sous l'axe des abscisses. La barre horizontale représente la médiane. *, p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001.

Les résultats montrent que les conditions de DSD/WED ont augmenté la sensibilité des TCID50 d'un à deux ordres de grandeur. L'infectiosité du nHEV a été évaluée à 750,3 TCID50/million de copies d'ARN HEV [Min : 160,8 - Max : 1334] dans les conditions MCCI et 7200 TCID50/million de copies d'ARN HEV [Min : 4214- Max : 27060] dans les conditions DSD.

Pour les particules virales provenant du surnageant de PLC/PRF/5, la TCID50 par million de copies d'ARN HEV est de 5,85 [Min : 1,00- Max : 30,21] dans les conditions MCCI et de 207,4 [Min : 96,51- Max : 875,4] dans les conditions DSD. Enfin, pour les particules virales provenant de HepG2/C3A, la TCID50 par million de copies d'ARN du HEV était de 66 [Min : 3,33- Max : 375] dans des conditions MCCI et 2333 [Min : 497- Max : 16696] dans des conditions WED (Figure 15).

Ici, quelles que soient les conditions de culture, la souche nue est plus infectieuse que la souche quasi-enveloppée (en condition MCCI $p=0,0002$ à la fois pour la souche produite sur PLC/PRF/5 ou HepG2/C3A). Pour la même souche virale, le changement des conditions d'infections pour 6h d'incubation, 35,5°C avec du DMSO dans le milieu de culture augmente la TCID50/million de copies d'ARN HEV d'un facteur 5 pour le virus nu ($p=0,0028$) et d'un facteur 35 pour la forme quasi-enveloppée du virus produit sur PLC/PRF/5 ($p=0,0167$) ou HepG2/C3A ($p=0,0001$).

Les données de la littérature et notre expérience sur la culture du HEV nous ont conduits à changer nos conditions d'infection et de culture pour 6H d'infection à 35,5°C avec un milieu de culture contenant du DMSO. Ces améliorations ont été adoptées en même temps au laboratoire et ont permis d'améliorer la propagation du HEV en culture. Le changement simultané de ces conditions rend leur analyse rétrospective difficile, par conséquent, nous ne savons pas quel est l'apport respectif, du temps d'incubation de l'inoculum, de la température et des milieux de culture sur l'amélioration de la sensibilité de la TCID50. Malgré tous, ces conditions d'infection permettent d'améliorer significativement la sensibilité de notre méthode de TCID50.

III.2.3. Comparaison de l'infectiosité du HEV de génotype 3 sur les lignées HepG2/C3A et HepG2/F2.

L'infectiosité mesurée d'une souche virale dépend de l'efficacité d'une lignée cellulaire à propager l'infection. Dans cette optique, nous avons comparé les TCID50/million de copies d'ARN HEV pour deux lignées cellulaires régulièrement utilisées au laboratoire : les HepG2 Clone 3A et les HepG2/C3A sous-clone F2 (Figure 16).

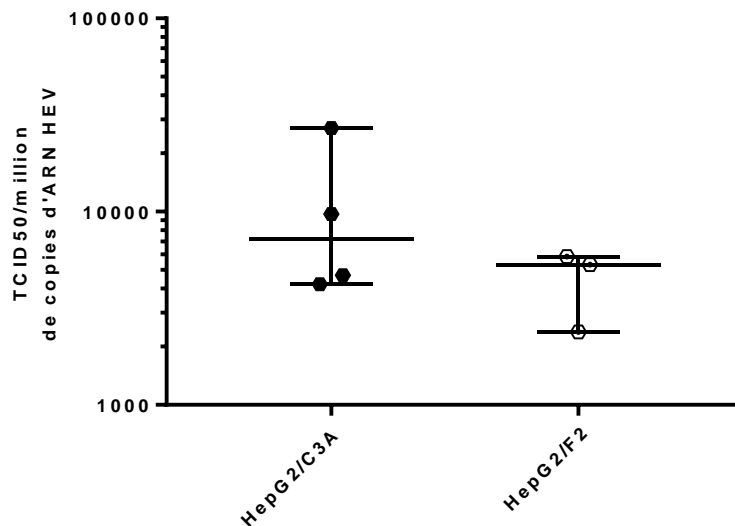


Figure 16 : Infectiosité d'une souche de selle de génotype 3 sur la lignée HepG2/C3A et HepG2/F2.

Des dilutions successives au 1/10^{ème} dans du milieu DSD d'une suspension virale de virus nu (souche Vil) ont été utilisées pour infecter des cellules HepG2/C3A (●) ou HepG2/F2 (○) à 35,5°C pendant 6H. Les cellules sont maintenues dans le même milieu à 35,5°C. Les cellules ont été lysées à J10 après le dépôt des inocula et la TCID50/million de copies d'ARN HEV a été calculée. La barre horizontale représente la médiane et les extrêmes.

La médiane d'infectiosité de la souche nue de génotype 3 sur les cellules HepG2/C3A est de 7200 TCID50/million de copies d'ARN HEV [Min: 4214; Max: 27060], celle des HepG2/F2 est de 5323 TCID50/million de copies d'ARN HEV [Min: 2383; Max: 5857].

Sur le plan quantitatif, nous n'observons pas de différence de TCID50/million de copies d'ARN HEV entre les deux lignées cellulaires testées. Sur le plan pratique, en présence de DMSO, les cellules HepG2/F2 forment une monocouche cellulaire confluyente et expriment plus de jonctions serrées que leur lignée mère HepG2/C3A. Cette monocouche a tendance à se décoller suite aux nombreux rinçages effectués après l'infection et peut faire échouer l'expérimentation. La lignée PLC/PRF/5 se détache elle aussi facilement en culture et a été abandonnée tôt lors de la mise au point de la TCID50. Pour un nombre de cellulesensemencées et une durée de culture équivalente, les HepG2/C3A forment des colonies non confluentes qui supportent mieux les rinçages. La fiabilité de la technique est donc supérieure avec les HepG2/C3A. De plus, les HepG2/C3A sont répandues dans les laboratoires et disponibles dans le commerce, ce qui rend la mise en place de la technique par un autre laboratoire plus aisée.

III.3. Quantification de l'infectiosité de différentes souches disponibles au laboratoire avec la méthode optimisée.

III.3.1. Quantification de l'infectiosité des souches de génotypes 3f, 3chi et 1 dans différentes matrices biologiques.

Les conditions DSD permettent de propager efficacement les souches cliniques issues des selles du HEV de génotype 1 et 3f (Figure 13) et permet d'augmenter la sensibilité de la technique de TCID₅₀ (Figure 15). Suite à cette observation nous avons mesuré l'infectiosité de souches du HEV provenant de différentes matrices biologiques (Figure 17).

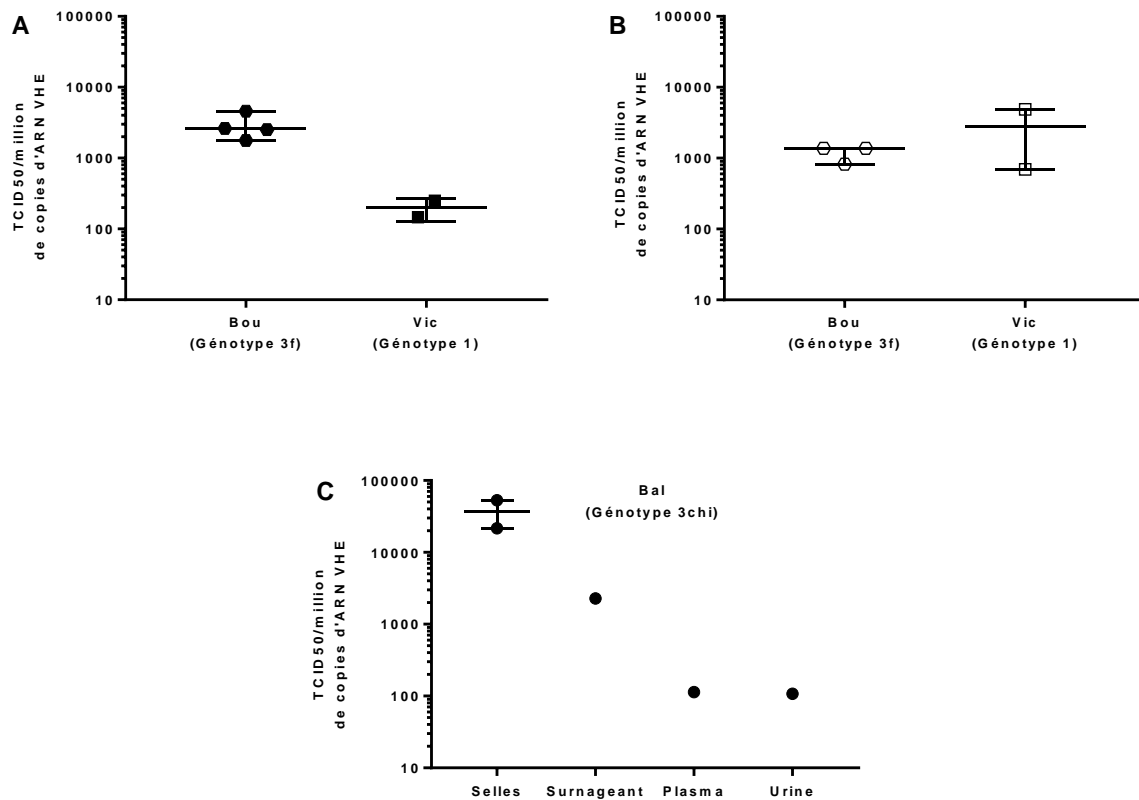


Figure 17 : Infectiosité des souches de HEV issue des selles, du surnageant de culture de cellules infectées, du plasma ou des urines.

Des dilutions successives au 1/10^{ème} des suspensions virales ont été utilisées pour inoculer les cellules HepG2/C3A soit pendant 6h à 35,5°C dans du milieu DSD. Les cellules sont maintenues dans le même milieu à 35,5°C. Les cellules sont lysées à J10 post-infection et la TCID₅₀/million de copies d'ARN HEV à été calculée. (A) TCID₅₀/million de copies d'ARN HEV des particules virales issues des selles de la souche Bou (●, n=4) et Vic (■, n=2). (B) TCID₅₀/million de copies d'ARN HEV des particules virales issues du surnageant de culture du premier passage sur HepG2/C3A de la souche Bou (○, n=3) et Vic (□, n= 2). (C) TCID₅₀/million de copies d'ARN de la souche Bal issue des selles, du surnageant de culture préparé comme en (B), du plasma et des urines (●, n=2) La barre horizontale représente la médiane.

Dans les selles (A), la médiane de TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 2575 [Min:1777 ; Max:4576] pour la souche Bou (Genotype 3f) et de 198,4 [Min: 146,6 ; Max:250,3] pour la souche Vic (Génotype 1).

Dans le surnageant de culture, la médiane de TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 1371 [Min:820,5 ; Max:1376] pour la souche Bou et de 2797 [Min: 696,6 ; Max:4898] pour la souche Vic.

Pour la souche Bal, la médiane de TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 37385 [Min:21673 ; Max:53097] pour la souche Bal issu des selles. Chez ce même patient, la TCID50/million de copies d'ARN HEV a été quantifié à 2281 pour le surnageant de culture, 113,27 pour le plasma et de 107,58 pour les urines.

Les trois souches issues des selles de patients infectés ont une infectiosité différente les unes les autres. D'une part, l'infectiosité est différente au sein même du génotype 3 entre les souches 3f et 3chi, d'autre part l'infectiosité des selles de génotype 1 est inférieure à celles des génotypes 3.

Quel que soit la souche, l'infectiosité du surnageant de culture est du même ordre de grandeur mais reste inférieure à l'infectiosité des selles. Pour un même patient, nous retrouvons des particules virales infectieuses dans différentes matrices biologiques.

Ces observations seront à confirmer grâce aux souches cliniques identifiées et conservées au sein du Centre National de Référence de l'Hépatite E.

III.3.2. Quantification de l'infectiosité des particules virales de génotype 1 et 3 produites dans un système d'hépatocytes polarisés en culture.

La lignée HepG2/F2 à la propriété de se polariser sur insert semi-perméable de collagène en milieu WED. La polarisation cellulaire permet une ségrégation des produits de sécrétion dans le pôle apical et basolatéral des hépatocytes. Dans un système physiologique, les pôles apicaux et basaux correspondent respectivement au compartiment biliaire et vasculaire. Nous avons voulu mesurer la différence d'infectiosité des particules virales qui bourgeonnent des deux côtés des hépatocytes polarisés.

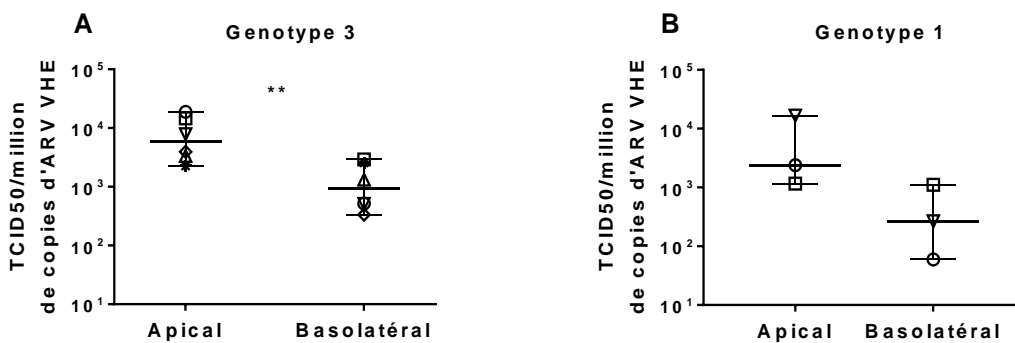


Figure 18 : Infectiosité des surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules F2 polarisées en culture puis infectées par le HEV.

Les cellules HepG2/F2 ont été cultivées sur insert semi-perméable de collagène en milieu de polarisation puis infectées avec des particules virales quasi-enveloppées du HEV de génotype 3 (A, souche Vil) ou de génotype 1 (B souche Vic). Chaque symbole représente une paire de surnageants apicaux et basolatéraux du même insert. La barre horizontale indique la médiane. ** $p < 0,01$.

Pour le génotype 3 du HEV, la médiane de TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 5901 [min : 2271 ; max : 18870] pour le virus excrété du côté apical et elle est de 923,9 [min : 335,3 ; max : 2914] pour le virus excrété du côté basolatéral. Pour le génotype 1 la médiane de TCID50/million de copies d'ARN HEV est de 2395 [min : 1159 ; max : 16696] pour le virus excrété du côté apical et elle est de 266,4 [min : 59,62 ; max : 1106] pour le virus excrété du côté basolatéral. Quel que soit le génotype, il y a plus de particules infectieuses qui sont libérées du côté apical que du côté basal des hépatocytes ($p=0,0087$ pour le génotype 3). Cela signifie qu'il existe au sein de la cellule infectée un système de tri qui dirige les particules infectieuses préférentiellement du côté apical des hépatocytes et cela quel que soit le génotype considéré.

IV. Discussion

Depuis la découverte du HEV dans les années 1980, la faible capacité des souches cliniques à se propager en culture a été un frein pour étudier la physiopathologie de l'hépatite E et pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. L'une des premières méthodes pour propager l'infection par le HEV *in vitro* est celle de l'équipe de Tanaka et al (203,206). Elle consiste à incuber l'inoculum 1 H à température ambiante dans un milieu appauvri en sérum (MCCI) sur des cellules PLC/PRF/5 ou A549. Avec cette méthode, la quantité d'ARN viral obtenu est faible (Figure 11). L'équipe de Xin et al. a réalisé une incubation de l'inoculum de 6h à 34,5°C dans un milieu contenant du DMSO (DSD) sur cellules HepG2/C3A. Dans ces conditions, les auteurs ont montré que l'augmentation de la durée d'incubation de l'inoculum améliore l'entrée des particules virales dans les cellules hôte jusqu'à atteindre un plateau à 2 H pour les particules nues et 6 H pour les particules virales quasi-enveloppées (8). Suite à des travaux sur le bourgeonnement des particules virales du VHE, nous avons adopté un milieu contenant du DMSO (WED) avec une incubation à 35,5°C pendant 1 h pour propager l'infection.

Les différents paramètres de culture ont été modifiés simultanément au laboratoire ce qui rend leur analyse rétrospective difficile. Néanmoins, les paramètres qui nous semblent les plus critiques pour la propagation de l'infection en culture sont l'incubation de l'inoculum à 6 H à 35,5°C et la présence de DMSO dans le milieu de culture (Figure 11 et 13).

Le DMSO est un solvant aprotique, polaire et amphiphile. Il sert de véhicule à de nombreux composés utilisés à un usage pharmaceutique ou scientifique et il est utilisé pour la cryoconservation cellulaire (239). Le DMSO tend à rapprocher les modèles d'hépatocarcinome humains d'un phénotype plus proche des conditions physiologiques (235,236). Dans ces modèles, le DMSO stimule de nombreuses voies métaboliques. Il induit le stress du réticulum endoplasmique, l'autophagie, le métabolisme lipidique ou glucidique et la polarisation cellulaire (178,236,240). Le DMSO augmente aussi le titre viral dans le surnageant de culture de cellules infectées par le virus de la grippe et des hépatites virales B ou C (237,241–243). Nous avons montré que le DMSO modifie le phénotype des lignées d'hépatocarcinomes vers un phénotype plus physiologique et permet ainsi de stimuler la propagation de certains virus hépatotropes plus adaptés à ce phénotype plus physiologique. Les voies métaboliques nécessaires à la propagation du HEV en culture restent encore à déterminer.

L'utilisation du milieu WED dès l'étape d'infection a permis d'augmenter la production d'ARN viral intracellulaire et extracellulaire d'un facteur 10 à la fois avec du virus nu et quasi-enveloppé provenant d'un premier passage sur PLC/PRF/5 (Figure 11). De plus, ce milieu améliore la propagation des souches cliniques du VHE (Figure 13). Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si le milieu WED augmente ou non le pourcentage de cellules infectées sur les cellules HepG2/C3A et son sous-clone, développé au laboratoire, HepG2/F2 (Figure 12).

Si le milieu WED augmente la production de d'ARN viral intra et extra-cellulaire indépendamment de l'entrée du virus, il pourrait stimuler des étapes du cycle cellulaire postérieures à l'entrée, comme la réplication de l'ARN viral, l'assemblage des particules virales ou leur sécrétion hors de la cellule. La quantification de l'infectiosité des particules virales produites en condition WED pourrait étayer cette hypothèse.

Puisque cette méthode de culture nous permet d'améliorer les paramètres de propagation de l'infection par le HEV, nous avons voulu évaluer l'impact de certains paramètres (durée de culture, milieu de culture et lignée cellulaire) pour améliorer la technique de quantification de l'infectiosité des particules virales développée au laboratoire (9).

En fonction de la souche, l'ARN HEV peut être indétectable à des temps précoces dans le surnageant de culture (5). Mais dans tous les cas, il y a plus d'ARN HEV intracellulaire qu'extracellulaire (Figure 11). Ainsi, la quantification de l'ARN viral dans le mélange du lysat et du surnageant cellulaire de notre système de culture nous permet de détecter l'infection virale à des temps précoces. La limite de détection de notre technique de RT-qPCR est de 50 copies/mL (233). Du fait de la sensibilité élevée de la RT-qPCR, les reliquats d'ARN viraux des inocula peuvent donner lieu à des faux positifs et augmenter artificiellement la valeur de TCID50/mL. Plusieurs facteurs peuvent conduire l'ARN viral des inocula à persister dans le surnageant de culture. D'une part, les particules virales nues s'accrochent de façon non-spécifique aux heparanes sulfates cellulaires avant de se lier à leur récepteur spécifique (156), d'autre part, l'ARN HEV ou les particules virales pourraient s'accrocher au support de culture et être relarguées dans le surnageant. Dans nos expérimentations cinq rinçages au PBS sont effectués à 24h après l'infection et permettent d'éliminer l'ARN HEV contenu dans les inocula. Il n'y a pas de différence entre la TCID50 des particules virales nues entre le temps de lyse précoce et tardif (Figure 14) ce qui confirme l'efficacité de ces rinçages (9).

Nous avons comparé l'influence des différents milieux de culture : MCCI, DSD et WED sur la TCID50 obtenue avec du virus nu ou quasi-enveloppé provenant d'un premier passage sur PLC/PRF/5 ou HepG2/C3A (Figure 15). Pour une même souche virale, les milieux WED et DSD augmentent les valeurs de TCID50/million de copie d'ARN HEV obtenues. Le DMSO est le point commun entre les milieux DSD et WED. Ses effets sur la culture du HEV contribue donc très probablement à augmenter la sensibilité de la méthode de TCID50 développée au laboratoire.

Par la suite, nous avons voulu comparer l'infectiosité de la même souche de virus nu sur la lignée HepG2/C3A et son sous-clone HepG2/F2 pour déterminer si une de ces deux lignées cellulaires était plus performante pour la quantification de l'infectiosité du HEV (Figure 16). Il n'y a pas de différence nette de TCID50/million de copies d'ARN HEV entre la lignée HepG2/C3A et la lignée HepG2/F2. La lignée HepG2/C3A étant plus facile à utiliser que la lignée HepG2/F2 elle est préférable pour la réalisation des TCID50. De plus, la lignée HepG2/C3A est largement répandue en laboratoire, ce qui permet une comparaison des TCID50 interlaboratoire plus aisée. Pour la suite des expérimentations, les conditions retenues sont 6h d'incubation de l'inoculum à 35,5°C avec la lignée cellulaire HepG2/C3A et une lyse à J10 post-infection en milieu DSD. Ces conditions sont les plus efficaces pour mesurer la TCID50/million de copies d'ARN HEV en culture.

L'infection s'accompagne de la production d'une grande quantité de protéine ORF2 glycosylée sécrétée dans le sérum des patients et dans le surnageant de culture. Cette forme glycosylée d'ORF2 est incapable d'encapsider l'ARN viral et elle est plus abondante que la protéine ORF2 de capsid dans le surnageant de culture (148,149). L'antigène ORF2 est détectable dès J4 avec le kit de détection d'antigène HEV par ELISA Wantai (Wantai Biopharm, Beijing, China) sur cellules HepG2/C3A infectées avec la souche Kernow-C1/p6 (244). La cinétique d'apparition intracellulaire et extracellulaire de l'antigène ORF2 de l'ARN du HEV atteint un plateau à partir de J8 post-infection dans les mêmes conditions (244). La détection de

l'antigène ORF2 par ELISA pourrait représenter une évolution de notre méthode en remplaçant la RT-qPCR pour déterminer l'infection des puits dans notre méthode de TCID50. Cela permettrait de diminuer le coût et le temps nécessaire pour la réalisation de la TCID50.

La proportion de particules virales infectieuses issues du surnageant de culture est similaire pour le génotype 1 et 3 du HEV (Figure 17). Pour les selles, la proportion de particules virales infectieuses semble différente d'un génotype à l'autre et au sein d'un même génotype. Cette différence d'infectiosité pourrait être importante pour répandre l'infection chez son hôte et pourrait influencer la dose minimale infectante de ces différentes souches. La souche issue des selles de génotype 1 est moins infectieuse en culture que celles de génotype 3 ce qui suggère que la dose minimale infectante est plus élevée pour le génotype 1. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que notre système de culture ne soit pas optimisé pour le génotype 1 du HEV, ce génotype pourrait se propager plus efficacement dans d'autres milieux d'infection (231), dans d'autres systèmes hépatocellulaires (209) ou dans d'autres modèles cellulaires (10,161). D'autre part, nous disposons d'un nombre restreint de données sur les différentes souches du HEV, ces résultats doivent être interprétés avec précaution.

Les particules infectieuses du HEV sont présents dans d'autres compartiments de l'organisme. Notre technique a permis de mesurer l'infectiosité des particules virales des selles, du plasma et de l'urine issue d'un même patient infecté par le HEV de génotype 3 (Figure 17) (110). La présence de particules virales infectieuses dans les urines suggère que le HEV pourrait se concentrer dans les urines des patients infectés et pourraient contribuer à répandre le HEV dans l'environnement (110). L'infectiosité du plasma et des urines est inférieure à celle du surnageant de culture pour le patient Bal. Cela suggère qu'il y a plus de particules défectives dans ces compartiments ou que des facteurs dans le plasma et les urines interfèrent avec l'infectiosité des particules virales.

L'hépatocyte est une cellule polarisée en culture avec un pôle apical bordant le canalicule biliaire et un côté basolatéral bordant le flux sanguin. Les produits de sécrétion comme la bile ou l'albumine sont dirigés vers un pôle ou l'autre de l'hépatocyte. L'endocytose et l'exocytose sont elles aussi polarisées dans l'hépatocyte, soit vers le côté biliaire, soit vers le côté vasculaire de l'hépatocyte. Les virus hépatotropes tirent parti de la polarisation cellulaire pour leur sécrétion. Par exemple, les virus des hépatites A, B et C sont libérés préférentiellement du côté basolatéral des hépatocytes polarisés en culture (178–180). L'enveloppe des virus des hépatites B et C est nécessaire à l'infectiosité de ces virus; les particules virales du HBV et du HCV atteignant l'arbre biliaire seraient donc désactivées grâce à l'action détergente des sels biliaires (245).

Au laboratoire, nous avons mis au point une lignée cellulaire capable de se polariser sur insert-semi perméable de collagène et qui permet une ségrégation des surnageants de culture apicaux et basolatéraux. Dans ce système de culture, l'ARN HEV sort préférentiellement du côté apical des hépatocytes infectés. Pour les génotypes 1 et 3 du HEV, notre technique de mesure de l'infectiosité des particules virales nous a permis de déterminer qu'il y a plus de particules virales infectieuses dans le surnageant de culture apical que dans le surnageant de culture basolatéral (Figure 18) (12). Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les particules virales libérées dans les canalicules biliaires pourraient répandre l'infection dans l'arbre biliaire de l'hôte et que ces particules virales seraient délipidées sous l'action détergente des sels biliaires pour donner la forme nue retrouvée dans les selles des patients (181).

Même s'il y a moins de particules virales infectieuses du côté basolatéral des hépatocytes, ces particules virales pourraient atteindre d'autres tissus via le flux sanguin, répandre l'infection dans l'hôte et contribuer aux manifestations extra-hépatiques observées chez le patient. L'augmentation de la sensibilité de notre technique de TCID50 nous a permis de mesurer expérimentalement la différence de proportion de particules virales infectieuses entre le surnageant apical et basolatéral. Avec une technique moins sensible, nous aurions pu conclure que le surnageant basolatéral ne contenait pas de particules virales infectieuses et que ces particules n'intervenaient pas dans la physiopathologie de l'infection.

Conclusion

La culture du HEV est longue et difficile. À ce jour, les seuls systèmes ayant permis la culture du HEV de génotype 1 à 4 à partir d'isolats cliniques sont les hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites ou les cellules souches embryonnaires humaines (209,246). Ces systèmes de culture sont complexes et les compétences nécessaires à leurs mises en œuvre limitent leur utilisation. Notre système de culture a permis la propagation d'isolats cliniques du HEV de génotypes 1 et 3 (12). Bien que nous ne disposions pas d'isolats cliniques de selles de génotypes 2 et 4 au laboratoire, notre système est un candidat idéal pour expérimenter la culture pangénotypique du HEV.

La culture d'isolats cliniques du HEV se fait traditionnellement à partir des selles concentrées et clarifiées de patients infectées par le HEV (181,231). Notre système de culture pourrait être utilisé à l'avenir pour la propagation du HEV et la détermination de l'infectiosité des particules virales provenant des différents compartiments biologiques et leur contribution dans la propagation de l'infection chez l'hôte et leur dissémination dans l'environnement.

Le HEV tire profit de la polarisation cellulaire pour sa sortie. Les particules virales issues du surnageant basolatéral et apical des cellules HepG2/F2 polarisées en culture sont isolées dans différentes fractions de densité correspondant à celle des exosomes. Cela suggère que le HEV bourgeonne dans des sous-populations d'exosomes. D'autre part, le HEV se répartit en quasi-espèce dans les différents compartiments de l'organisme (106,107). Les variants de la quasi-espèce du HEV pourraient avoir des propriétés différentes en termes de tropisme tissulaire, d'entrée ou de sortie polarisée du virus de l'hépatite E. Notre méthode de mesure de l'infectiosité des particules virales du HEV permettrait d'explorer l'infectiosité de ces variants et de déterminer leur implication dans la physiopathologie de l'infection par le HEV.

Nos travaux ont permis de mettre au point une technique de mesure sensible et reproductible pour la TCID₅₀ du virus de l'hépatite E et d'améliorer nos techniques de culture en augmentant le titre viral et à de propager *in vitro* l'infection d'une souche clinique du HEV de génotype 1 pour la première fois au laboratoire. Notre technique de TCID₅₀ a aussi contribué à l'étude des sous-populations d'exosomes issues du bourgeonnement polarisé du virus de l'hépatite E dans les hépatocytes. L'hépatite E est un enjeu de santé publique important qui reste peu étudié du fait de difficultés expérimentales, notre technique de TCID₅₀ pourrait avoir un impact direct sur l'évaluation du HEV en santé publique grâce la comparaison inter-souche de l'infectiosité des particules virales. Ces avancées permettraient aussi de déterminer des conditions de désactivation des particules virales dans différentes matrices comme les produits issus des dons sanguins ou les denrées alimentaires.

Enfin, notre technique de TCID₅₀ permettra de mesurer *in-vitro* l'efficacité de composés thérapeutiques ou d'anticorps neutralisants dirigés contre les particules virales du HEV.

Références bibliographiques

1. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Péron J-M, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 21 févr 2008;358(8):811-7.
2. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet Lond Engl*. 22 avr 1995;345(8956):1025-6.
3. Frias M, López-López P, Rivero A, Rivero-Juarez A. Role of Hepatitis E Virus Infection in Acute-on-Chronic Liver Failure. *BioMed Res Int*. 2018;2018:9098535.
4. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.
5. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai null, et al. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol*. avr 2010;48(4):1112-25.
6. Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu Rev Virol*. nov 2014;1(1):539-60.
7. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, et al. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci*. 8 févr 2011;108(6):2438-43.
8. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol*. avr 2016;90(8):4232-42.
9. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*. oct 2017;141:70-9.
10. Gouilly J, Chen Q, Siewiera J, Cartron G, Levy C, Dubois M, et al. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat Commun*. 12 2018;9(1):4748.
11. Drave SA, Debing Y, Walter S, Todt D, Engelmann M, Friesland M, et al. Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J Viral Hepat*. juill 2016;23(7):512-21.
12. Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, et al. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol*. 21 nov 2018;
13. Cockayne EA. Catarrhal Jaundice, Sporadic And Epidemic, And Its Relation To Acute Yellow Atrophy Of The Liver. *QJM Int J Med*. oct 1912;(6):1-29.
14. MacCallum FO. Early studies of viral hepatitis. *Br Med Bull*. mai 1972;28(2):105-8.
15. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 10 avr 1975;292(15):767-70.

16. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med.* juin 1980;68(6):818-24.
17. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* oct 2011;161(1):3-14.
18. Reyes G, Purdy M, Kim J, Luk K, Young L, Fry K, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science.* 16 mars 1990;247(4948):1335-9.
19. Purdy MA, Khudyakov YE. Evolutionary History and Population Dynamics of Hepatitis E Virus. *Tavis JE, éditeur. PLoS ONE.* 17 déc 2010;5(12):e14376.
20. Arankalle VA, Chadha MS, Tsarev SA, Emerson SU, Risbud AR, Banerjee K, et al. Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 avr 1994;91(8):3428-32.
21. Clayson ET, Vaughn DW, Innis BL, Shrestha MP, Pandey R, Malla DB. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis at a military training camp in Nepal. *J Med Virol.* mars 1998;54(3):178-82.
22. Testa J, Kadadé G, Zaneidou M, Ibrahim A, Lagare A, Issaka B, et al. Outbreak of Hepatitis E Virus Infection in Displaced Persons Camps in Diffa Region, Niger, 2017. *Am J Trop Med Hyg.* 3 oct 2018;99(4):1055-7.
23. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* juin 2011;158(1-2):116-23.
24. Reuter G, Boros Á, Mátics R, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (*Egretta garzetta*), in Hungary. *Infect Genet Evol.* 1 déc 2016;46:74-7.
25. Meng X-J. Expanding Host Range and Cross-Species Infection of Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 4 août 2016;12(8).
26. Xie X-T, Macdonald RE, Tapscott B, Nagy E, Turner PV. Detection of Astrovirus, Rotavirus C, and Hepatitis E Viral RNA in Adult and Juvenile Farmed Mink (*Neovison vison*). *Front Vet Sci.* 19 juin 2018;5.
27. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, et al. Identification and Characterization of the Neutralization Epitope(s) of the Hepatitis E Virus. *Virology.* sept 2001;288(2):203-11.
28. Wang S, Cheng X, Dai X, Dong C, Xu M, Liang J, et al. Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. *Virus Res.* sept 2013;176(1-2):101-6.
29. Smith DB, Simmonds P. Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 04 2018;8(9).
30. 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 U S A.* 2 sept 1997;94(18):9860-5.

31. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, et al. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol.* sept 2004;74(1):67-70.
32. Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishihiro S. 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.* 20 déc 2004;330(2):501-5.
33. Cossaboom CM, Córdoba L, Dryman BA, Meng X-J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis.* nov 2011;17(11):2047-9.
34. 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.* août 2012;18(8):1274-81.
35. Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, et al. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* juin 2007;7(3):368-73.
36. Nidaira M, Takahashi K, Ogura G, Taira K, Okano S, Kudaka J, et al. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J Vet Med Sci.* déc 2012;74(12):1665-8.
37. Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes.* juin 2015;50(3):410-7.
38. Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, Robetto S, Marsilio F, et al. Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats. *Virus Res.* 02 2016;225:69-72.
39. Montalvo Villalba MC, Cruz Martínez D, Ahmad I, Rodriguez Lay LA, Bello Corredor M, Guevara March C, et al. Hepatitis E virus in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis Aquat Organ.* 08 2017;123(1):13-8.
40. Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, et al. High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol.* nov 2017;89(11):1981-7.
41. García-Bocanegra I, Rivero A, Caballero-Gómez J, López-López P, Cano-Terriza D, Frías M, et al. Hepatitis E virus infection in equines in Spain. *Transbound Emerg Dis.* janv 2019;66(1):66-71.
42. Sarchese V, Di Profio F, Melegari I, Palombieri A, Sanchez SB, Arbuatti A, et al. Hepatitis E virus in sheep in Italy. *Transbound Emerg Dis.* 18 mars 2019;
43. Nicot F, Jeanne N, Roulet A, Lefebvre C, Carcenac R, Manno M, et al. Diversity of hepatitis E virus genotype 3. *Rev Med Virol.* 2018;28(5):e1987.
44. Koizumi Y, Isoda N, Sato Y, Iwaki T, Ono K, Ido K, et al. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol.* août 2004;42(8):3883-5.
45. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, et al. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol.* août 2011;156(8):1345-58.

46. Xu F, Pan Y, Baloch AR, Tian L, Wang M, Na W, et al. Hepatitis E virus genotype 4 in yak, northwestern China. *Emerg Infect Dis.* déc 2014;20(12):2182-4.
47. Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology Baltim Md.* 2016;64(2):350-9.
48. Li S, Liu M, Cong J, Zhou Y, Miao Z. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus in Goats at Slaughterhouse in Tai'an Region, China. *BioMed Res Int.* 2017;2017:3723650.
49. Li T-C, Kataoka M, Takahashi K, Yoshizaki S, Kato T, Ishii K, et al. Generation of hepatitis E virus-like particles of two new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes. *Vet Microbiol.* 9 juill 2015;178(1-2):150-7.
50. Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* févr 2016;150(2):355-357.e3.
51. Sridhar S, Yip CCY, Wu S, Cai J, Zhang AJ-X, Leung K-H, et al. Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerg Infect Dis.* déc 2018;24(12):2241-50.
52. Bouwknecht M, Frankena K, Rutjes SA, Wellenberg GJ, de Roda Husman AM, van der Poel WHM, et al. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res.* sept 2008;39(5):40.
53. Lhomme S, Abravanel F, Capelli N, Marion O, El Costa H, Jabrane-Ferrat N, et al. Virus de l'hépatite E: de l'organisme infecté à la réponse cellulaire. *Virologie.* oct 2018;22(5):239-50.
54. Realpe-Quintero M, Mirazo S, Viera-Segura O, Copado-Villagrana ED, Panduro A, Roman S, et al. Hepatitis E Virus Genotype 1 and Hepatitis A Virus Dual Infection in Pediatric Patients with a Low Socioeconomic Status from Mexico. *Intervirology.* 2018;61(3):105-10.
55. Kim J-H, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzbza TF. A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infect Dis.* 5 juin 2014;14:308.
56. Dagneu M, Belachew A, Tiruneh M, Moges F. Hepatitis E virus infection among pregnant women in Africa: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 13 juin 2019;19(1):519.
57. Dimeglio C, Kania D, Mantono JM, Kagoné T, Zida S, Tassebedo S, et al. Hepatitis E Virus Infections among Patients with Acute Febrile Jaundice in Burkina Faso. *Viruses.* 14 juin 2019;11(6):554.
58. Akanbi OA, Harms D, Wang B, Opaleye OO, Adesina O, Osundare FA, et al. Complete Genome Sequence of a Hepatitis E Virus Genotype 1e Strain from an Outbreak in Nigeria, 2017. *Microbiol Resour Announc.* janv 2019;8(1).
59. Bansal M, Kaur S, Deka D, Singh R, Gill JPS. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus infection in swine and occupationally exposed workers in Punjab, India. *Zoonoses Public Health.* déc 2017;64(8):662-72.

60. Javed N, Ullah SH, Hussain N, Sheikh MA, Khan A, Ghafoor F, et al. Hepatitis E virus seroprevalence in pregnant women in Pakistan: maternal and fetal outcomes. *East Mediterr Health J Rev Sante Mediterr Orient Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit*. 30 oct 2017;23(8):559-63.
61. Farshadpour F, Taherkhani R, Ravanbod MR, Eghbali SS, Taherkhani S, Mahdavi E. Prevalence, risk factors and molecular evaluation of hepatitis E virus infection among pregnant women resident in the northern shores of Persian Gulf, Iran. *PloS One*. 2018;13(1):e0191090.
62. Tripathy AS, Puranik S, Sharma M, Chakraborty S, Devakate UR. Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in Pune, India. *J Med Virol*. mai 2019;91(5):813-9.
63. Moss da Silva C, Mendes de Oliveira J, Mendoza-Sassi RA, Figueiredo Nunes AS, Mota LD da, Nader MM, et al. Detection and characterization of hepatitis E virus genotype-3 in HIV-infected patients and blood donors from Southern Brazil. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 4 juill 2019;
64. Sarmiento-Silva RE, Arenas-Huertero F. Hepatitis E in Latin America. *Ann Hepatol*. juill 2019;18(4):541-2.
65. Cangin C, Focht B, Harris R, Strunk JA. Hepatitis E seroprevalence in the United States: Results for immunoglobulins IGG and IGM. *J Med Virol*. janv 2019;91(1):124-31.
66. Viera-Segura O, Realpe-Quintero M, Panduro A, Roman S, Jose-Abrego A, Gonzalez-Aldaco K, et al. First detection of hepatitis E virus genotype 3 as a common infectious agent in patients with chronic liver damage in Mexico. *Ann Hepatol*. août 2019;18(4):571-7.
67. Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, et al. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses*. 06 2016;8(8).
68. Balayan MS, Fedorova OE, Mikhailov MI, Rytick PG, Eremin VF, Danilova TI, et al. Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients. *J Viral Hepat*. juill 1997;4(4):279-83.
69. Madden RG, Wallace S, Sonderup M, Korsman S, Chivese T, Gavine B, et al. Hepatitis E virus: Western Cape, South Africa. *World J Gastroenterol*. 2016;22(44):9853.
70. Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, et al. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion (Paris)*. déc 2008;48(12):2568-76.
71. Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, et al. Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan. *Vox Sang*. oct 2016;111(3):242-6.
72. Owada Y, Oshiro Y, Inagaki Y, Harada H, Fujiyama N, Kawagishi N, et al. A Nationwide Survey of Hepatitis E Virus Infection and Chronic Hepatitis in Heart and Kidney Transplant Recipients in Japan. *Transplantation*. 20 mai 2019;
73. Yapa CM, Furlong C, Rosewell A, Ward KA, Adamson S, Shadbolt C, et al. First reported outbreak of locally acquired hepatitis E virus infection in Australia. *Med J Aust*. 18 avr 2016;204(7):274.

74. Shrestha AC, Flower RLP, Seed CR, Keller AJ, Harley R, Chan H-T, et al. Hepatitis E virus RNA in Australian blood donations. *Transfusion (Paris)*. 2016;56(12):3086-93.
75. Shu Y, Chen Y, Zhou S, Zhang S, Wan Q, Zhu C, et al. Cross-sectional Seroprevalence and Genotype of Hepatitis E Virus in Humans and Swine in a High-density Pig-farming Area in Central China. *Viol Sin*. 1 juill 2019;
76. Chen X, Gong P, Wagner AL, Li Y, Wang G, Lu Y. Identification of hepatitis E virus subtype 4f in blood donors in Shanghai, China. *Virus Res*. mai 2019;265:30-3.
77. Yazaki Y, Sugawara K, Honda M, Ohnishi H, Nagashima S, Takahashi M, et al. Characteristics of 20 Patients with Autochthonous Acute Hepatitis E in Hokkaido, Japan: First Report of Bilateral Facial Palsy Following the Infection with Genotype 4 Hepatitis E Virus. *Tohoku J Exp Med*. 2015;236(4):263-71.
78. Suzuki K, Kataoka K, Miyamoto Y, Miyasaka A, Kumagai I, Takikawa Y, et al. Clinical and molecular analyses of sporadic acute hepatitis A and E and the specific viral genotypes isolated in Iwate and three neighboring prefectures in the northern part of Honshu, Japan, between 2004 and 2013. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. juill 2015;45(7):714-27.
79. Lee J-T, Shao P-L, Chang L-Y, Xia N-S, Chen P-J, Lu C-Y, et al. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection among Swine Farmers and the General Population in Rural Taiwan. *PLoS One*. 2013;8(6):e67180.
80. Hau CH, Hien TT, Tien NT, Khiem HB, Sac PK, Nhung VT, et al. Prevalence of enteric hepatitis A and E viruses in the Mekong River delta region of Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. févr 1999;60(2):277-80.
81. Hijikata M, Hayashi S, Trinh NT, Ha LD, Ohara H, Shimizu YK, et al. Genotyping of hepatitis E virus from Vietnam. *Intervirology*. 2002;45(2):101-4.
82. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, et al. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatol Baltim Md*. avr 2016;63(4):1145-54.
83. Andonov A, Robbins M, Borlang J, Cao J, Hattchete T, Stueck A, et al. Rat hepatitis E virus linked to severe acute hepatitis in an immunocompetent patient. *J Infect Dis*. 11 janv 2019;
84. 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*. 15 sept 2010;202(6):825-34.
85. Renou C, Roque-Afonso A-M, Afonso A-MR, Pavio N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis*. nov 2014;20(11):1945-7.
86. Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, Rodríguez-Frías F, Quer J, Buti M. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol*. févr 2015;49(2):165-8.
87. Salines M, Andraud M, Rose N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res*. 25 2017;48(1):31.

88. Colson P, Kaba M, Bernit E, Motte A, Tamalet C. Hepatitis E associated with surgical training on pigs. *The Lancet*. sept 2007;370(9591):935.
89. Chandler JD, Riddell MA, Li F, Love RJ, Anderson DA. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol*. août 1999;68(1-2):95-105.
90. Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, Inoue G, Hiasa Y, Horiike N, et al. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. mars 2007;37(3):214-20.
91. 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*. août 2009;81(8):1371-9.
92. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*. 03 2016;8(10).
93. Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al. Hepatitis E Outbreak on Cruise Ship. *Emerg Infect Dis*. nov 2009;15(11):1738-44.
94. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion (Paris)*. 1 juin 2004;44(6):934-40.
95. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med*. 1 avr 2006;16(2):79-83.
96. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol*. 2018;68(6):1256-71.
97. Lhomme S, Gallian P, Dimeglio C, Assal A, Abravanel F, Tiberghien P, et al. Viral load and clinical manifestations of hepatitis E virus genotype 3 infections. *J Viral Hepat*. 16 mai 2019;
98. Gallian P, Pouchol E, Djoudi R, Lhomme S, Mouna L, Gross S, et al. Transfusion-Transmitted Hepatitis E Virus Infection in France. *Transfus Med Rev*. 1 juill 2019;33(3):146-53.
99. Parsa R, Adibzadeh S, Behzad Behbahani A, Farhadi A, Yaghoobi R, Rafiei Dehbidi GR, et al. Detection of Hepatitis E Virus Genotype 1 Among Blood Donors From Southwest of Iran. *Hepat Mon*. 18 mai 2016;16(6).
100. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primer*. 16 nov 2017;3:17086.
101. Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res*. oct 2011;161(1):15-22.
102. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. nov 2008;8(11):698-709.
103. Bazerbachi F, Haffar S, Garg SK, Lake JR. Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. *Gastroenterol Rep*. févr 2016;4(1):1-15.

104. Dalton HR, Kamar N, van Eijk JJJ, Mclean BN, Cintas P, Bendall RP, et al. Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol*. févr 2016;12(2):77-85.
105. Abravanel F, Pique J, Couturier E, Nicot F, Dimeglio C, Lhomme S, et al. Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *J Infect*. sept 2018;77(3):220-6.
106. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, Kamar N, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol*. sept 2012;86(18):10006-14.
107. Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. mai 2010;10(5):1321-4.
108. Kamar N, Mansuy JM, Esposito L, Legrand-Abravanel F, Peron JM, Durand D, et al. Acute hepatitis and renal function impairment related to infection by hepatitis E virus in a renal allograft recipient. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. janv 2005;45(1):193-6.
109. Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, et al. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation*. 27 mars 2012;93(6):617-23.
110. Marion O, Capelli N, Lhomme S, Dubois M, Pucelle M, Abravanel F, et al. Hepatitis E virus genotype 3 and capsid protein in the blood and urine of immunocompromised patients. *J Infect*. mars 2019;78(3):232-40.
111. Abid S, Khan AH. Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *Am J Gastroenterol*. juin 2002;97(6):1544-7.
112. Mishra P, Mahapatra M, Kumar R, Pati HP. Autoimmune hemolytic anemia and erythroid hypoplasia associated with hepatitis E. *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol*. août 2007;26(4):195-6.
113. Thapa R, Biswas B, Mallick D, Ghosh A. Acute pancreatitis--complicating hepatitis E virus infection in a 7-year-old boy with glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin Pediatr (Phila)*. mars 2009;48(2):199-201.
114. Fourquet E, Mansuy JM, Bureau C, Recher C, Vinel JP, Izopet J, et al. Severe thrombocytopenia associated with acute autochthonous hepatitis E. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. mai 2010;48(1):73-4.
115. Jain AK, Sircar S, Jain M, Adkar S, Waghmare C, Chahwala F. Increased morbidity in acute viral hepatitis with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol*. mars 2013;32(2):133-4.
116. Woolson KL, Forbes A, Vine L, Beynon L, McElhinney L, Panayi V, et al. Extra-hepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection. *Aliment Pharmacol Ther*. déc 2014;40(11-12):1282-91.
117. Changede P, Chavan N, Raj N, Gupta P. An Observational Study to Evaluate the Maternal and Foetal Outcomes in Pregnancies Complicated with Jaundice. *J Obstet Gynaecol India*. févr 2019;69(1):31-6.

118. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.* 3 juill 2007;147(1):28-33.
119. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* janv 2014;27(1):116-38.
120. Moal V, Gérolami R, Ferretti A, Purgus R, Devichi P, Burtey S, et al. Hepatitis E virus of subtype 3i in chronically infected kidney transplant recipients in southeastern France. *J Clin Microbiol.* nov 2014;52(11):3967-72.
121. Wang Y, Chen G, Pan Q, Zhao J. Chronic Hepatitis E in a Renal Transplant Recipient: The First Report of Genotype 4 Hepatitis E Virus Caused Chronic Infection in Organ Recipient. *Gastroenterology.* 2018;154(4):1199-201.
122. Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2009;45(4):269-71.
123. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):1025-7.
124. Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KEA, Kovari H, et al. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* juin 2011;17(6):1074-8.
125. Mansuy J-M, 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 Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 févr 2009;48(3):373-4.
126. Ollier L, Tieulie N, Sanderson F, Heudier P, Giordanengo V, Fuzibet J-G, et al. Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med.* 17 mars 2009;150(6):430-1.
127. Tavitian S, Péron J-M, Huynh A, Mansuy J-M, Ysebaert L, Huguet F, et al. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* oct 2010;49(2):141-4.
128. Kamar N, Mansuy J-M, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, et al. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* août 2008;8(8):1744-8.
129. Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med.* 21 févr 2008;358(8):859-60.
130. Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, Joseph M, Thurairajah PH, Warshow U, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 15 nov 2007;26(10):1429-35.
131. Péron JM, Abravanel F, Guillaume M, Gérolami R, Nana J, Anty R, et al. Treatment of autochthonous acute hepatitis E with short-term ribavirin: a multicenter retrospective study. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* mars 2016;36(3):328-33.
132. Marion O, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Should 12- or 24-week post-ribavirin follow-up be considered to define sustained virological response in transplant patients treated for chronic hepatitis E virus infection? *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2019;21(3):e13065.

133. Résumé des caractéristiques du produit - RIBAVIRINE BIOGARAN 200 mg, comprimé pelliculé - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 20 juill 2019]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=62893252&typedoc=R#RcpConduite>
134. Kamar N, Chatelut E, Manolis E, Lafont T, Izopet J, Rostaing L. Ribavirin pharmacokinetics in renal and liver transplant patients: evidence that it depends on renal function. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* janv 2004;43(1):140-6.
135. Kar P, Sengupta A. A guide to the management of hepatitis E infection during pregnancy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* mars 2019;13(3):205-11.
136. Wu X, Chen P, Lin H, Hao X, Liang Z. Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine. *Hum Vaccines Immunother.* 02 2016;12(10):2603-10.
137. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* nov 1991;185(1):120-31.
138. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 sept 1992;89(17):8259-63.
139. Vikram T, Kumar P. Analysis of Hepatitis E virus (HEV) X-domain structural model. *Bioinformatics.* 2018;14(7):398-403.
140. Proudfoot A, Hyrina A, Holdorf M, Frank AO, Bussiere D. First Crystal Structure of a Nonstructural Hepatitis E Viral Protein Identifies a Putative Novel Zinc-Binding Protein. *J Virol.* 1 juill 2019;93(13).
141. Kenney SP, Meng X-J. Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 janv 2019;9(1).
142. Purdy MA. Evolution of the hepatitis E virus polyproline region: order from disorder. *J Virol.* sept 2012;86(18):10186-93.
143. Lhomme S, Garrouste C, Kamar N, Saune K, Abravanel F, Mansuy J-M, et al. Influence of polyproline region and macro domain genetic heterogeneity on HEV persistence in immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 15 janv 2014;209(2):300-3.
144. Szkolnicka D, Pollán A, Da Silva N, Oechslin N, Gouttenoire J, Moradpour D. Recombinant Hepatitis E Viruses Harboring Tags in the ORF1 Protein. *J Virol.* 17 juill 2019;
145. Xing L, Li T-C, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, et al. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem.* 22 oct 2010;285(43):33175-83.
146. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 2009;106(31):12986-91.

147. Guu TSY, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 2009;106(31):12992-7.
148. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier J-C, Saliou J-M, Ankavay M, et al. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology.* 2018;154(1):211-223.e8.
149. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci.* 18 avr 2018;201721345.
150. Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou J-M, Wychowski C, Saas L, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep.* 18 avr 2019;9(1):6243.
151. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, et al. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol.* août 2009;90(Pt 8):1880-91.
152. Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L, Oechslin N, Mauron J, Matter M, et al. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *Randall G, éditeur. PLOS Pathog.* 10 déc 2018;14(12):e1007471.
153. Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 2017;114(5):1147-52.
154. Lei Q, Li L, Huang W, Qin B, Zhang S. HEV ORF3 downregulates CD14 and CD64 to impair macrophages phagocytosis through inhibiting JAK/STAT pathway. *J Med Virol.* juin 2019;91(6):1112-9.
155. Lei Q, Li L, Zhang S, Li T, Zhang X, Ding X, et al. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. *Sci Rep.* 5 juin 2018;8(1):8585.
156. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *J Virol.* 15 déc 2009;83(24):12714-24.
157. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic Cph Den.* avr 2015;16(4):398-416.
158. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol.* juin 2006;80(12):5919-26.
159. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* oct 2011;161(1):47-58.
160. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, et al. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol.* 2011;92(12):2838-48.

161. Emerson SU, Nguyen HT, Torian U, Burke D, Engle R, Purcell RH. 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.* sept 2010;84(18):9059-69.
162. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai null, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol.* févr 2011;92(Pt 2):269-78.
163. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 2014;95(10):2166-75.
164. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* janv 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13.
165. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* mai 2008;18(5):199-209.
166. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology.* août 2001;121(2):337-49.
167. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics MCP.* mars 2013;12(3):587-98.
168. Chen Q, Takada R, Noda C, Kobayashi S, Takada S. Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. *Sci Rep.* 21 2016;6:35562.
169. Klingeborn M, Dismuke WM, Skiba NP, Kelly U, Stamer WD, Bowes Rickman C. Directional Exosome Proteomes Reflect Polarity-Specific Functions in Retinal Pigmented Epithelium Monolayers. *Sci Rep.* 07 2017;7(1):4901.
170. Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, Gradilone SA, Banales JM, Masyuk TV, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* oct 2010;299(4):G990-999.
171. Poggio M, Hu T, Pai C-C, Chu B, Belair CD, Chang A, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell.* 4 avr 2019;177(2):414-427.e13.
172. Tashiro M, Yamakawa M, Tobita K, Seto JT, Klenk HD, Rott R. Altered budding site of a pantropic mutant of Sendai virus, F1-R, in polarized epithelial cells. *J Virol.* oct 1990;64(10):4672-7.
173. Blau DM, Compans RW. Adaptation of measles virus to polarized epithelial cells: alterations in virus entry and release. *Virology.* 12 mai 1997;231(2):281-9.
174. Chu JJH, Ng ML. Infection of polarized epithelial cells with flavivirus West Nile: polarized entry and egress of virus occur through the apical surface. *J Gen Virol.* oct 2002;83(Pt 10):2427-35.

175. Tapparel C, Sobo K, Constant S, Huang S, Van Belle S, Kaiser L. Growth and characterization of different human rhinovirus C types in three-dimensional human airway epithelia reconstituted in vitro. *Virology*. nov 2013;446(1-2):1-8.
176. Katoh H, Nakatsu Y, Kubota T, Sakata M, Takeda M, Kidokoro M. Mumps Virus Is Released from the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-Mediated Transport System. *J Virol*. déc 2015;89(23):12026-34.
177. Cevallos Porta D, López S, Arias CF, Isa P. Polarized rotavirus entry and release from differentiated small intestinal cells. *Virology*. 2016;499:65-71.
178. Snooks MJ, Bhat P, Mackenzie J, Counihan NA, Vaughan N, Anderson DA. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J Virol*. sept 2008;82(17):8733-42.
179. Bhat P, Snooks MJ, Anderson DA. Hepatocytes traffic and export hepatitis B virus basolaterally by polarity-dependent mechanisms. *J Virol*. déc 2011;85(23):12474-81.
180. Belouzard S, Danneels A, Fénéant L, Séron K, Rouillé Y, Dubuisson J. Entry and release of hepatitis C virus in polarized human hepatocytes. *J Virol*. 28 juin 2017;
181. Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res*. oct 2011;161(1):65-77.
182. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
183. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.
184. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis null, Kobayashi T, Nishizawa T, et al. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol*. mai 2014;159(5):979-91.
185. Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis null, Jirintai S, Mulyanto null, Nagashima S, et al. Production of monoclonal antibodies against the ORF3 protein of rat hepatitis E virus (HEV) and demonstration of the incorporation of the ORF3 protein into enveloped rat HEV particles. *Arch Virol*. déc 2016;161(12):3391-404.
186. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol*. 15 nov 2017;91(22).
187. Bradley DW, Krawczynski K, Cook EH, McCaustland KA, Humphrey CD, Spelbring JE, et al. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1987;84(17):6277-81.
188. Arankalle VA, Ticehurst J, Sreenivasan MA, Kapikian AZ, Popper H, Pavri KM, et al. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet Lond Engl*. 12 mars 1988;1(8585):550-4.

189. Gupta H, Joshi YK, Varma A, Shenoy S, Sriramchari S, Iyenger B, et al. Transmission of enteric non-A, non-B hepatitis virus in *Macaca mulatta* monkeys by intraportal route: subsequent passages of HEV virus. *J Gastroenterol Hepatol.* déc 1990;5(6):608-15.
190. Ticehurst J, Rhodes LL, Krawczynski K, Asher LV, Engler WF, Mensing TL, et al. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis.* mai 1992;165(5):835-45.
191. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Kapikian AZ, Ticehurst J, London W, et al. ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J Infect Dis.* août 1993;168(2):369-78.
192. Dähnert L, Eiden M, Schlosser J, Fast C, Schröder C, Lange E, et al. High sensitivity of domestic pigs to intravenous infection with HEV. *BMC Vet Res.* 4 déc 2018;14(1):381.
193. Debing Y, Mishra N, Verbeken E, Ramaekers K, Dallmeier K, Neyts J. A rat model for hepatitis E virus. *Dis Model Mech.* 01 2016;9(10):1203-10.
194. Liu B, Chen Y, Sun Y, Nan Y, Li H, Du T, et al. Experimental infection of rabbit with swine-derived hepatitis E virus genotype 4. *Vet Microbiol.* févr 2019;229:168-75.
195. Xia J, Liu L, Wang L, Zhang Y, Zeng H, Liu P, et al. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *J Viral Hepat.* oct 2015;22(10):850-7.
196. Li W, Sun Q, She R, Wang D, Duan X, Yin J, et al. Experimental infection of Mongolian gerbils by a genotype 4 strain of swine hepatitis E virus. *J Med Virol.* sept 2009;81(9):1591-6.
197. Russell WMS, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen and Co. L; 1959.
198. Prescott MJ. Ethics of primate use. *Adv Sci Res.* 12 nov 2010;5(1):11-22.
199. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance [Internet]. 276, 32010L0063 oct 20, 2010. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>
200. Kenney SP, Meng X-J. Hepatitis E Virus: Animal Models and Zoonosis. *Annu Rev Anim Biosci.* 15 févr 2019;7:427-48.
201. Pillot J, Sharma MD, Lazizi Y, Budkowska A, Dauguet C, Sarthou JL. Immunological Characterization of a Viral Agent Involved in Epidemic and Sporadic Non-A Non-B Hepatitis. In: Talwar GP, éditeur. *Progress in Vaccinology.* New York, NY: Springer New York; 1989. p. 101-11.
202. Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol.* juin 1997;35(6):1373-7.
203. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol.* mars 2007;88(Pt 3):903-11.

204. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, et al. Development and Characterization of a Genotype 4 Hepatitis E Virus Cell Culture System Using a HE-JF5/15F Strain Recovered from a Fulminant Hepatitis Patient. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2009;47(6):1906-10.
205. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis.* 1 sept 2005;192(5):930-3.
206. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, et al. 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.* févr 2012;157(2):235-46.
207. Jirintai S, Jinshan null, Tanggis null, Manglai D, Mulyanto null, Takahashi M, et al. 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.* déc 2012;170(1-2):126-37.
208. Jirintai S, Tanggis null, Mulyanto null, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, et al. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 24 juin 2014;185:92-102.
209. Wu X, Dao Thi VL, Liu P, Takacs CN, Xiang K, Andrus L, et al. Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication in Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. *Gastroenterology.* févr 2018;154(3):663-674.e7.
210. Kazachkov YA, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, Zamyatina NA, et al. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol.* 1 mars 1992;127(1):399-402.
211. Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, et al. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology.* 1 janv 1996;215(1):1-9.
212. Xu L, Wang W, Li Y, Zhou X, Yin Y, Wang Y, et al. RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology Baltim Md.* 2017;65(6):1823-39.
213. Huang R, Li D, Wei S, Li Q, Yuan X, Geng L, et al. Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol.* sept 1999;6(5):729-33.
214. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, Mather K, Torian U, Engle RE, 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.* mai 2012;86(10):5697-707.
215. Emerson SU, Zhang M, Meng XJ, Nguyen H, St Claire M, Govindarajan S, et al. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 déc 2001;98(26):15270-5.
216. Sridhar S. Use of S17 fragment containing hepatitis E virus infectious clones in cell culture experiments: The fine print does matter. *J Viral Hepat.* 2018;25(9):1105.
217. Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* août 1952;38(8):747-52.

218. Cooper PD. A method for producing plaques in agar suspensions of animal cells. *Virology*. nov 1955;1(4):397-401.
219. Pourianfar HR, Javadi A, Grollo L. A colorimetric-based accurate method for the determination of enterovirus 71 titer. *Indian J Virol Off Organ Indian Virol Soc*. déc 2012;23(3):303-10.
220. Taylor KL, Murphy PC, Asher LV, LeDuc JW, Lemon SM. Attenuation phenotype of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus (HM175/p16) in susceptible New World owl monkeys. *J Infect Dis*. sept 1993;168(3):592-601.
221. Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, et al. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol*. avr 1991;65(4):2056-65.
222. Pankraz A, Preis S, Thiel H-J, Gallei A, Becher P. A single point mutation in nonstructural protein NS2 of bovine viral diarrhea virus results in temperature-sensitive attenuation of viral cytopathogenicity. *J Virol*. déc 2009;83(23):12415-23.
223. Wang Y. Comparative study of different detection method on the virus titers. *J Appl Virol*. 9 juill 2013;2(3):6.
224. Karakus U, Cramer M, Lanz C, Yángüez E. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1836:59-88.
225. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Für Exp Pathol Pharmacol*. juill 1931;162(4):480-3.
226. REED LJ, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. mai 1938;493-497.
227. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 12 mai 2016;5(2):85-6.
228. Smither SJ, Lear-Rooney C, Biggins J, Pettitt J, Lever MS, Olinger GG. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *J Virol Methods*. nov 2013;193(2):565-71.
229. Shan L, Yang D, Wang D, Tian P. Comparison of cell-based and PCR-based assays as methods for measuring infectivity of Tulane virus. *J Virol Methods*. mai 2016;231:1-7.
230. Gustafsson RKL, Engdahl EE, Fogdell-Hahn A. Development and validation of a Q-PCR based TCID50 method for human herpesvirus 6. *Virol J*. 18 déc 2012;9:311.
231. Schemmerer M, Apelt S, Trojnar E, Ulrich RG, Wenzel JJ, Johne R. Enhanced Replication of Hepatitis E Virus Strain 47832c in an A549-Derived Subclonal Cell Line. *Viruses*. 29 sept 2016;8(10).
232. Schielke A, Filter M, Appel B, Johne R. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J*. 31 oct 2011;8:487.
233. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy J-M, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol*. mars 2012;50(3):897-902.

234. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. juill 2012;9(7):671-5.
235. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. janv 2006;34(1):75-83.
236. Nikolaou N, Green CJ, Gunn PJ, Hodson L, Tomlinson JW. Optimizing human hepatocyte models for metabolic phenotype and function: effects of treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Physiol Rep*. 2016;4(21).
237. Sainz B, Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol*. oct 2006;80(20):10253-7.
238. Qiao L, Sui J, Luo G. Robust Human and Murine Hepatocyte Culture Models of Hepatitis B Virus Infection and Replication. *J Virol*. 1 déc 2018;92(23).
239. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*. janv 1986;76(1):61-90.
240. Song YM, Song S-O, Jung Y-K, Kang E-S, Cha BS, Lee HC, et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. *Autophagy*. 1 juill 2012;8(7):1085-97.
241. Scholtissek C, Müller K. Effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on virus replication and maturation. *Arch Virol*. 1988;100(1-2):27-35.
242. Anderson DA, Grgacic EV, Luscombe CA, Gu X, Dixon R. Quantification of infectious duck hepatitis B virus by radioimmunofocus assay. *J Med Virol*. août 1997;52(4):354-61.
243. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 nov 2002;99(24):15655-60.
244. Liu C, Cai W, Yin X, Tang Z, Wen G, Ambardekar C, et al. An Optimized High-Throughput Neutralization Assay for Hepatitis E Virus (HEV) Involving Detection of Secreted Porf2. *Viruses*. 15 janv 2019;11(1).
245. Aghaie A, Pourfatollah AA, Bathaie SZ, Moazzeni SM, Khorsand Mohammad Pour H, Sharifi Z. Inactivation of virus in intravenous immunoglobulin G using solvent/detergent treatment and pasteurization. *Hum Antibodies*. 2008;17(3-4):79-84.
246. Dao Thi VL, Wu X, Rice CM. Stem Cell-Derived Culture Models of Hepatitis E Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 mars 2019;9(3).

Serment De Galien

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

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés
- D'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

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

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

Optimisation de la culture de virus de l'hépatite E et application à la quantification de l'infectiosité des particules virales infectieuses.

Le virus de l'hépatite E (HEV) est un enjeu important de santé publique dans le monde. L'infection par les génotypes 3, 4 et 7 du HEV peut entraîner une hépatite chronique tandis que l'infection par le génotype 1 peut déclencher une hépatite sévère chez les femmes enceintes. Le HEV existe sous deux formes chez son hôte, une forme nue dans les selles et une forme associée aux lipides dans le sang. Peu de méthodes existent pour propager efficacement le HEV en culture et mesurer l'infectiosité des souches cliniques *in vitro*.

Nous avons propagé l'infection de souches cliniques du HEV jusque-là difficilement cultivables en incubant les inocula sur des cellules HepG2/C3A pendant 6h à 35°C dans un milieu contenant du DMSO. Ces conditions de culture ont permis d'améliorer les performances de la technique de quantification de l'infectiosité basée sur une culture en dilution limite avec calcul de la TCID50 [*tissue culture infectious dose 50*]. Nous avons quantifié l'infectiosité de souches cliniques du HEV à partir de différents échantillons biologiques. Dans un système de culture d'hépatocytes polarisés en culture, nous avons montré que les particules virales infectieuses sont préférentiellement libérées au pôle biliaire.

Notre technique de culture et de TCID50 pourrait avoir un impact direct sur la sécurité sanitaire grâce à la comparaison de l'infectiosité des particules virales du HEV de différents génotypes et de différentes matrices biologiques. Elle permettra d'évaluer les conditions de désactivation des particules virales dans différentes matrices comme les produits issus des dons sanguins ou les denrées alimentaires.

Mots-clés : Virus de l'hépatite E, culture virale, infectiosité, TCID50

Optimization of hepatitis E virus propagation and application to the quantification of infectivity of viral particles.

Hepatitis E virus (HEV) is a major concern in public health worldwide. Infection with HEV genotype 3, 4 and 7 can lead to chronic hepatitis while infection with genotype 1 can trigger severe hepatitis in pregnant women. A lipid-associated form in blood and a naked form in stools coexist in the host. Methods to spread efficiently both forms of HEV in culture and to evaluate infectivity of HEV clinical strains *in vitro* are still lacking.

Incubation of inocula on HepG2/C3A cells for 6 hours at 35°C in a medium containing DMSO allowed us spreading infection of HEV clinical strains until now not cultivable. These culture conditions allowed us improving the performance of our method of quantification of HEV infectivity, based on an endpoint dilution with the calculation of the tissue culture infectious dose 50 (TCID50). We quantified the infectivity of clinical strains from different biological samples. In a system of culture of *in vitro* polarized hepatocytes, we showed that infectious viral particles were preferentially released to the bile side.

This culture method and TCID50 technique could have a direct impact in health safety through clinical strains comparison. These advances it will allow determining conditions for neutralizing viral particles infectivity in different matrices such as blood products or foodstuffs.

Keywords: Hepatitis E virus, viral culture, infectivity, TCID50

