



HAL
open science

Virus de l'hépatite E : mise en place du diagnostic moléculaire au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble : études de prévalence chez les patients co-infectés VIH-VHC et les transplantés hépatiques

Stéphanie Gaillard

► To cite this version:

Stéphanie Gaillard. Virus de l'hépatite E : mise en place du diagnostic moléculaire au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble : études de prévalence chez les patients co-infectés VIH-VHC et les transplantés hépatiques. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00639301

HAL Id: dumas-00639301

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00639301v1>

Submitted on 8 Nov 2011

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2011

N°

Virus de l'hépatite E: Mise en place du diagnostic moléculaire au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble. Etudes de prévalence chez les patients co-infectés VIH-VHC et les transplantés hépatiques

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présentée à la faculté de médecine de GRENOBLE
Et soutenue publiquement le 31 octobre 2011
Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MEDECINE

Par : GAILLARD Stéphanie
Née le 22 octobre 1974 à Saint Rémy (71)

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président : Monsieur le Professeur P. MORAND

Membres : Monsieur le Professeur V. Leroy
Madame le Docteur N. Sturm
Madame le Docteur S. Larrat

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier 2011-2012

Nom	Prénom	Intitulé de la discipline universitaire
ALBALADEJO	Pierre	Anesthésiologie-réanimation
ARVIEUX-BARTHELEMY	Catherine	Chirurgie générale
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
BAGUET	Jean-Philippe	Cardiologie
BALOSSO	Jacques	Radiothérapie
BARRET	Luc	Médecine légale et droit de la santé
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et imagerie médicale
BEANI	Jean-Claude	Dermato-vénéréologie
BENHAMOU	Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
BERGER	François	Biologie cellulaire
BLIN	Dominique	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BOLLA	Michel	Cancérologie; radiothérapie
BONAZ	Bruno	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie
BOSSON	Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie
BRICAULT	Ivan	Radiologie et imagerie médicale
BRICHON	Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BRIX	Muriel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CAHN	Jean-Yves	Hématologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique; médecine d'urgence
CARPENTIER	Patrick	Chirurgie vasculaire; médecine vasculaire
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie
CHABARDES	Stephan	Neurochirurgie
CHABRE	Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
CHAFFANJON	Philippe	Anatomie
CHAVANON	Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CHIQUET	Christophe	Ophtalmologie

CHIROSSEL	Jean-Paul	Anatomie
CINQUIN	Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
COHEN	Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
COUTURIER	Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
CRACOWSKI	Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale; pharmacologie clinique
DE GAUDEMARIS	Régis	Médecine et santé au travail
DEBILLON	Thierry	Pédiatrie
DEMATTEIS	Maurice	Addictologie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie
ESTEVE	François	Biophysique et médecine nucléaire
FAGRET	Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
FAUCHERON	Jean-Luc	Chirurgie générale
FERRETTI	Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie
FONTAINE	Eric	Nutrition
FRANCOIS	Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GARBAN	Frédéric	Hématologie; transfusion
GAUDIN	Philippe	Rhumatologie
GAVAZZI	Gaetan	Gériatrie et biologie du vieillissement
GAY	Emmanuel	Neurochirurgie
GRIFFET	Jacques	Chirurgie infantile
HALIMI	Serge	Nutrition
HOMMEL	Marc	Neurologie
JOUK	Pierre-Simon	Génétique
JUVIN	Robert	Rhumatologie
KAHANE	Philippe	Physiologie
KRACK	Paul	Neurologie
KRAINIK	Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
LANTUEJOUL	Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
LEBAS	Jean-François	Biophysique et médecine nucléaire
LEBEAU	Jacques	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECCIA	Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
LEROUX	Dominique	Génétique

LEROY	Vincent	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie
LETOUBLON	Christian	Chirurgie générale
LEVY	Patrick	Physiologie
LUNARDI	Joël	Biochimie et biologie moléculaire
MACHECOURT	Jacques	Cardiologie
MAGNE	Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MAITRE	Anne	Médecine et santé au travail
MAURIN	Max	Bactériologie-virologie
MERLOZ	Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
MORAND	Patrice	Bactériologie-virologie
MORO-SIBILOT	Denis	Pneumologie
MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
MOUTET	François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique; brûlogie
PALOMBI	Olivier	Anatomie
PASSAGIA	Jean-Guy	Anatomie
PAYEN DE LA GARANDERIE	Jean-François	Anesthésiologie-réanimation
PELLOUX	Hervé	Parasitologie et mycologie
PEPIN	Jean-Louis	Physiologie
PERENNOU	Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PERNOD	Gilles	Médecine vasculaire
PIOLAT	Christian	Chirurgie infantile
PISON	Christophe	Pneumologie
PLANTAZ	Dominique	Pédiatrie
POLACK	Benoît	Hématologie
PONS	Jean-Claude	Gynécologie-obstétrique
RAMBEAUD	Jean-Jacques	Urologie
REYT	Emile	Oto-rhino-laryngologie
RIGHINI	Christian	Oto-rhino-laryngologie
ROMANET	Jean-Paul	Ophtalmologie
SARAGAGLIA	Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologique
SCHMERBER	Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
SELE	Bernard	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SERGENT	Fabrice	Gynécologie-obstétrique
SESSA	Carmine	Chirurgie vasculaire

STAHL	Jean-Paul	Maladies infectueuses; maladies tropicales
STANKE	Françoise	Pharmacologie fondamentale
TIMSIT	Jean-François	Réanimation
TONETTI	Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologique
TOUSSAINT	Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
VANZETTO	Gérald	Cardiologie
VUILLEZ	Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
WEIL	Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
ZAOUI	Philippe	Néphrologie
ZARSKI	Jean-Pierre	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie

Service du Personnel Site Santé

Mis à jour le 01 octobre 2011

**Maître de Conférence des Universités - Praticien
Hospitalier 2011-2012**

Nom	Prénom	Intitulé de la discipline universitaire
BONNETERRE	Vincent	Médecine et santé au travail
BOTTARI	Serge	Biologie cellulaire
BOUTONNAT	Jean	Cytologie et histologie
BRENIER-PINCHART	Marie-Pierre	Parasitologie et mycologie
BRIOT	Raphaël	Thérapeutique; médecine d'urgence
CALLANAN-WILSON	Mary	Hématologie; transfusion
CROIZE	Jacques	Bactériologie-virologie
DERANSART	Colin	Physiologie
DETANTE	Olivier	Neurologie
DUMESTRE-PERARD	Chantal	Immunologie
EYSSERIC	Hélène	Médecine légale et droit de la santé
FAURE	Julien	Biochimie et biologie moléculaire
GILLOIS	Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
GRAND	Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
HENNEBICQ	Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
HOFFMANN	Pascale	Gynécologie-obstétrique
LABARERE	José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
LAPORTE	François	Biochimie et biologie moléculaire
LARDY	Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
LARRAT	Sylvie	Bactériologie-virologie
LAUNOIS-ROLLINAT	Sandrine	Physiologie
MALLARET	Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention

MAUBON	Danièle	Parasitologie et mycologie
MC LEER (FLORIN)	Anne	Cytologie et histologie
MOREAU-GAUDRY	Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MOUCHET	Patrick	Physiologie
PACLET	Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PASQUIER	Dominique	Anatomie et cytologie pathologiques
PAYSANT	François	Médecine légale et droit de la santé
PELLETIER	Laurent	Biologie cellulaire
RAY	Pierre	Génétique
RIALLE	Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
SATRE	Véronique	Génétique
STASIA	Marie-Josée	Biochimie et biologie moléculaire
TAMISIER	Renaud	Physiologie

*Service du Personnel Site Santé
octobre 2011*

Mis à jour le 01

REMERCIEMENTS :

Je remercie Monsieur le Professeur P. Morand de m'avoir accueillie et encadrée dans son laboratoire de virologie pendant mon internat. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie Monsieur le Professeur V. Leroy pour sa contribution à ce mémoire et pour m'avoir fait l'honneur d'être un des membres de ce jury.

Je remercie Madame le Docteur S. Larrat de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je la remercie sincèrement pour son professionnalisme, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils, son soutien, ses encouragements permanents et sa patience. Je l'assure de mon profond respect et lui témoigne toute ma gratitude.

Je remercie Madame le Docteur N. Sturm pour son précieux concours, son enthousiasme à partager ses connaissances, sa disponibilité ainsi que sa participation à ce jury.

Je remercie Madame le Docteur M.N. Hilleret pour sa disponibilité ainsi que sa participation à ce travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire de virologie du CHU de Grenoble pour leur accueil chaleureux et leur accompagnement technique.

Je remercie les internes de Grenoble pour leur collaboration cordiale tout au long de ces 4 années. Un grand merci à Muriel pour ses encouragements et son aide efficace. Merci également à Laetitia, Cécile et Bérangère pour leurs gentillesse et attentions.

De façon plus personnelle, je remercie ma famille, et plus particulièrement mes parents, pour leur soutien constant pendant toutes ces années d'études. Je remercie Baptiste, mon frère, et Mélanie, sa compagne, pour leurs encouragements, leurs disponibilités et aides sans oublier Camille, ma nièce, pour l'animation de cette rédaction par ses « pestacles ».

Je remercie également mes amis Eléonore, Cécile, Laurence, JP et tout particulièrement « la Steph » pour leurs soutiens tout au long de ces 10 ans.

SOMMAIRE

TABLES DES ILLUSTRATIONS	12
Listes des figures.....	12
Listes des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	14
1 Introduction	15
1.1 Caractéristiques du virus.....	15
1.1.1 Historique	15
1.1.2 Taxonomie et structure.....	16
1.1.3 Caractéristiques physicochimiques	16
1.1.4 Organisation génomique	17
1.1.5 Cycle de réplication.....	18
1.1.6 Diversité	20
1.1.7 Pouvoir pathogène.....	21
1.2 Epidémiologie.....	22
1.2.1 Pays à faible niveau d'hygiène.....	22
1.2.2 Pays développés	24
1.2.2.1 Données épidémiologiques	24
1.2.2.2 Hypothèse zoonotique.....	26
1.2.2.3 Autres modes de transmission	27
1.2.2.4 Réservoir	29
1.3 Clinique.....	29
1.4 Traitement et prophylaxie	31
1.5 Diagnostic biologique	32
1.5.1 Evolution des marqueurs diagnostiques	33
1.5.2 Diagnostic sérologique	34
1.5.3 Biologie moléculaire	37
2 Objectifs.....	40
3 Matériel et méthodes	42
3.1 Diagnostic sérologique du VHE.....	42
3.2 Diagnostic moléculaire de l'ARN du VHE par RT-PCR temps réel	43
3.2.1 Extraction de l'ARN du VHE	43

3.2.2	Amorces et sonde utilisées	43
3.2.3	Gamme de quantification	44
3.2.4	RT-PCR temps réel du virus de l'hépatite E	44
3.2.5	Techniques complémentaires utilisées	46
3.3	Evaluation des caractéristiques de la RT-PCR temps réel	46
3.3.1	Choix de la technique et spécificité des amorces et de la sonde	46
3.3.2	Validation de la technique	47
3.3.2.1	Efficacité d'amplification (E)	47
3.3.2.2	Linéarité et limite de détection	47
3.3.2.3	Répétabilité	48
3.3.2.4	Reproductibilité.....	48
3.4	Caractéristiques des 2 populations	48
3.4.1	Patients co-infectés VIH-VHC	48
3.4.2	Patients transplantés hépatiques (TH)	48
3.4.3	Analyse statistique.....	49
4	Résultats	50
4.1	Evaluation des caractéristiques de la RT-PCR temps réel	50
4.1.1	Choix de la technique et spécificité des amorces et de la sonde	50
4.1.1.1	Emplacement des amorces et sondes	50
4.1.1.2	Spécificité des amorces et sonde.....	51
4.1.2	Validation de la technique	53
4.1.2.1	Efficacité de l'amplification	53
4.1.2.2	Linéarité et limite de détection	53
4.1.2.3	Répétabilité	54
4.1.2.4	Reproductibilité.....	55
4.2	Etudes cliniques	55
4.2.1	Population de co-infectés VIH-VHC RIBAVIC	55
4.2.1.1	Caractéristiques de la population	55
4.2.1.2	Résultats sérologiques et moléculaires pour le VHE	58
4.2.2	Patients transplantés hépatiques	60
4.2.2.1	Caractéristiques de la population	60
4.2.2.2	Séroprévalence pour le VHE de la population témoin.....	62
4.2.2.3	Marqueurs sérologiques et moléculaires du VHE en pré et post-transplantation	62

4.2.2.4	Séroprévalence pour le VHE des transplantés hépatiques	63
4.2.2.5	Recherche de cas de réactivations et d'infections virales E chez les transplantés hépatiques.....	65
4.2.2.6	Cas cliniques	66
5	Discussion	74
6	Conclusion	81
	BIBLIOGRAPHIE	83
	ANNEXES	92
	SERMENT D'HYPPOCRATE	96

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite E. ...	17
Figure 2 : Cycle de réplication du VHE.	19
Figure 3: Distribution mondiale des cas d'hépatites E.	23
Figure 4 : Voies de contamination par le VHE.	28
Figure 5: Forme classique d'hépatite E aiguë sporadique autochtone.	30
Figure 6: Hépatite E chronique chez un patient transplanté.	31
Figure 7 : Représentation schématique de l'évolution des marqueurs biologiques lors d'une infection virale E. (extrait de Dalton <i>et al.</i> [51]).....	33
Figure 8 : Alignement des séquences correspondant à l'ORF3 du VHE pour différents génotypes.....	50
Figure 9 : Courbes d'amplification des différents sérums disponibles au laboratoire.	51
Figure 10 : Exemple des premiers résultats du BLAST de l'amorce sens.	52
Figure 11 : Exemple d'amplification de la gamme de quantification.	53
Figure 12 : Evolution des marqueurs sérologiques du virus de l'hépatite en pré et post-transplantation.	66
Figure 13 : Cas clinique 1 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.....	68
Figure 14 : Cas Clinique 1 : Lésions histologiques présentes en septembre 2009.....	68
Figure 15 : Cas Clinique 1 : Lésions histologiques présentes en septembre 2009.....	69
Figure 16 : Cas clinique 2 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.....	70
Figure 17 : Cas Clinique 2 : Lésions histologiques présentes en juillet 2010.....	71
Figure 18 : Cas Clinique 2 : Lésions histologiques présentes en juillet 2010.....	71
Figure 19 : Cas clinique 3 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.....	72
Figure 20 : Cas clinique 3 : Lésions histologiques présentes en mai 2006.....	73
Figure 21 : Cas clinique 3 : Lésions histologiques présentes en mai 2006.....	73

Listes des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques et performances des kits commerciaux disponibles en France.	35
Tableau 2: Principales caractéristiques des techniques de RT-PCR temps-réel décrites dans la littérature.	37
Tableau 3 : Séquences et caractéristiques des amorces et de la sonde utilisées.....	44
Tableau 4 : Mix de RT-PCR temps-réel pour le VHE grâce au kit Superscript III platinum® One-Step qRT-PCR.....	45
Tableau 5 : Programme d'amplification du VHE sur Smart Cycler®.	45
Tableau 6 : Evaluation de la spécificité de la technique de RT-PCR temps-réel pour le VHE. ...	52
Tableau 7 : Linéarité de la technique et seuil de quantification.....	54
Tableau 8 : Limite de détection de la technique.....	54
Tableau 9 : Répétabilité de la technique.	55
Tableau 10 : Reproductibilité de la technique.....	55
Tableau 11 : Démographie des 111 patients issus de la cohorte ANRS HC02 RIBAVIC, France, 2000-2002 testés pour le VHE.	56
Tableau 12 : Données cliniques et biologiques des 111 patients co-infectés VIH-VHC lors de leurs inclusions dans le protocole thérapeutique ANRS-HC02-RIBAVIC.	57
Tableau 13 : Résultats sérologiques et moléculaires en VHE des patients issus de la cohorte ANRS-HC02-RIBAVIC à J0.	59
Tableau 14 : Données épidémiologiques et cliniques des transplantés hépatiques testés suivis au CHU de Grenoble en pré et post-transplantation.	61
Tableau 15 : Marqueurs sérologiques pour le VHE chez les transplantés hépatiques en pré et post-transplantation.	63
Tableau 16 : Données de séroprévalence selon les informations démographiques et cliniques recueillies parmi la population des transplantés hépatiques du CHU de Grenoble en pré et post-transplantation.	64

Liste des abréviations

AA : acides aminés

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ALAT : alanine aminotransférase

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CMV: cytomégalovirus

CNR : Centre National de Référence

Ct : cycle seuil

DO : densité optique

E: efficacité

EBV: virus Epstein-Barr

ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase

GGT : gamma-glutamyl transpeptidase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Ig : immunoglobuline

IQR : Interquartile range

MAI : maladie auto-immune

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ORF : open reading frame : cadre de lecture ouvert

PBH : ponction biopsie hépatique

Post-T: post-transplantation

Pré-T: pré-transplantation

RT-PCR: rétrotranscription de l'ARN viral en AND puis réaction de polymérisation en chaîne

SDF: Sans Domicile fixe

TH: transplanté hépatique

T_m : température de fusion

TMB : tétra-méthyl-benzidine

VHA : virus de l'hépatite A

VHB: virus de l'hépatite b

VHC: virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

1 Introduction

Après un bref rappel des caractéristiques du virus de l'hépatite E (VHE) et de sa pathogénicité, seront présentées les principales données épidémiologiques dans les pays à faible niveau d'hygiène puis dans les pays industrialisés. Le caractère zoonotique du virus, plus récemment mis en évidence, sera abordé parmi les différents modes de transmission du virus en zone non endémique. Nous évoquerons ensuite les manifestations cliniques de l'hépatite aiguë virale E puis sa forme chronique rencontrée chez certains patients immunodéprimés. Enfin, nous aborderons le diagnostic biologique de cette pathologie « émergente » en France afin d'en venir à la partie expérimentale de ce travail de thèse qui a consisté à la mise en place du diagnostic moléculaire du VHE au laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble.

1.1 Caractéristiques du virus

1.1.1 Historique

C'est en 1980 que Khuroo *et al.* ont suspecté pour la première fois le VHE d'être l'agent responsable d'hépatites aiguës à transmission féco-orale, dites non A non-B, lors d'une épidémie dans la vallée du Kashmir en Inde survenue entre novembre 1978 et avril 1979 [1]. D'autres épidémies d'hépatites aiguës d'origine hydrique non-A non-B ont ensuite été décrites en Inde, au Népal et en Afrique [2]. C'est Balayan *et al.*, virologue russe, qui identifia le nouveau virus en 1983 en développant la maladie après auto-inoculation orale d'extraits de selles poolés contaminées. L'infection a ensuite été reproduite chez des primates cynomolgus [3]. Le clonage partiel du virus, alors nommé virus de l'hépatite E, a été réalisé par Reyes *et al.* en 1990 [4] suivi par la caractérisation moléculaire du génome entier de la souche prototype Burma en 1991 par Tam *et al.* [5] puis de la souche prototype Mexico par Huang *et al.* l'année suivante [6].

Des études rétrospectives ont montré qu'une des premières épidémies d'hépatites E d'origine hydrique était survenue dans les années 1955-1956 à New Delhi en Inde [7] mais il semblerait que le virus, à l'origine de formes endémo-épidémiques, ait été présent de manière plus ancienne [8].

Le caractère autochtone de l'infection et le potentiel zoonotique du virus ont été suspectés dans les années 1990 dans les pays développés suite à l'identification de la première souche animale du VHE chez le porc par Meng *et al.* en 1997 [9] et par la description concomitante de souches génétiquement proches liées à de rares cas autochtones aux USA [10].

1.1.2 Taxonomie et structure

Le VHE a été classé initialement dans la famille des *Caliciviridae* sur la base de similarités morphologiques et d'organisation génomique [11]. Suite à des analyses phylogéniques, le virus est classé depuis 2004 dans la famille des *Hepeviridae*, genre *hepevirus* dont il est actuellement le seul représentant. Différentes espèces sont présentes chez les mammifères et sont regroupées en 4 génotypes majeurs. Un 5^{ème} génotype a été isolé chez les oiseaux et constitue une espèce aviaire qui pourrait subir des modifications de taxonomie [12].

Le virus correspond à une petite structure sphérique, de 27 à 33 nm de diamètre, non enveloppée. Il est constitué d'une capsidie icosahédrique renfermant un ARN monocaténaire de polarité positive d'une longueur d'environ 7,2 kilobases. Un seul sérotype est décrit [13].

1.1.3 Caractéristiques physicochimiques

Le virus est relativement résistant dans le milieu extérieur comme tous les virus entériques non enveloppés. De par sa transmission oro-fécale, il peut résister à l'acidité gastrique et aux sels biliaires pour survivre dans le milieu intestinal et est détecté dans les eaux usées. *In vitro*, il est sensible à la chaleur (autoclavage à 120°), aux désinfectants habituellement utilisés dans l'inactivation des virus entériques (hypochlorite de sodium pour le traitement de l'eau, glutaraldéhyde pour la désinfection des surfaces) malgré une baisse significative de leurs efficacités en présence de matières organiques. La température de conservation du virus recommandée est de -80°C sachant qu'il a pu être détecté sur des échantillons conservés à -20°C après plus de 10 ans [13].

1.1.4 Organisation génomique

Le génome à ARN monocaténaire de 7,2 kilo-bases en moyenne est constitué de 3 cadres de lecture partiellement chevauchants nommés ORF1, ORF2, ORF3. Il est encadré par 2 courtes séquences non codantes, de 27 à 32 nucléotides à l'extrémité 5' (coté ORF1) et de 65 à 74 bases à son extrémité 3' (côté ORF2), probablement impliquées dans la régulation de la traduction et répllication virale [5]. L'ARN est coiffé en 5'. Cette région aurait un rôle dans l'initiation de la répllication virale [14]. L'ARN se termine en 3' par une queue polyadénylée de longueur variable [13]. La mise en évidence d'un ARN subgénomique bicistronique codant l'ORF2 et l'ORF3 *in vitro* [15], puis sur un modèle du porc [16], montre que l'ORF3 chevauche l'ORF 2 mais ni l'ORF2 et l'ORF3 ne chevauchent l'ORF1 [11]. Les principales régions géniques du virus sont présentées sur la figure 1.

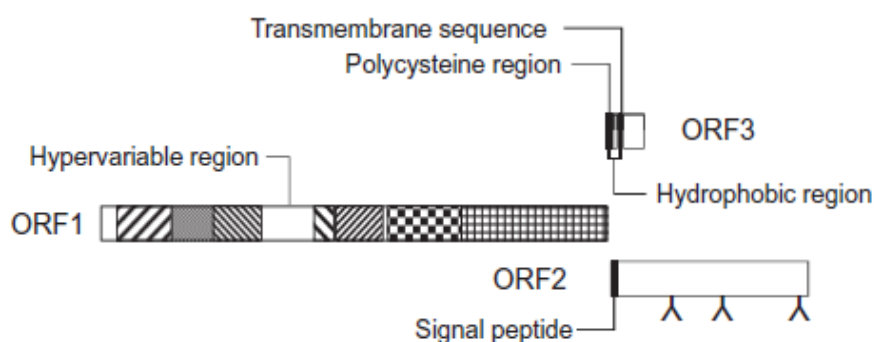


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite E. Représentation des 3 cadres de lecture ORF1, 2 et 3 ainsi que les différents domaines : méthyltransférase [hachuré], domaine Y [noir], cystéineprotéase [rayures], proline [points], domaine X [carreaux], hélicase [damier], polymérase [quadrillage], sites glycosylés [triangles]. (extrait de Aggarwal *et al* [2])

Le cadre de lecture ORF1 localisé à l'extrémité 5' représente environ 5000 bases soit les 2/3 du génome. Il code une polyprotéine non structurale de 186 KDa impliquée dans la répllication du virus. Plusieurs domaines fonctionnels conservés ont été identifiés dont une méthyltransférase, une hélicase, une cystéine protéase et l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus [17]. Deux structures de type «stem-loop», localisées au niveau de la région non codante en 3' et de la queue poly-A, permettent une liaison spécifique de la polymérase au génome viral [18]. Le complexe de répllication virale pourrait interagir au niveau du réticulum endoplasmique [19]. La région hyper variable serait impliquée au niveau de l'efficacité de la répllication virale [20]. Le domaine X possède une activité ADP-Ribose-Phosphatase. Le

domaine Y est de fonction inconnue. Les mécanismes traductionnels et de maturation de l'ORF1 sont peu connus [11, 21].

Le cadre de lecture de l'ORF2 situé à l'extrémité 3', d'une longueur de 2000 bases approximativement, code pour la protéine de capsid de 660 amino-acides (71 kDa). Il contient un peptide signal pour le réticulum endoplasmique et probablement 3 sites N-glycosylés impliqués dans l'infectivité du virus [22, 23]. La protéine de capsid interagit avec l'extrémité 5' du génome viral dans le processus d'encapsidation [24]. La protéine contient plusieurs sites immunogènes et d'épitopes neutralisants [25].

L'ORF3 contient environ 370 bases. Elle code une phosphoprotéine variable de 123 acides aminés (13 kDa) associée au cytosquelette [13]. Elle est essentielle pour l'infectivité du virus *in vivo* chez l'animal mais pas *in vitro* [21]. Elle posséderait des fonctions dans la morphogénèse et pathogénèse du virus avec un rôle possible dans:

- l'assemblage des virions en se liant avec l'ARN viral et la protéine de capsid [26],
- l'excrétion des virions en étant présente à la surface des virions associée à des lipides [27],
- la régulation de l'expression génique virale [28],
- la régulation de la machinerie cellulaire en favorisant la survie cellulaire et en diminuant la réponse immune de l'hôte [29, 30].

1.1.5 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du virus a été établi à partir de modèles expérimentaux chez les primates (macaques et chimpanzés), complétés chez le porc, à partir de la propagation du virus sur des hépatocytes primaires [13]. Il est similaire au modèle attribué aux virus à ARN de polarité positive [31]. Les principales étapes de réplication virale sont présentées sur la figure 2. Le virus se réplique dans le cytoplasme des hépatocytes. Les virions néoformés sont excrétés dans les canaux biliaires puis dans les selles.

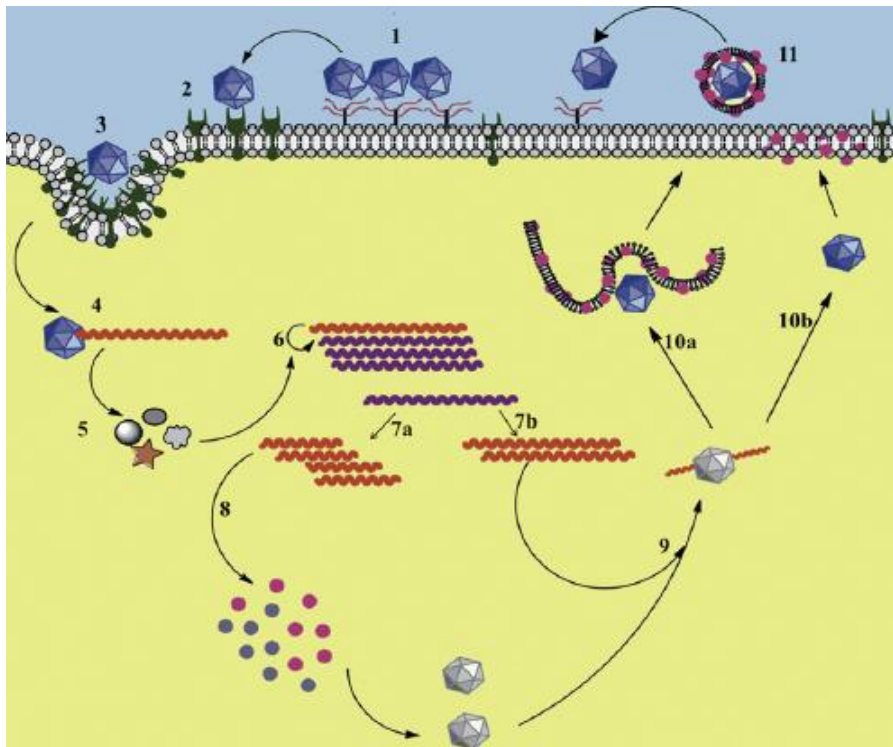


Figure 2 : Cycle de réplication du VHE.

1 : Ralentissement des virions via des protéoglycanes, 2 : Attachement du virus, 3 : Internalisation, 4 : Décapsidation, 5 : Traduction des protéines non structurales, 6 : Synthèse de brins d'ARN négatifs, 7a,b : Synthèse d'ARN positifs subgénomiques, 8 : Synthèse des protéines structurales, 9 : Assemblage des virions, 10a,b : Excrétion des virions impliquant la protéine ORF3, 11 : Maturation virale extra-cellulaire. (extrait de Ahmad *et al.* [31])

Les mécanismes d'attachement cellulaire et d'entrée du virus sont peu connus. Actuellement, aucune interaction avec un récepteur cellulaire n'a été décrite [11]. La production de pseudo-particules virales (VLP : virus-like particles) dans le système baculovirus a permis des avancées concernant la compréhension des mécanismes cellulaires impliquant la capsid virale notamment lors de son interaction avec la cellule hôte. Une analyse cristallographique a pu mettre en évidence un domaine E2s (AA 455-602 de l'ORF2) qui serait nécessaire à l'attachement cellulaire du virus. Ces avancées ont également des implications concernant l'immunogénicité du virus [32].

D'autres sites de réplication du virus ont été mis en évidence par la détection de brins d'ARN subgénomiques au niveau de l'intestin grêle, du côlon et des tissus lymphatiques [33]. Le virus a été détecté au niveau des cellules mononucléées du sang sans marqueur de réplication [34].

1.1.6 Diversité

Plusieurs schémas de classification ont été proposés depuis 1999 mais la classification couramment admise permet de regrouper les souches du virus en 4 génotypes impliqués en clinique humaine. Elle se base sur l'analyse complète du génome et/ou une large portion de 371 bases de l'ORF1, concernant les nucléotides 80 à 450, qui est corrélée à l'analyse faite sur l'ensemble du génome [35].

Ces 4 génotypes se différencient par leur répartition géographique et leur spectre d'hôte.

Le génotype 1 a été isolé lors d'épidémies ou de cas sporadiques chez l'homme dans les régions tropicales et subtropicales en Afrique et en Asie où le virus est connu pour être endémique. Le génotype 2, isolé initialement au cours d'une épidémie à Mexico, a été décrit en Afrique de l'Est (Nigéria, Tchad, Namibie). Le génotype 3, mis en évidence initialement lors cas autochtones aux USA, a été retrouvé depuis dans de nombreux pays industrialisés en Europe (Royaume-Uni, France, Pays-Bas, Espagne, Autriche, Grèce, Italie), au Japon, Australie, Nouvelle-Zélande. Le génotype 4 a été isolé de cas sporadiques en Chine, Taiwan, Japon et Vietnam [2].

Les génotypes 1 et 2 sont considérés comme strictement humains. A ce jour, aucune souche de ces 2 génotypes n'a été identifiée formellement chez le porc hormis une souche de génotype 1 « like » amplifiée à partir d'un cochon au Cambodge [21]. A l'inverse, les génotypes 3 et 4 ont été caractérisés chez l'homme mais également dans le règne animal, principalement chez le porc. Le génotype prédominant chez le porc est généralement celui impliqué dans la majorité des cas humains de la même région à l'exception de l'Inde où les génotypes porcins sont de type 4 alors que les cas rapportés sont issus du génotype 1 [2].

Les différents sous-types, 24 au total, reposent sur la classification de Lu *et al.* 2006 après analyse génétique de 421 souches [36]. Le génotype 3f prédomine en France [13]. D'autres sous-types du génotypes 3 prédominent dans différentes régions du globe [37].

La diversité génétique du virus a été évoquée dès l'identification des 2 premières souches prototypes d'origine humaine. Des analyses phylogéniques ont montré un important polymorphisme génétique lié à des mutations ponctuelles ou à des insertions-délétions [38]. L'analyse de séquences nucléotidiques du génome entier montre une variation inter-génotype de 22,1 à 26,7%. Les génotypes 3 et 4 sont les plus hétérogènes [36, 39]. L'une des hypothèses émise repose sur une répllication virale « à bas bruit » dans le réservoir animal sauvage et domestique [40].

Plusieurs nouveaux variants ont été rapportés chez le lapin, le rat, le sanglier [12, 41].

L'existence de quasi-espèces a également été démontrée et pourrait être associée à une pathogénicité plus forte [42, 43].

Le génotype aviaire (5^{ème} génotype), identifié en 2001 aux USA est responsable d'hépatomégalie chez le poulet. Il se différencie par un génome plus court de 6,6 Kb et une homologie réduite de 50% avec les souches de mammifères. Cette souche aviaire n'est pas transmissible au primate ni au porc [11].

1.1.7 Pouvoir pathogène

Les mécanismes impliqués dans la pathogénicité du VHE sont mal caractérisés. Il semble que les dommages causés par le virus soit plus le fait d'une réponse immunitaire cytotoxique qu'un effet cytopathogène direct du virus. En effet, la virémie précède de plusieurs jours les manifestations biochimiques et histopathologiques [44] et il n'existe pas de preuve d'un effet cytopathogène direct du virus [11].

Une réponse immune innée a été montrée en cas d'infection aiguë impliquant notamment les cellules natural killer et natural killerT [45]. Une réponse cellulaire adaptative a été mise en évidence par Srivastava *et al.* 2007 [46] avec une expansion des cellules CD4 en comparaison avec un groupe contrôle. La faible réponse immune périphérique observée serait liée à la migration et à la séquestration des cellules immunes au niveau hépatique [29]. L'étude par immunochimie de biopsies hépatiques a montré localement une infiltration prédominante de CD8 activés contenant des granzymes [47]. L'immunité humorale est également impliquée dans l'éradication du virus [48, 49].

Les facteurs intervenant dans la pathogénèse, liés à l'hôte ou au virus sont mal connus. Concernant les facteurs liés à l'hôte, plusieurs sont mis communément en avant dont la grossesse, l'âge, une hépatopathie chronique et un contexte d'immunodépression [11, 39]. Concernant les facteurs liés au virus, selon des observations épidémiologiques, cliniques et expérimentales, les génotypes 1 et 2 seraient plus virulents que les génotypes 3 et 4 [8, 50, 51]. Le génotype 4 semble néanmoins lié à des manifestations plus sévères que le 3 [39]. Des études expérimentales chez le primate ont montré que la présentation clinique de la maladie était dose-dépendante [52].

1.2 Epidémiologie

Plusieurs voies de contamination par le VHE sont maintenant connues. Les voies de transmission possibles sont 1) la voie féco-orale liée à une consommation d'eau ou d'aliments souillés 2) la voie alimentaire par ingestion de produits issus d'animaux contaminés 3) le contact avec des animaux infectés 4) la voie parentérale par transfusion 5) la voie materno-fœtale. La transmission oro-fécale liée majoritairement au péril fécal sévit dans les pays en voie de développement où les conditions sanitaires sont mauvaises. Les cas de transmission liés au réservoir animal sont davantage attribués aux pays industrialisés. On différencie ainsi 2 profils épidémiologiques dans le monde selon le niveau d'endémicité du virus associés chacun à leurs principaux modes de transmission. Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et génotypiques sont distinctes [53].

1.2.1 Pays à faible niveau d'hygiène

Le virus constitue un problème majeur de santé publique dans ces pays où il serait responsable de plus de 50% des cas d'hépatites aiguës virales [51]. On estime qu'un tiers de la population mondiale a été infectée par le VHE principalement en Asie, Afrique, Proche-Orient et Amérique centrale. En Inde, le VHE serait responsable de 2,2 millions d'hépatites aiguës par an [54]. Les régions à forte endémicité pour le VHE sont représentées sur la figure 3. Le virus y est à l'origine d'épidémies et de cas sporadiques. Le génotype principalement impliqué est le 1 [55].

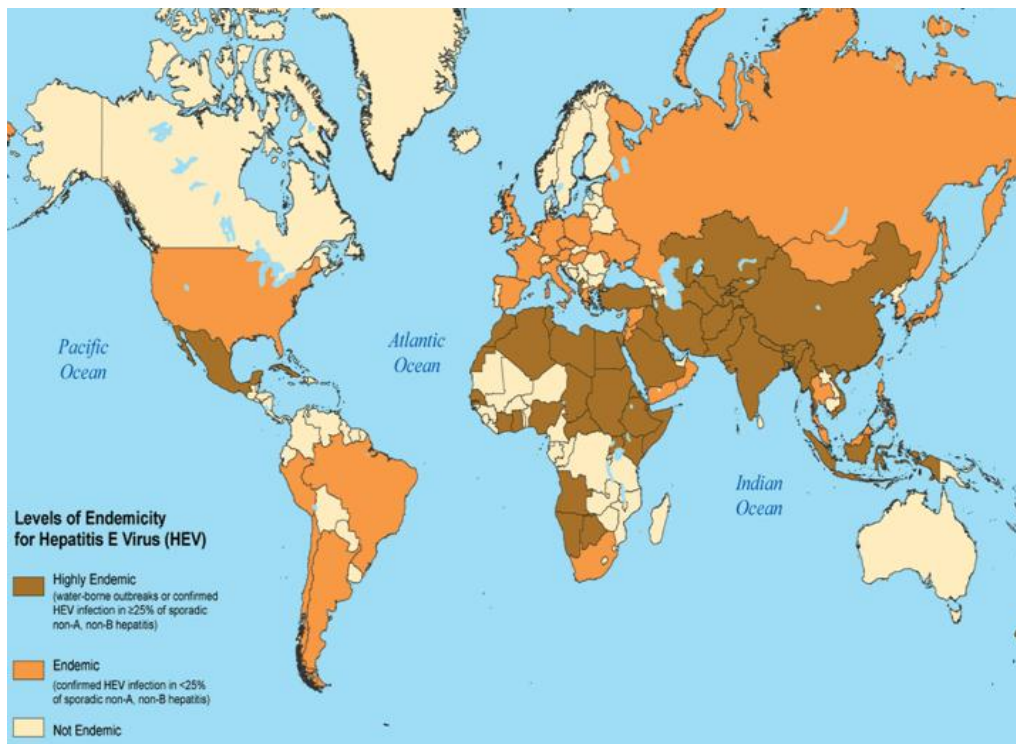


Figure 3: Distribution mondiale des cas d'hépatites E. (extrait de Teshale *et al.* [55])

Les épidémies de VHE sont connues pour être fréquentes et resurgir à nouveau quelques années plus tard. Elles concernent plusieurs centaines à milliers d'individus. La source est généralement unique et liée à une contamination hydrique par des matières fécales. La contamination est provoquée par l'insuffisance, l'absence ou l'arrêt de traitement des eaux usées ou des égouts, le déplacement de populations lors de conflits armés, de catastrophes naturelles ou d'inondations ou la combinaison de ces éléments [56]. Les taux d'attaque sont généralement élevés de 1 à 15% et les adultes jeunes masculins (15-35 ans) sont les plus touchés [51]. Les taux de mortalité vont de 0.2 à 4% et sont supérieurs à ceux observés avec le virus de l'hépatite A (0,1-2,5%). La mortalité semble plus élevée chez la femme enceinte, surtout pendant le 3^{ème} trimestre de grossesse, avec des taux variant de 10 à 25% [55]. Plusieurs hypothèses physiopathologiques (immunologique, hormonale et virologique) sont évoquées [57]. La propension à développer des hépatites fulminantes est également plus élevée chez la femme enceinte. Elle pourrait être comparable avec celle des patients ayant une pathologie chronique hépatique associée [58-60] car les femmes enceintes pourraient être sur-représentées dans les études épidémiologiques [61].

Les cas sporadiques sont semblables à ceux développés lors d'épidémies en termes d'âge, de présentation clinique et de pronostic [61]. La détection régulière du virus dans des égouts

suggère également une circulation permanente du virus malgré l'absence d'épidémies [55, 61].

La transmission interhumaine du VHE semble limitée contrairement à d'autres virus entéro-transmissibles [53, 61]. La transmission mère-enfant a été décrite mais rare [53, 55, 61]. Le VHE est associé à des atteintes sévères en cours de grossesse comme la prématurité, les petits poids de naissance et un sur-risque de mortalité périnatale. La transmission parentérale via la transfusion sanguine a été décrite [62] mais sa contribution aux données épidémiologiques est incertaine [61]. Quelques épidémies liées à une transmission alimentaire ont été décrites. La durée d'incubation longue de la maladie (jusqu'à 10 semaines) rend l'implication d'éventuels aliments particuliers difficiles à établir [53].

Les données de séroprévalence diffèrent par rapport au virus de l'hépatite A. Les taux sont moins élevés et atteignent de 15 à 60% en fonction des pays. Les anticorps anti-VHE sont rarement détectés chez l'enfant et atteignent un plateau vers 40% chez l'adulte jeune sans évolution ultérieure [51, 54]. Seule l'Égypte se différencie avec un profil proche de l'hépatite A, comme par des formes asymptomatiques plus fréquentes chez les femmes enceintes, peut-être liées à des sous-types 1 différents [54].

1.2.2 Pays développés

1.2.2.1 Données épidémiologiques

Dans les pays de faible endémicité du virus, le virus représente une part minoritaire des cas d'hépatites virales aiguës. Aucune épidémie n'a été rapportée [55, 61]. Le virus est responsable d'hépatites chez le voyageur et est souvent observé au sein de populations immigrées. La part des infections importées représente environ 10% des cas comme en France à 2/3 des cas aux USA selon Khuroo *et al.* [54]. La constatation plus récente de cas autochtones a été appuyée par la description de cas sporadiques ou de petites séries dans plusieurs pays : USA, Europe (dont le Royaume-Uni, la France, les Pays-Bas, l'Autriche, l'Espagne et la Grèce), Asie-Pacifique (dont le Japon, Taiwan, Hong-Kong et l'Australie) [61, 63]. L'incidence du VHE dans les pays développés n'est pas connue [55]. Plusieurs raisons sont évoquées comme des performances des tests diagnostiques variables, l'absence de notification obligatoire dans la plupart des pays, associées à une méconnaissance du virus [54, 55, 63]. La France et l'Allemagne ont commencé à donner les 1ers chiffres d'incidence dans

les pays industrialisés avec une incidence de 50-100 cas d'hépatites cliniques autochtones chaque année [54]. Des données similaires sont rapportées dans la littérature [63-67]. L'augmentation récente des cas rapportés (Royaume-Uni, France, Japon) semblerait plus en lien avec une augmentation des demandes de diagnostic et l'arrivée de meilleurs outils plutôt qu'à une incidence plus forte de l'infection [51]. Cependant, ces chiffres pourraient être sous-estimés et des cas d'hépatites E pourraient être classés à tort comme étant d'origine toxique [68].

Les cas autochtones sont plus fréquemment rencontrés chez l'homme d'âge moyen à élevé. Les taux de mortalité observés sont plus élevés que dans les pays endémiques et vont de 8 à 11%. Environ, 15% des patients présenteraient des complications hépatiques ou extra-hépatiques. Comme en zone d'endémie, la présence d'une hépatopathie chronique sous-jacente serait un facteur de mauvais pronostic avec des taux de mortalité atteignant 70% [51].

En France, des cas d'hépatites E autochtones ont été décrits dès 1996 dans plusieurs régions de France métropolitaine. La surveillance de l'hépatite E, réalisée par le Centre National de Référence (CNR) des hépatites à transmission entérique (Hôpital d'instruction des armées du Val-de-Grace, Paris, France), décrit une situation épidémiologique stable en 2008. Les dernières données disponibles répertorient en 2009 environ 200 cas majoritairement autochtones. La proportion des cas autochtones était de 63% en 2006 et 60% en 2008.

Les principales informations épidémiologiques de 2008 sont :

- une détection des cas autochtones sur tout le territoire français associée à la persistance d'un gradient Nord-Sud,
- la présence d'une majorité d'hommes de plus de 55 ans infectés par le génotype 3,
- la consommation de viandes de porc crues et les occupations de chasse comme facteurs d'exposition majoritairement cités.

Une surveillance renforcée du virus a été mise en place en 2010 par l'Institut National de Veille Sanitaire en collaboration avec le CNR afin de mieux préciser le contexte épidémiologique des cas [13].

Concernant les données de séroprévalence dans la population générale dans les pays industrialisés, les taux peuvent être assez élevés jusqu'à 20-30% malgré une grande variabilité selon les études [69]. Ils vont de 3 à 20% en Europe [51], de 1,9 à 14,1% au Japon [70] et de 17 à 21% aux USA [51]. Les taux de séroprévalence selon l'âge montrent une augmentation régulière chez l'adulte et la personne plus âgée [56]. Plusieurs études montrent des facteurs d'exposition responsables d'une plus grande circulation du virus selon les régions [40]. En France, les taux de séroprévalence décrit chez les donneurs de sang sont de 3,2% en région Ile

de France et Pays de Loire [71], 8% à Marseille [72] et 16% dans la région du Sud-Ouest [73]. Le facteur d'exposition retrouvé dans cette dernière étude est la chasse. Des études de séroprévalence parmi différentes populations potentiellement à risque de transmission parentérale ont été conduites. Des taux variant de 0 à 14,5% ont été retrouvés chez des hémodialysés chroniques [74].

1.2.2.2 Hypothèse zoonotique

Les expériences d'inoculation réussies de souches porcines chez les primates dès 1990 et de la souche humaine US-2 chez le porc sain ont conduit à apporter des preuves de passage de la barrière d'espèce et ont pu faire évoquer la possibilité d'un réservoir animal chez le porc ou d'autres animaux. En parallèle, de nombreuses souches d'origine porcine ont été mises en évidence comme de forts taux de séroprévalence dans certains troupeaux [35, 51].

Les preuves d'une transmission zoonotique ont été apportées par l'identification de cas de transmission directe du virus de l'animal à l'homme. Plusieurs cas ont été décrits au Japon et en France dans les suites de consommation de viande de porc contaminée, de sanglier ou de cerf cru ou insuffisamment cuite [57]. Deux études rapportent des cas confirmés de transmission alimentaire zoonotique au Japon [75, 76]. L'origine de la contamination se base sur un faisceau d'arguments épidémiologiques et virologiques dont une identité de séquences nucléotidiques entre le cas humain et la souche isolée au niveau des denrées alimentaires conservées [57]. En France, la probable contamination en 2006 d'un couple originaire de Tours après un voyage dans le sud de la France et la consommation de viande de porc séchée corrobore l'hypothèse d'une transmission alimentaire [77]. De même, plus récemment, une étude cas-témoin publiée en 2010 par Colson *et al.* rapporte 3 épidémies marseillaises indépendantes liées à la consommation de figatelles, saucisses de foie de porc consommées fréquemment crues [72].

La présence du VHE dans les denrées alimentaires issues du porc a été retrouvée dans 5 études indépendantes réalisées au Japon, au Pays-Bas, Inde, Corée du Sud et aux Etats-Unis. De 1 à 11% des foies vendus dans le commerce contenaient le virus. Son infectiosité a été démontrée dans l'une de ces études [78]. Une étude similaire est actuellement réalisée en France (projet ANRS/HEVZOONEPI) [79, 80]. L'inactivation du virus dans les denrées alimentaires a été étudiée. Le virus reste infectieux après une cuisson de 1 heure à 56°C mais est inactivé après une température interne de 71°C pendant 5 minutes suggérant la persistance du risque en cas de cuisson insuffisante [81]. De plus, d'autres produits non cuits comme les

salaisons pourraient être potentiellement infectieux du fait de la résistance du virus à des conditions naturelles peu favorables y compris la congélation [57].

Les facteurs d'exposition alimentaire retrouvés dans la littérature comprennent également la consommation de gibier [82]. Une étude de type cas témoin conduite en Allemagne rapporte la consommation d'abats et de viande de sanglier comme associée un risque significatif de contamination par le VHE [66].

Les données justifiant une transmission par contact direct avec un animal sont rares [51]. De fortes séroprévalence ont été rapportées auprès de personnels d'abattoir, de vétérinaires et producteurs de porc [11]. Une étude aux USA a montré un sur-risque de 1,5 de portage d'anticorps anti-VHE chez des vétérinaires par rapport à une population contrôle de donneurs de sang randomisée [83]. Un probable cas de transmission par contact étroit avec un animal de compagnie (cochon nain) avec son propriétaire a été rapporté à Marseille [84]. De grandes quantités de virus peuvent être excrétées dans les selles par l'animal et représentent la source probable de contamination [11].

Le rôle de l'environnement reste à préciser. Une contamination par les rejets des animaux n'est pas exclue mais discutable. Des études conduites en Espagne et au Pays-Bas ont isolé à partir d'eaux usées ou de rivières des séquences montrant des clusters avec des séquences de cas autochtones et de porcs. Ces données suggèrent des possibilités de transmission par un contact direct ou ingestion orale d'eaux contaminées avec un inoculum compatible [56].

1.2.2.3 Autres modes de transmission

Un autre mode de contamination par voie alimentaire suite à l'ingestion de crustacés a été étudié en 2008 au Royaume-Uni dans les suites d'une épidémie de jaunisses pendant un tour du monde en croisière. L'infection était significativement associée à la consommation de coquillages [85]. Ce facteur de risque a été rapporté lors de questionnaires alimentaires dans plusieurs pays (Italie, France et Royaume-Uni). Plusieurs crustacés sont connus comme potentiellement vecteurs de virus entéro-transmissibles et un inoculum fort pourrait être transmis surtout s'ils sont consommés crus [56].

La transmission parentérale demeure exceptionnelle dans les pays industrialisés à ce jour. Elle est possible du fait d'une phase virémique précédant les symptômes cliniques et biochimiques. Dans les pays industrialisés, au moins 6 cas ont été décrits en France et au

Japon par transfusion de produits sanguins labiles [70, 86]. Le risque est lié à l'absence de dosage systématique des transaminases lors du don comme en France et aux USA et au risque potentiel de donneurs virémiques initialement asymptomatiques au niveau clinique, biochimique et sérologique comme décrits au Japon [57]. Des cas de transmission nosocomiales ont également été décrits [87, 88]. Plus récemment, Kaba *et al.* ont recherché la séroprévalence du virus au sein d'une population de sans domicile fixe (SDF) dans le sud de la France. Ils rapportent une séroprévalence de 11.6% dans cette population et décrivent une association entre le portage d'IgG anti-VHE et la toxicomanie qui pourrait représenter une voie de contamination par le virus [89].

La transmission verticale du virus n'a jamais été décrite dans des pays développés.

Les différentes voies de transmission confirmées, probables ou suspectes sont schématisées sur la figure 4.

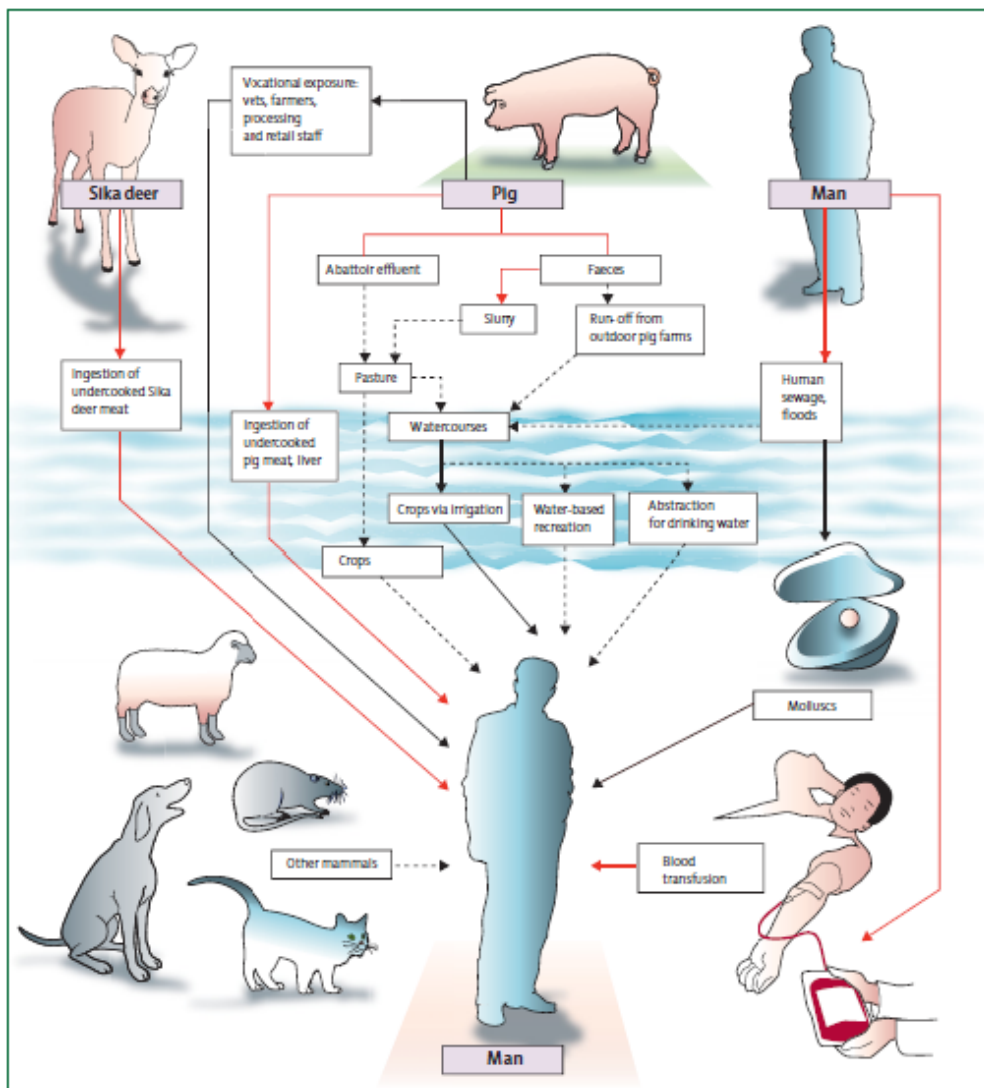


Figure 4 : Voies de contamination par le VHE.

(lignes rouges: voies de contamination confirmées, pleines noires : fortement probables, hachurées noires : potentielles). (extrait de Dalton *et al.*[51])

1.2.2.4 Réservoir

Le réservoir du virus est principalement humain en zone d'endémie.

Concernant le réservoir animal, le cochon domestique et le sanglier sont les principaux réservoirs pour les génotypes 3 et 4 dans le monde [11]. Plusieurs études ont été menées dans le but de déterminer les différents réservoirs animaux potentiels du VHE. Des anticorps anti-VHE, ou contre un agent très proche, ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces animales. Elles regroupent les porcs, sangliers, cervidés, lapins, rats, mangoustes, chevaux, chats, chiens, moutons, chèvres et bovins. Les espèces chez lesquelles le génome viral a été mis en évidence (i.e. multiplication du virus) sont uniquement les porcs, sangliers, cervidés, lapins, rats et mangoustes. Des anticorps anti-VHE ont été détectés dans des élevages de porcs à hauteur de 30 à 80%. En France, 50% des porcs en âge d'être abattus sont séropositifs pour le VHE.

Seuls les génotypes 3 et 4 peuvent infecter l'animal qui est généralement asymptomatique. L'infection naturelle chez le porc est marquée par une contamination précoce par voie féco-orale vers l'âge de 10 semaines puis le virus se réplique activement dans le foie pour être fortement excrété dans les fèces entre 12 et 18 semaines. Pendant la virémie, le virus peut être retrouvé dans d'autres organes comme les muscles (longissimus, biceps femoris, iliopsoas). En cas d'infection tardive, des animaux peuvent arriver à l'abattoir entraînant ainsi un risque d'exposition au VHE par l'alimentation. L'étendue du réservoir au sein de la faune sauvage est moins bien connue. Le sanglier et le cerf sont porteurs du virus et il est retrouvé chez 40% des sangliers et 34% des cerfs dans certains pays d'Europe [80].

1.3 Clinique

La présentation clinique de l'hépatite E est semblable au tableau d'hépatite aiguë causée par les autres virus hépatotropes. La durée d'incubation varie de 2 à 9 semaines avec une moyenne de 40 jours. Le spectre d'expression clinique est large allant de formes asymptomatiques à des hépatites fulminantes. Près de la moitié des cas seraient asymptomatiques ou pauci-symptomatiques [79]. La symptomatologie la plus fréquemment rencontrée est une hépatite aiguë cytolitique d'évolution favorable [40]. La phase prodromique est inconstante et se manifeste par une asthénie, de la fièvre et des troubles digestifs pendant 3 à 7 jours puis la phase d'état correspond à un ictère de 2 semaines. La fréquence des formes cholestatiques est de 20% [90]. Les manifestations extra-hépatiques du

virus sont rares. De rares atteintes neurologiques (radiculites, syndrome de Guillain-barré, encéphalites), thrombopénies, polyarthrites et pancréatites ont été décrites [91-94]. Des cas de réinfections ont été également été rapportés [51].

Lorsque la biopsie hépatique est réalisée, 2 formes d'hépatites aiguës, dites classique et cholestatique, peuvent être observées. La forme classique est la plus fréquente avec une activité nécrotico-inflammatoire généralement marquée. Les lésions sont une nécrose hépatocyttaire confluyente ou focale, sous la forme de corps acidophiles isolés ou d'hépatocytes ballonnés, associée à une inflammation portale et parenchymateuse mixte polymorphe et lymphocytaire. Une inflammation lymphocytaire prédominante avec nécrose parcellaire (région périportale) peut faire rechercher une hépatite chronique virale ou une étiologie auto-immune associée [51, 95]. Une forme dite classique est présentée sur la figure 5.

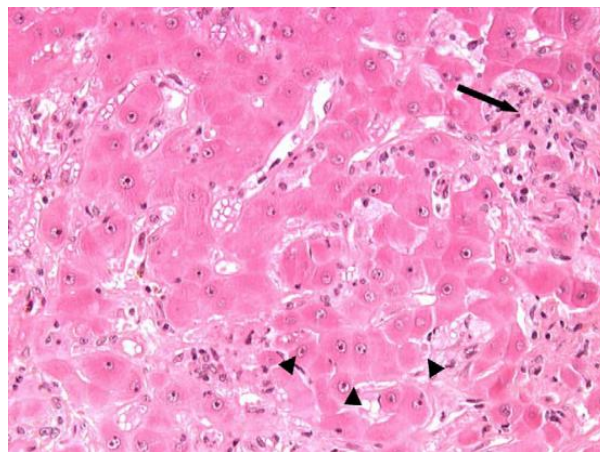


Figure 5: Forme classique d'hépatite E aiguë sporadique autochtone. Présence d'une nécrose acidophile lobulaire confluyente (têtes de flèche) et inflammation sinusoidale marquée polymorphe (flèche) (X40). (extrait de Selves *et al.* [95])

Depuis quelques années, une évolution vers la chronicité a été décrite dans 3 contextes d'immunosuppression : maladie hématologique, transplantation, et infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Quelques cas ont été rapportés en France et au Japon chez des patients porteurs de lymphomes traités par chimiothérapie éventuellement associée à une greffe de cellules souches hématopoïétique [96, 97]. Concernant la population d'individus infectés par le VIH, 2 formes chroniques ont été décrites dont une d'évolution vers la cirrhose [98, 99]. Des taux de CD4 supérieurs à 200/mm³ semblent favoriser l'éradication du virus [100]. La majorité des hépatites E chroniques ont été décrites chez les patients transplantés de rein (ou rein-pancréas) et de foie. A Toulouse, l'évolution vers la chronicité est estimée à 60% sur 38 patients transplantés d'organes solides dans le Sud-Ouest de la France [82]. Les molécules immunosuppressives et leurs posologies paraissent moduler l'éradication du virus

[101]. Des cas de cirrhoses ont été décrits. Une évolution cirrhogène plus rapide est rapportée principalement chez les transplantés rénaux [41].

Les lésions histologiques à la phase aiguë, décrites sur une série de 20 cas dans la région sud-ouest, montre des lésions d'hépatite aiguë classique principalement sous la forme d'une nécrose lobulaire isolée. Ces lésions observées sont moins sévères que chez l'immunocompétent. L'hépatite chronique est caractérisée par une fibrose portale progressive, une inflammation lymphocytaire souvent dense dans les espaces porte et des degrés variables de nécrose parcellaire. Ces lésions sont similaires aux hépatites chroniques virales C [95].

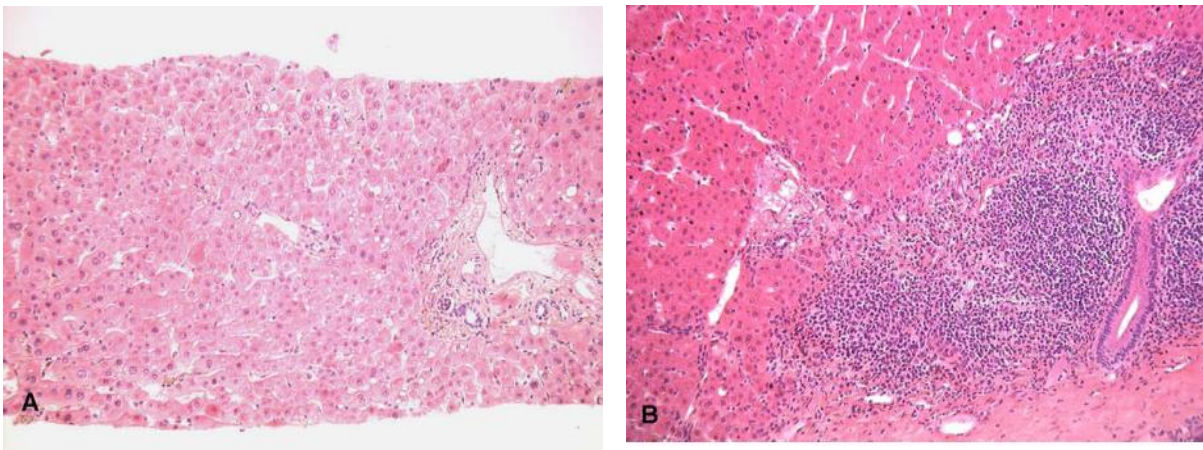


Figure 6: Hépatite E chronique chez un patient transplanté.

A : Phase aiguë avec quelques foyers nécrotiques lobulaires et discrète inflammation portale, B : Hépatite chronique virale avec infiltrat lymphocytaire portal dense et nécrose parcellaire (X20). (extrait de Selves *et al.* [95])

Un cas de réactivation a été décrit chez un patient atteint d'une leucémie après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques [102].

1.4 Traitement et prophylaxie

Le traitement de l'hépatite aiguë de l'immunocompétent est uniquement symptomatique. Concernant l'hépatite E chronique, une baisse de l'immunodépression, l'utilisation d'interféron pégylé ou de Ribavirine donnent des résultats favorables sur quelques cas testés [101, 103, 104].

Les mesures prophylactiques reposent sur l'hygiène en zone d'endémie. Les mesures dans les pays autochtones reposent sur des consignes alimentaires de cuisson à cœur des produits à base de produits porcins ou de gibier notamment pour les groupes à risques.

Des essais, en phase III, prometteurs ont été conduits pour 2 vaccins [105, 106]. Ils reposent sur des protéines recombinantes de la protéine de capsid ORF2 contenant les sites d'épitopes neutralisants. L'un exprime une protéine de capsid tronquée (position 112-608) produite dans un système baculovirus, le second une protéine tronquée, p239 (position 368-606), produite par *E. Coli* [31].

1.5 Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de l'hépatite E repose sur la détection du virus ou de son ARN et des marqueurs sérologiques spécifiques (IgM anti-VHE, IgG anti-VHE). Dans les pays développés, cette recherche doit être associée au contexte: séjour ou non en zone d'endémie, facteurs favorisants éventuels (profession, loisirs, habitudes alimentaires), date des prélèvements par rapport à la cytolysé hépatique [40]. Elle doit également être réalisée chez tout sujet immunodéprimé ayant une hépatopathie chronique inexplicée [41].

Le diagnostic biologique pragmatique d'une hépatite aigue E, proposé par Dalton *et al.* en 2008 [51], repose sur la présence d'au moins l'un des 3 paramètres suivants associé à une élévation des transaminases :

- ARN du VHE positif,
- positivité des IgM spécifiques,
- majoration du taux des IgG anti-VHE lors de 2 prélèvements consécutifs.

Les critères diagnostics de l'hépatite E chronique chez le patient immunodéprimé ne sont pas établis mais reposent communément sur la détection de l'ARN du virus pendant une durée supérieure à 6 mois associée le plus souvent, mais pas nécessairement à la présence d'IgM et ceci, quel que soit la réactivité des IgG [57].

Plusieurs techniques de mise en évidence directe du virus existent ou sont en cours de développement. Elles sont peu ou pas de pratique courante. D'une part, la mise en évidence directe des particules virales dans les selles par immuno-microscopie électronique n'est pas utilisée en routine du fait de la brièveté de l'excrétion fécale, de son inadaptation à l'examen d'un grand nombre d'échantillons et d'une sensibilité médiocre [38]. D'autre part, la mise en culture du virus est limitée à des laboratoires spécialisés du fait d'une praticabilité restreinte [38] et par manque d'efficacité constatée sur hépatocytes primaires ou de multiples lignées cellulaires couramment utilisées [107]. Okamoto a décrit plus récemment un système de

réplication virale plus efficace sur cellules cancéreuses humaines du foie (PLC/PRF/5) et du poumon (A549) attribuée à un inoculum très élevé d'une souche de génotype 3 [107]. Enfin, concernant la recherche des antigènes viraux du VHE, une équipe chinoise en 2006 a élaboré une technique Elisa destinée à détecter des protéines de capsid du VHE pour les génotypes 1 et 4. Malgré une fenêtre de détection des antigènes étroite, les auteurs évoquent un bénéfice diagnostique en pré-séroconversion anti-VHE [35].

1.5.1 Evolution des marqueurs diagnostiques

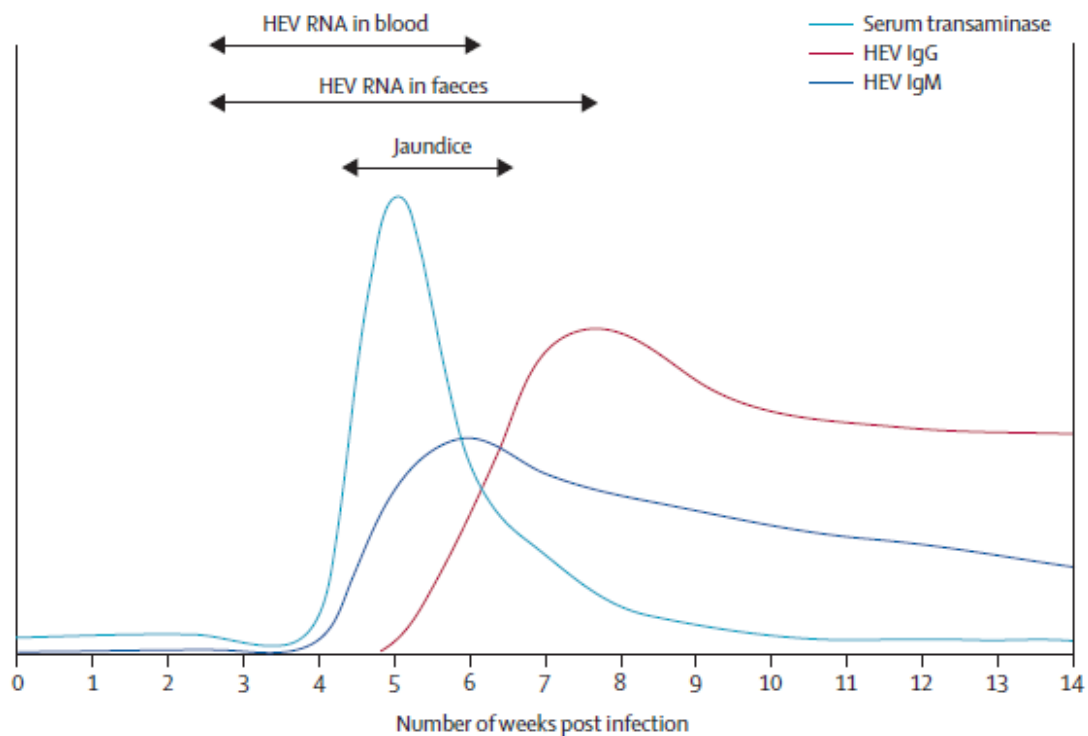


Figure 7 : Représentation schématique de l'évolution des marqueurs biologiques lors d'une infection virale E. (extrait de Dalton *et al.* [51])

L'évolution schématique des marqueurs biologiques de l'infection virale E est décrite sur la figure 7. La réponse humorale suit une évolution classique avec la détectabilité des IgM lors du début des symptômes ou des anomalies biologiques hépatiques puis les IgG atteignent rapidement un pic pour persister plusieurs années. Les transaminases atteignent un pic vers 6 semaines pour se normaliser à la 10^{ème} semaine. Les IgM culminent pendant la phase aiguë de la maladie et disparaissent entre 3 et 6 mois. Les IgG apparaissent au pic des transaminases et suivent une ascension pendant la phase symptomatique. Elles ont été détectées jusqu'à 12 ans après l'infection. Le virus peut être détecté dans le sang et les selles par RT-PCR entre 7 et 15

jours avant l'élévation des transaminases. La virémie persiste pendant la phase symptomatique de 21 à 28 jours (de 17 à 48 jours possible) pour se négativer dans les suites de la régression clinique. Le pic de la virémie se situe pendant la période d'incubation et la phase précoce de la maladie. L'excrétion fécale est prolongée de 2 semaines par rapport à la virémie [29, 51, 57].

1.5.2 Diagnostic sérologique

Les outils diagnostics permettant la mise en évidence indirecte du VHE sont principalement basés sur la recherche des IgG et IgM anti-VHE par les techniques ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). D'autres moyens diagnostics peuvent être utilisés en complément ou sont en cours de validation pour compléter l'interprétation des profils biologiques rencontrés: avidité des IgG, IgA anti-VHE.

Il existe plusieurs trousse sérologiques commercialisées afin de détecter les IgG et IgM spécifiques du VHE. Elles sont basées principalement sur des méthodes immuno-enzymatiques ou immuno-chromatographiques et sont semi-quantitatives. Elles se différencient par les séquences d'acides aminés des antigènes coâtés dérivés de l'ORF2, de l'ORF3 et par leurs modes de production (protéines recombinantes ou peptides de synthèse) ce qui leur confère des performances variables [40]. Ces trousse ont été développées principalement à partir de virus de génotypes 1 et/ou 2. Actuellement, 8 trousse sont disponibles en France dont un test rapide de type immuno-chromatographique utilisé pour la recherche des IgM pour les diagnostics d'urgence. Les principales caractéristiques de ces kits ainsi que leurs performances diagnostiques retrouvées dans la littérature sont décrites dans le tableau 1.

Concernant les performances liées à la détection des IgM, le défaut de sensibilité est le plus souvent attribué à une infection débutante tandis que les faux positifs sont en général liés à des réactions croisées en présence de sérums hyperimmuns (réactions polyclonales non spécifiques liées à d'autres infections virales aiguës) [57]. Une étude réalisée en zone d'endémie montre un faible niveau de détection chez le patient virémique asymptomatique [108]. La spécificité des derniers tests commercialisés destinés à la détection des IgM anti-VHE, dont le test rapide immunochromatographique, s'est accrue avec une forte diminution du nombre de réactions non spécifiques [40]. Les performances diagnostiques chez

l'immunodéprimé semblent similaires selon une étude française auprès de 38 patients transplantés d'organes solides [82].

Concernant les performances liées à la mise en évidence des IgG, de fortes variations entre certaines troupes pourraient exister [109]. Herremans *et al.* propose une combinaison de test (Elisa et Blot) pour obtenir des performances diagnostiques suffisantes en zone de faible endémicité [110]. Il semblerait également que la sensibilité des troupes pour mettre en évidence la présence d'IgG chez l'immunodéprimé soit plus faible que chez l'immunocompétent [41]. L'absence de séroconversion est possible et a été estimée de 1 à 4% des cas par an en Chine [111].

La mesure de l'avidité des IgG, déterminée grâce à l'adaptation de troupes ELISA, constitue un outil complémentaire dans l'interprétation des résultats sérologiques en l'absence de détection virale. Ce test mesure la force de liaison des Ag-Ac des IgG grâce à l'utilisation d'un agent dénaturant et permet de distinguer une infection récente caractérisée par une faible affinité d'une infection ancienne associée à une plus forte avidité [57]. Le CNR a développé une technique qui détermine le caractère récent d'une infection en cas de faible avidité inférieure à 40% et plus ancien, de plus de 6 mois, en cas d'avidité supérieure à 60% [112].

L'utilité diagnostique de la recherche des IgA anti-VHE montre des résultats contrastés [35]. Une augmentation de spécificité diagnostique a été décrite par certaines équipes lors de leurs recherches seules ou associées aux IgM anti-VHE [113, 114] tandis qu'une faible sensibilité notamment en cas d'infection par le génotype 3 a été rapportée [115].

Tableau 1 : Principales caractéristiques et performances des kits commerciaux disponibles en France. Les données concernant les caractéristiques du virus ont été adaptées selon Zehner *et al.* [116]. (Ig tot : immunoglobulines totales, Rec : recombinant, G : génotype, IC immunochromatographique)

Tests sérologiques	Fabricants	Principe du test	Nature du test	Antigènes issus de l'ORF3 (position des acides aminés)	Antigènes issus de l'ORF2 (position des acides aminés)	Production de l'antigène	Souches prototypes	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Populations testées (ou génotypes)	Origine des données
					pORF2 (71kDa) (1-660)						
Test développé par la WRAIR*	Elisa	quantitatif			VLP (56Kda) (112-660)	rec	S pakistanaise (G1)	86 (lg tot)	89 (lg tot)	Népal	[117, 118]
								92-97(IgM)	100 (IgM)	Népal	[119]
								84 (lg tot)	100 (lg tot)	Indonésie	[108]
								91 (IgM)	100 (IgM)	Indonésie	[108]
ASSURE® HEV IgM Rapid Test	MP Diagnostics	IC en phase inverse	semi-quantitatif		pORF2-1 (394-660)	rec	S Burma (G1)	96	97,7	Népal, Chine, Indonésie	Fabricant
								93	99,7	Indonésie, Népal	[120]
								96,7	98,6	Népal, Chine	[121]
								82	100	France (49/50 G3)	[122]
HEV IgM ELISA 3.0®	MP Diagnostics	Elisa	qualitatif		pORF2-1 (394-660)	rec	S Burma	98	96,7	Népal, Chine, Indonésie	Fabricant
								88	99,5	France (49/50 G3)	[122]
VHE ELISA®	MP Diagnostics	Elisa	qualitatif, IgG	4-2 (91-123)	3-2 (619-660)	rec	S Burma et Mexico (G2)	97	99,3-98	zones épidémiques	Fabricant
								89	86	Indonésie	[108]
								86,7	92,1	Taiwan	[123]
								100	93	8 G1	[110]
								88	93	Pays-Bas (16 G3)	[110]
RecomLine HEV IgG/IgM®	Mikrogen	Immunoblot	semi-quantitatif	O3	O2-N, O2-C, O2-M	rec	G1 et 3 (sauf O2-M)	85,6(IgM)	99,5(IgM)	Inde	fabricant
								100 (IgM)	97 (IgM)	8 G1	[110]
								88(IgM)	97(IgM)	Pays-Bas (16 G 3)	[110]
								97,5(IgG)	85(IgG)	Inde	fabricant
								100 (IgG)	90 (IgG)	8 G1	[110]
								100(IgG)	90 (IgG)	Pays-Bas (16 G3)	[110]
HEV IgM®	Dia.Pro	Elisa	qualitatif	? (91-123)	T42 V (619-660)	synthèse	S Burma	>98	>98	Mexique, Birmanie	fabricant
								90	100	France (49/50 G3)	[122]
HEV IgG®	Dia.Pro	Elisa	qualitatif	? (91-123)	T42V (619-660)	synthèse	S Burma	100	>99,5	Non précisé	fabricant
HEV-IgM ELISA®	Wantai	Immuncapture	qualitatif		pE2 (394-608) [124]	rec	S chinoise (G1)	97,9	98,8	Non précisé	fabricant
								97	100	Chine	[125]
HEV-IgG ELISA®	Wantai	Elisa	qualitatif		pE2 (394-608)[124]	rec	S chinoise (G1)	98	>99	Non précisé	fabricant
								98	83,8	UK (18 G 3)	[109]

*non commercialisé

1.5.3 Biologie moléculaire

Le diagnostic biologique de certitude de l'hépatite E repose sur la mise en évidence du génome viral principalement dans le sang et/ou les selles par RT-PCR. L'ARN viral peut également être mis en évidence au niveau du tissu hépatique et de la bile [35]. Le génome du VHE est détecté par technique de RT-PCR en point final ou RT-PCR en temps réel. Des systèmes multiplex ont également été développés [126, 127]. La région majoritairement amplifiée se situe au niveau de la région de l'ORF2 codant pour la protéine de capsid qui est très conservée [40]. Aucune technique de détection du VHE n'est commercialisée à ce jour en France.

Plusieurs techniques de RT-PCR « maison » en point final ou conventionnelle sont décrites dans la littérature [128-130]. La technique de Cooper *et al.*, utilisée par le CNR en 2010, utilise une région de l'ORF2. Elle permet la détection des 4 génotypes du VHE.

De nombreuses techniques par RT-PCR temps réel sont décrites dans la littérature. Elles sont présentées dans le tableau 2 d'après Merviel *et al.* [126]. Elles ont été évaluées à partir d'échantillons humains, de porcs et de l'environnement. Certaines peuvent détecter les 4 génotypes. Elles peuvent être quantitatives avec des limites de détection variant de 4, 5 à 1000 copies/ml ou de 1 à 20 copies/réaction. La technologie Taqman® est largement répandue. Des écarts de sensibilité entre les techniques moléculaires ont été rapportés [131].

Les principales limites à la détection du virus sont liées à une fenêtre de détection étroite pour certains patients et une excrétion intermittente possible [124]. Inversement, la biologie moléculaire permettrait le diagnostic de rares cas d'hépatites E sérologiquement muettes chez l'immunocompétent [132-134] ou l'immunodéprimé [82].

Tableau 2: Principales caractéristiques des techniques de RT-PCR temps-réel décrites dans la littérature. Les données sont adaptées selon Merviel *et al.* [126].

Année	Echantillon	Automate	Sonde	Cible	Validation des 4 génotypes	Limite de détection ou intervalle de mesure	Précision	Nombre d'étapes	Références
2004	Selles	LightCycler	SYBR Green	ORF2	non	10 copies/réaction	Quantitatif	1 temps	Orru et al[135]
2004	Sérums/selles	LightCycler	Sondes Taqman	ORF2	non	1000 copies/ml	Qualitatif	2 temps	Mansuy et al[136]
2005	Sérums/eaux	RAPID Thermal Cycler	Sondes Taqman	ORF3	oui	4-4E9 copies/réaction	Quantitatif	1 temps	Jothikumar et al[137]
2006	Sérums	ABI PRISM 7000	Sondes Taqman	ORF2	?	16,8 copies/réaction	Quantitatif	2 temps	Ahn et al[138]
2006	Sérums/selles	LightCycler	SYBR Green	ORF2	non	4,5-4,5E4 copies/ml	Quantitatif	1 temps	Li et al[139]
2006	Sérums/selles	LightCycler	Sondes Taqman	ORF2	oui	10-10E9 copies/réaction	Quantitatif	2 temps	Enouf et al[140]
2006	Eaux	?	?	?	?	?	Quantitatif	?	Albina-Gimenez et al[141]
2007	Selles/tissus	RotorGene 3000	Sondes Taqman et PPET(Primer Probe Energy Transfer)	ORF2	oui	1-20 copies/réaction	Quantitatif	1 temps	Gyarmarti et al[142]
2007	Sérums	ABI PRISM 7000	Sondes Taqman	ORF3	non	5,6E3-5,6E10 copies/réaction	Quantitatif	1 temps	Zhao et al[143]
2008	Sérum/selles	?	Sondes Taqman	ORF2	non	20 copies/réaction	Quantitatif	2 temps	Qiao et al[144]
2008	Sérum/salive/selles	Applied Biosystems 7500	Sondes Taqman	ORF2	non	25 copies/ml	Quantitatif	1 temps	Matsubayashi et al[145]
2009	Sérums/selles de porcs	Stratagene Mx3005P	Sondes Taqman	Etude comparative					Ward et al[146]

L'étude des différentes techniques de RT-PCR temps-réel décrites dans la littérature et du comparatif établi en 2009 par Ward *et al.* [146] nous a orienté vers la technique de Jothikumar *et al.* En effet, ce dernier montre une sensibilité supérieure de cette technique pour la détection des virus de l'hépatite E de génotype 3 qui sont les plus fréquemment rencontrés en France. Sa mise en place au laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble est décrite dans la partie expérimentale de ce travail

2 Objectifs

Le VHE s'avère être à l'origine de cas autochtones dans les pays industrialisés en lien avec son potentiel zoonotique récemment identifié. Ces cas sont associés à l'émergence de souches autochtones et sont étroitement surveillés par le centre national de référence des virus des hépatites A et E en France. De plus, la constatation de formes de portage chronique du virus d'évolution potentiellement grave a élargi le spectre d'implication du virus au sein de plusieurs populations d'immunodéprimés.

Ainsi, compte-tenu de l'implication potentielle du VHE parmi plusieurs populations pris en charge au CHU de Grenoble, il nous est apparu nécessaire de mettre en place au laboratoire les principaux outils diagnostiques virologiques du virus. Ce travail a donc porté initialement sur la mise en place et l'évaluation d'une technique de biologie moléculaire par temps-réel qui soit rapide et fiable.

Ensuite, nous avons cherché à préciser les modes d'exposition potentiels au virus ainsi que son impact clinique éventuel parmi 2 populations de patients immunodéprimés en se basant sur une recherche sérologique et moléculaire du virus.

Nous avons ensuite cherché à préciser les modes d'exposition potentiels au virus ainsi que son impact clinique éventuel parmi 2 populations de patients immunodéprimés en se basant sur une recherche sérologique et moléculaire du virus.

La première étude porte sur la cohorte RIBAVIC de patients co-infectés par les virus de l'hépatite C (VHC) et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), inclus dans les années 2000, sur tout le territoire français, dans le but d'évaluer un protocole thérapeutique anti-viral C. En effet, Kaba *et al.* en 2010 ont mis en évidence, au sein d'une population de SDF du sud de la France, une association significative entre le VHE et l'usage de drogues injectables. Hors les patients inclus dans RIBAVIC se sont majoritairement contaminés avec le VHC et le VIH par injection de drogue. Ils représentent donc un échantillon intéressant concernant ce mode de transmission virale. La séroprévalence du VHE ainsi que la présence d'ARN viral ont donc été investigués dans cette population.

La seconde étude concerne les patients transplantés hépatiques suivis au CHU de Grenoble. Des données récentes, majoritairement issues du sud-ouest de la France, montrent une implication clinique forte du VHE au sein de cette population avec un risque accru d'hépatite E chronique. Nous avons donc souhaité évaluer le niveau d'exposition à ce virus dans notre population de la région grenobloise en recherchant les marqueurs sérologiques et moléculaires du virus en pré et post-transplantation. En fonction des premiers résultats obtenus et de l'analyse des données clinico-biologiques, une recherche de cas d'infections ou de réactivations virales a été réalisée afin de mieux connaître l'impact de ce virus en transplantation hépatique dans une zone où la prévalence dans la population générale serait plus faible que celle des études publiées.

3 Matériel et méthodes

3.1 Diagnostic sérologique du VHE

La recherche d'immunoglobulines (Ig) G et M spécifiques du VHE est réalisée avec les kits Diagnostic Bioprobes Srl DIAPRO (Milan, Italie) commercialisés actuellement en France par la société Ingen (Chilly-Mazarin, France) (commercialisé auparavant par Adaltis). Après distribution manuelle des sérums, la technique est automatisée sur BEP III (Dade Behring, Paris, France) selon les instructions du fabricant.

Il s'agit d'une technique qualitative ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de type immunométrique (méthode sandwich antigène), dite de 3^{ème} génération, réalisable sur sérum ou plasma humain. Les antigènes du VHE coâtés dans la plaque sont des peptides de synthèse dérivés des souches prototypes Burma et Mexico, codés par l'ORF2 et l'ORF3 et à l'origine d'épitopes conservés et immunodominants.

Brièvement, les sérums dilués au 1/21^{ème} pour les IgG et au 1/101^{ème} pour les IgM sont mis à incuber, 45 min pour les IgG et 60 min pour les IgM, à 37°C sur la plaque coâtée. La plaque est ensuite lavée 5 fois et 100µL du conjugué (anticorps polyclonal anti-IgG ou anti-IgM marqué à la peroxydase) est ajouté. Après 45 min d'incubation à 37°C pour les IgG, et 60 min pour les IgM, et 5 nouveaux cycles de lavage, 100µL d'une solution substrat contenant de la tétra-méthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont ajoutés sur la plaque. La lecture de la densité optique (DO) à 450 nm s'effectue après 15-20 min d'incubation à température ambiante et ajout du réactif d'arrêt (acide sulfurique 5N).

Pour le kit IgM anti-VHE, l'ajout de 50µL d'une solution neutralisante en début de protocole, permet de diminuer les interférences liées à la présence de fortes concentrations en IgG anti-VHE ou de facteurs rhumatoïdes.

Chaque expérience inclut un contrôle négatif testé en triple pour les IgG et en double pour les IgM, un calibrateur en IgG (4 UI/mL) passé en double et un contrôle positif. 2 contrôles internes ont été testés sur chaque série. Ils correspondent à des sérums de patients connus positifs en IgG et IgM anti-VHE conservés à -20°C.

La valeur seuil de chaque série est calculée comme étant la moyenne des DO des 3 contrôles négatifs et +0.350 pour les IgG ou +0.250 pour les IgM. Les résultats sont exprimés en DO/valeur seuil et sont positifs s'ils sont >1.1 pour les IgG et >1.2 pour les IgM, négatifs s'ils sont <0.9 pour les IgG et <1 pour les IgM et douteux entre ces 2 valeurs.

3.2 Diagnostic moléculaire de l'ARN du VHE par RT-PCR temps réel

La technique mise en place au laboratoire est adaptée de celle décrite par Jothikumar *et al.* publiée en 2006.

Il s'agit d'une RT-PCR temps réel quantitative en une seule étape utilisant une sonde Taqman[®]. La zone amplifiée compte 70 paires de bases. Elle se situe dans l'ORF3 en position 5261-5340 de la souche prototype Burma M73218. D'après la publication princeps sur 13 isolats, les 4 géotypes du virus sont correctement détectés par cette technique. Aussi, elle permet la détection du virus sur différents types d'échantillons humains, de porcs ou de l'environnement.[137]

3.2.1 Extraction de l'ARN du VHE

Les échantillons de sérum ou plasma sont extraits manuellement grâce au Kit QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La prise d'essai est de 200 µL et le volume d'élution de 50 µL. Les échantillons de selles sont extraits sur l'automate Easymag[®] (Biomérieux, Marcy l'étoile, France) avec le protocole spécifique B. La prise d'essai est de 15 mg ou une lentille de selles qui sont d'abord prétraitées par addition de billes de verre (Fisher Emergo, Landsmeer, Pays-Bas) dans un volume de 400µL de tampon de lyse. L'ensemble est vortexé et laissé à reposer 10 min. Une centrifugation de 3 minutes à 14 000tr/min permet de récupérer 200µL de surnageant qui sont ensuite additionnés à 2 ml de tampon de lyse et vortexés. L'éluat est de 50µL.

3.2.2 Amorces et sonde utilisées

Les amorces et la sonde décrites par Jothikumar *et al.* sont décrites dans le tableau 3. Elles ont été obtenues grâce au logiciel Gene Runner 3.05 par l'alignement de 27 séquences de 4 géotypes différents issues de GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI]).

Les sondes et amorces sont synthétisées par Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne) purifiées en chromatographie liquide à haute performance.

Tableau 3 : Séquences et caractéristiques des amorces et de la sonde utilisées.
(extrait de Jothikumar *et al.* [137])

	Noms	Séquences	Régions*	Tm
Amorce sens	JVHEVF	3'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-5'	5261-5278	58,2°C
Amorce anti-sens	JVHEVR	3'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-5'	5323-5340	53,7°C
Sonde	JVHEVP	3'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1-5'	5284-5301	56°C

*Positions des régions d'intérêt établies en référence à la souche M73218-Burma.

3.2.3 Gamme de quantification

Une gamme de quantification de transcrits ARN a été réalisée en utilisant le kit T7 MEGAscript® (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). A partir d'un prélèvement clinique contenant le virus de l'hépatite E de génotype 3, une RT-PCR ciblant la région d'intérêt (ici l'ORF3) est réalisée avec l'amorce JVHEVF modifiée en 3' par l'ajout de la région promotrice de la T7 ARN polymérase. L'ADNc ainsi obtenu est ensuite transcrit par la T7 ARN polymérase pendant 3 heures à 37°C. Après traitement à la DNase (1µL pendant 15 minutes à 37°C), l'ARN synthétisée est dosée par spectrophotométrie à 260 nm, ce qui permet d'évaluer, en fonction du poids moléculaire du transcrit, un nombre de copies/ml. Des dilutions successives sont ensuite réalisées dans du DEPC-treated Water® (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) afin d'obtenir une gamme de 5×10^6 à 25 copies/ml.

3.2.4 RT-PCR temps réel du virus de l'hépatite E

La RT-PCR décrite initialement par Jothikumar *et al.* sur RAPID Cycler avec le kit QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix en 1 étape est adaptée pour pouvoir être effectuée en une seule étape avec le kit Superscript III platinum® One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) sur l'appareil de PCR en temps réel SmartCycler® Dx Cepheid (Orgentec. SAS, Trappes, France). Les concentrations du mix ainsi que celles des amorces et de la sonde ont été adaptées selon les recommandations du kit Invitrogen et sont décrites dans le tableau 4.

Le programme d'amplification a été également adapté à l'enzyme de RT-PCR utilisée. L'étape de dénaturation a été raccourcie du fait des performances du Smart Cycler®. Les cycles de PCR sont précisés dans le tableau 5.

Tableau 4 : Mix de RT-PCR temps-réel pour le VHE grâce au kit Superscript III platinum® One-Step qRT-PCR.

	Mix pour 1 échantillon	Concentration finale
Reaction Mix 2X (6 mM MgSO ₄)	12,5 µl	3 mM MgSO ₄
MgSO ₄ (50 mM)	0,3 µl	0,6 mM
Amorce JVHEV-F (10 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Amorce JVHEV-R (10 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Sonde JVHEV-P (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Superscript III RT/Platinum® Taq Mix (1X)	1 µl	x 0,04
H ₂ O	3,2 µl	
Extrait patient	5 µl	
Volume final =	25 µl	

Tableau 5 : Programme d'amplification du VHE sur Smart Cyclyer®.

Etapes	Analyse	Température	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse		55°C	15 minutes	x 1
Dénaturation		95°C	3 minutes	x 1
Amplification	Quantification	95°C	5 secondes	x 45
		55°C	20 secondes	
		72°C	15 secondes	
Refroidissement		40°C	30 secondes	x 1

Chaque expérience comprend :

- un témoin négatif d'extraction (sérum physiologique à la place de l'échantillon à extraire)
- un contrôle négatif de PCR (sérum physiologique à la place de l'extrait d'un échantillon)
- 4 points de gamme correspondant à 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 et 5×10^2 copies/ml permettant d'établir une droite d'étalonnage.

D'autre part, afin de vérifier la présence d'ARN dans les extraits obtenus et l'absence d'inhibiteurs, une RT-PCR temps réel amplifiant l'ARNm du gène de la GAPDH (Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase) est réalisée sur chaque extrait.

La quantification de chaque échantillon est donnée par le logiciel d'interprétation du Smart Cyclyer® par comparaison du Cycle seuil obtenu (ou Ct) avec la droite d'étalonnage calculée à partir des points de gamme. Le seuil de positivité retenu est de 30 unités de fluorescence.

3.2.5 Techniques complémentaires utilisées

La technique de séquençage utilisée au laboratoire est adaptée selon la technique de Cooper *et al.* [128]. Il s'agit d'une technique de RT-PCR en point final de type nichée. Elle permet l'amplification d'une région conservée de l'ORF2. La taille de l'amplicon final est de 348 paires de base.

Les biopsies tissulaires hépatiques fixées sont extraites selon les recommandations du fournisseur par le kit RNeasy FFPE® (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les biopsies fraîches sont extraites selon les recommandations du fournisseur par le kit RNeasy® (Qiagen, Courtaboeuf, France).

3.3 Evaluation des caractéristiques de la RT-PCR temps réel

3.3.1 Choix de la technique et spécificité des amorces et de la sonde

La conservation de la région cible d'amplification est validée par un alignement réalisé avec le logiciel Multalin [147] de souches de différents génotypes du VHE d'origines géographiques variées (7 souches de génotype 1, 6 de génotype 3 dont une porcine, 1 souche de génotype 2 et 1 de génotype 4). La sur-représentation des génotypes 3 et 1 est volontaire du fait de leurs plus grandes fréquences de détection en France.

Après cette analyse bioinformatique, la vérification de la réactivité vis-à-vis des différents génotypes du virus de l'hépatite E est appliquée en testant 3 souches de génotypes 3 autochtones détectées au CHU de Grenoble dont la positivité a été établie par le CNR du VHE et deux souches de génotypes 1, sous-types a et e, gracieusement fournies par ce centre de référence.

Afin de vérifier la spécificité des amorces et sondes décrites par Jothikumar *et al.* une analyse par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est réalisée sur la base de séquences nucléotidiques du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

De même après l'analyse bioinformatique, la spécificité de la technique est testée grâce à 13 prélèvements positifs vis-à-vis de différents virus potentiellement rencontrés lors de cytolysse aigue. Deux plasmas différents positifs pour le virus de l'hépatite B (charges virales à 8 log

copies/ml), 2 pour le virus de l'hépatite C (6 et 7 log), 2 pour le virus de l'immunodéficience humaine (6 et 7 log), 2 pour le cytomégalovirus (5 et 6 log), 2 pour le virus Epstein-Barr (6 log) et 1 pour le virus de l'hépatite A (charge virale à 8 log) ont été analysés en duplicate par RT-PCR du VHE. 2 prélèvements de selles positifs vis-à-vis de l'entérovirus (sortant à 17 et 28 Ct en technique qualitative) sont également testés.

3.3.2 Validation de la technique

L'évaluation de la technique est réalisée grâce à des gammes de transcrits ORF3 allant de 5×10^6 à 25 copies/ml.

3.3.2.1 Efficacité d'amplification (E)

En considérant la droite d'étalonnage représentant le cycle seuil en fonction du nombre de copies du virus présents dans l'échantillon, E peut se calculer grâce à la relation suivante : $E=10^{(-1/\text{pente})}$. En théorie, la répétition de n cycles de PCR aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n par molécule d'ADN car chaque produit de PCR est dupliqué à chaque cycle. E doit alors se rapprocher le plus possible de 2 c'est-à-dire quand chaque produit de PCR est dupliqué à chaque cycle [148].

Une gamme en 6 points: 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 et 5×10^2 et 100 copies/ml, testés en triplicat dans 4 expériences différentes permet d'estimer cette efficacité.

3.3.2.2 Linéarité et limite de détection

Le coefficient de régression linéaire moyen (R^2) est obtenu à partir des mêmes gammes décrites plus haut sur 4 expériences. R^2 doit être supérieur ou égal à 0,98 pour pouvoir conclure à une corrélation entre 2 paramètres.

La perte de linéarité permet de définir le seuil de quantification.

La limite de détection correspond à quantité minimale détectable avec une probabilité supérieure à 95%. Elle a été déterminé sur 9 passages de dilutions du transcrit VHE de 100 à 25 copies/ml.

3.3.2.3 Répétabilité

La répétabilité (ou variabilité intra-essai) est évaluée par l'analyse de 3 échantillons de différentes concentrations (100 , 5×10^3 , 5×10^5 copies/ml) qui sont testés 4 fois lors de la même expérience.

3.3.2.4 Reproductibilité

La reproductibilité (ou variabilité inter-essai) est testée par le passage des mêmes 3 niveaux de concentration sur 4 expériences différentes avec 4 opérateurs différents et 2 lots différents de kit d'amplification.

3.4 Caractéristiques des 2 populations

3.4.1 Patients co-infectés VIH-VHC

Les sérums à J0 de 111 patients issus de la cohorte ANRS HC02 RIBAVIC [149] sont testés pour le diagnostic sérologique et moléculaire du VHE. Cette cohorte regroupe des patients co-infectés VIH-VHC recrutés dans 71 centres français de février 2000 à février 2002 en vue d'un protocole thérapeutique anti-viral C.

Les principaux critères d'inclusion dans l'étude sont un âge compris entre 18 et 65 ans, des transaminases (ALAT) supérieures à la normale, des lymphocytes CD4 $> 200/\text{mm}^3$. Les patients sont naïfs de traitement anti-VHC et naïfs ou contrôlés pour le traitement anti-VIH.

Les sérums étaient stockés à -80°C .

3.4.2 Patients transplantés hépatiques (TH)

315 patients ont pu bénéficier d'une transplantation hépatique au CHU de Grenoble de 1986 à mai 2010. 169 patients sont encore suivis au CHU en 2010 et possèdent un sérum datant de moins de un an stocké au laboratoire de virologie. Les sérums pré-transplantation de 81 de ces patients sont disponibles grâce à la banque de sérums du laboratoire datant de 2005.

Initialement, une recherche systématique des marqueurs sérologiques et moléculaires en pré et post-transplantation parmi ce groupe est réalisée. Les premières données de séroprévalence sont ainsi décrites complétées par les données épidémiologiques et cliniques disponibles.

Dans un second temps, dans le but de préciser et d'identifier d'éventuelles infections ou réactivations virales survenues lors du suivi post-transplantation, une recherche clinico-biologique est réalisée autour des cas positifs en IgG et/ou IgM en pré et/ou post-transplantation. Elle repose sur la recherche d'une cytolyse et/ou d'une cholestase hépatique inexplicée ou de lésions suspectes sur les ponctions-biopsies hépatiques réalisées tout au long du suivi post-transplantation. En parallèle, une recherche complémentaire des marqueurs sérologiques et moléculaires du virus est réalisée sur les sérums disponibles au laboratoire. L'histoire médicale des patients pour lesquels une infection par le VHE est confirmée est ensuite présentée sous forme de cas cliniques.

Les données démographiques et clinico-biologiques associées aux patients de cette étude sont issues du système informatisé de l'hôpital.

En parallèle, une population témoin anonymisée de 221 personnes est testée en IgG anti-VHE afin d'estimer la séroprévalence locale du VHE. Ces sérums ont été prélevés en 2011 lors de consultations de membres du personnel de l'hôpital en médecine du travail.

Les sérums sont conservés à -20°C.

3.4.3 Analyse statistique

La médiane et son écart interquartile ou IQR (Interquartile range) sont utilisés comme paramètres statistiques descriptifs des 2 populations étudiées. L'IQR correspond à la différence entre le troisième (IQR3) et premier quartile (IQR1).

Les données sont analysées grâce au logiciel Stata V11.1 (StataCorp 4905 Lakeway Drive, Texas, Etats-Unis). Les variables sont analysées par le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Une régression logistique est utilisée pour confirmer si une donnée épidémiologique prédit la présence de l'évènement recherché.

4 Résultats

4.1 Evaluation des caractéristiques de la RT-PCR temps réel

4.1.1 Choix de la technique et spécificité des amorces et de la sonde

4.1.1.1 Emplacement des amorces et sondes

Dans l'ORF 3, les amorces et sondes ont été choisies dans des zones peu variables comme le montre l'alignement de différents génotypes (cf figure 8).

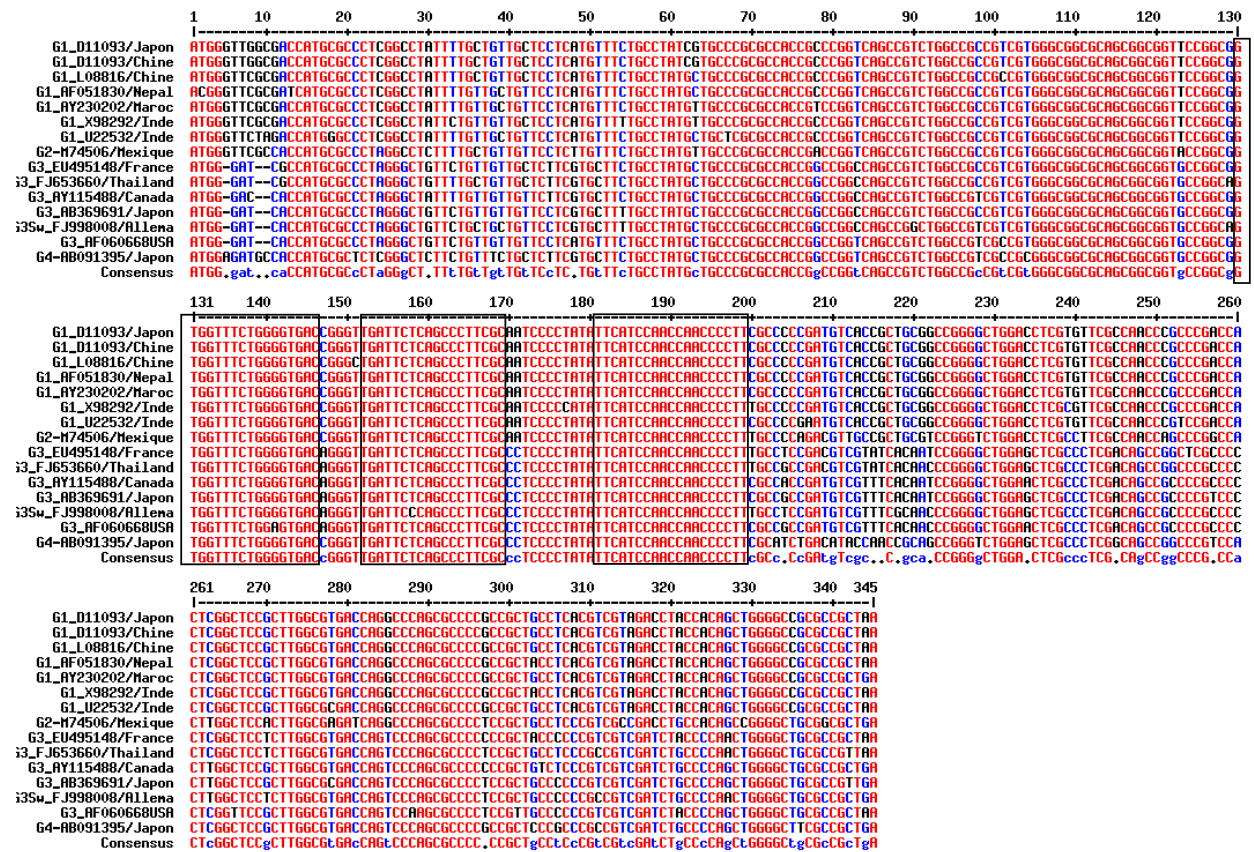


Figure 8 : Alignement des séquences correspondant à l'ORF3 du VHE pour différents génotypes. Les séquences sont notées selon leur génotype « Gx », leur n° d'accès pubmed/ le pays d'origine du patient. Sw : swine (singe porcine). Les amorces et sondes décrites dans Jothikumar et al. et al. sont encadrées en noir. Les bases rouges sont les bases conservées dans toutes les séquences, les bleues celles présentées dans la majorité des séquences en cas de différence et les noires, les minoritaires.

La mise en route du protocole selon les conditions définies initialement permet une détection du virus de l'hépatite E chez les 3 patients connus positifs confirmés par le CNR. Tous sont de génotypes 3. Les Ct obtenus sont de 32,5, 33,01, et 37,37. Les courbes d'amplification des 3 patients sont présentées sur la figure 9A.

Deux autres souches de géotypes 1, sous-types a et e, qui nous ont été fournies par le CNR sont également détectées. Les courbes d'amplification sont présentées sur la figure 9B. Les Ct obtenus sont de 27 et 30 pour les souches de géotype 1e et 1a respectivement.

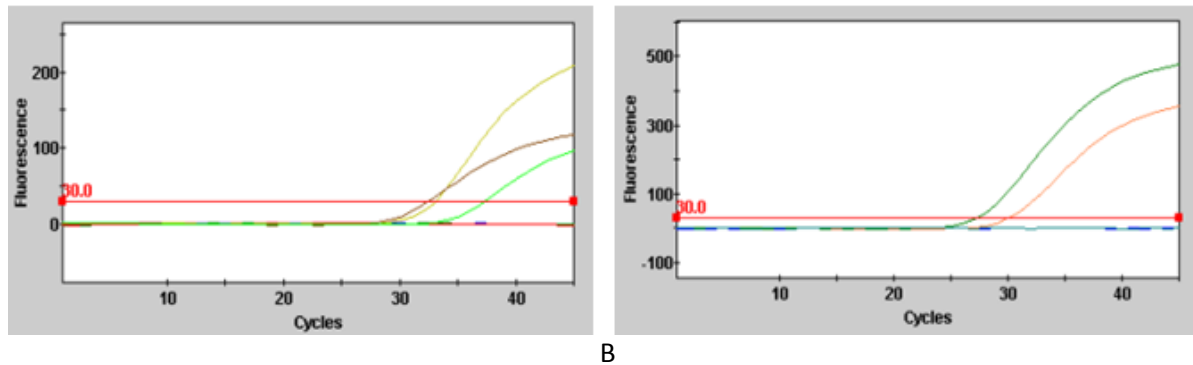


Figure 9 : Courbes d'amplification des différents sérums disponibles au laboratoire.
 A : Amplification de l'ARN du VHE pour les 3 sérums positifs connus de géotype 3 et B : Amplification des souches de géotype 1a et 1 e (courbe verte : géotype 1a, courbe rouge : géotype 1 e).

4.1.1.2 Spécificité des amorces et sonde

L'analyse par BLAST sur la base nucléotidique du NCBI des amorces et de la sonde décrites par Jothikumar *et al* permet d'obtenir, pour l'amorce sens, du VHE pour les 185 premiers alignements un pourcentage de similarité de 100% et une E Value à 0.89 (cf. figure 10). Le premier organisme non VHE est donc en 186^{ème} position, il s'agit du gène humain 15q21.1 (Genbank AC090527.3) mais le pourcentage de similarité chute à 94 % et la E value augmente à 3.4 puis à 14 pour les alignements suivants. Pour l'amorce anti-sens, on commence à trouver d'autres organismes que le VHE en 185ème position et le pourcentage de similarité chute de 100% avec le VHE à 94% et la E Value varie également de 0.87 à 3.4 puis à 14 à partir du 220^{ème} alignement. Le même résultat est retrouvé pour la sonde où la première séquence non VHE est retrouvée en 193^{ème} position. Par ailleurs, lorsque l'on demande au logiciel d'exclure le VHE de la recherche, il affiche qu'il ne trouve aucune similarité.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 311103054 HM623777.1	Hepatitis E virus strain sw11_4bAT ORF2 and ORF3 genes, partial cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 311103051 HM623776.1	Hepatitis E virus strain sw10_04AT ORF2 and ORF3 genes, partial cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 311103048 HM623775.1	Hepatitis E virus strain sw7aAT ORF2 and ORF3 genes, partial cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 311103045 HM623774.1	Hepatitis E virus strain sw7_1AT ORF2 and ORF3 genes, partial cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 289429404 GU117636.1	Swine hepatitis E virus isolate Sw28IT RNA-dependent RNA polymerase g	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 308197319 HM439284.1	Hepatitis E virus isolate EchZ20, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 308194256 HM439285.1	Hepatitis E virus isolate EchN22 capsid protein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 257786025 FJ641990.1	Hepatitis E virus isolate Ch-MD-hu1 capsid protein gene, complete cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 301324163 GU119961.3	Swine hepatitis E virus isolate CHN-XJ-SW13, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 298354346 AB521806.1	Hepatitis E virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: JYN-Shi	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 298354342 AB521805.1	Hepatitis E virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: JKS-Shi	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 285013657 GU361892.1	Swine hepatitis E virus strain hb-3, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 281333772 GU206559.1	Hepatitis E virus isolate bjsw1, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 257786053 FJ641994.1	Hepatitis E virus isolate Ch-MD-sw1 capsid protein gene, complete cds	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 270272108 GU188851.1	Swine hepatitis E virus isolate WH09, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 255529342 FJ956757.1	Hepatitis E virus isolate HEV_RK1, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 238810604 AB480825.1	Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, genotype 4, isolate: HE	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 237874129 AB437318.1	Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, genotype 3, isolate: JE	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 237874125 AB437317.1	Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, genotype 3, isolate: JE	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 226693068 FJ527832.2	Hepatitis E virus isolate SAAS-JDY5, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 224949436 FJ763142.1	Hepatitis E virus isolate KNIH-hHEV4, complete genome	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 223670945 AB481222.1	Swine hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isolate: swJR-P5	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 223670941 AB481228.1	Swine hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isolate: swJB-ME	36.2	36.2	100%	0.89	100%
gi 223670937 AB481227.1	Swine hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isolate: sw1R-H7	36.2	36.2	100%	0.89	100%

Figure 10 : Exemple des premiers résultats du BLAST de l'amorce sens.

Résultats obtenus sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) versus la base de données « nucleotide collection ».

La spécificité de la technique est ensuite évaluée sur 13 prélèvements négatifs pour le VHE mais positifs pour d'autres virus pouvant être à l'origine de cytolyses aiguës. Aucun des échantillons testés par le protocole de RT-PCR temps réel spécifique du VHE n'est positif. En revanche tous sont positifs pour le gène de contrôle de la GAPDH entre $2,13 \times 10^2$ à $1,50 \times 10^5$ copies/ml. Aucune interférence entre la présence de virus responsables de cytolyses hépatiques et la RT-PCR du VHE n'est donc mis en évidence (cf. tableau 6).

Tableau 6 : Evaluation de la spécificité de la technique de RT-PCR temps-réel pour le VHE.

Virus testé (type de prélèvement)	Nombre de prélèvements	Nombre de RT-PCR VHE positives
VHA (sérum)	1	0
VHB (sérum)	2	0
VHC (sérum)	2	0
VIH (sérum)	2	0
CMV (sérum)	2	0
EBV (sérum)	2	0
Entérovirus (selles)	2	0

4.1.2 Validation de la technique

4.1.2.1 Efficacité de l'amplification

Les droites de régression obtenues avec la gamme de transcrits ORF3, établies sur 6 points (5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 et 5×10^2 et 100 copies/ml), passés trois fois dans 4 séries différentes nous ont permis de déterminer une efficacité de PCR à 1.8 (cf. figure 11).

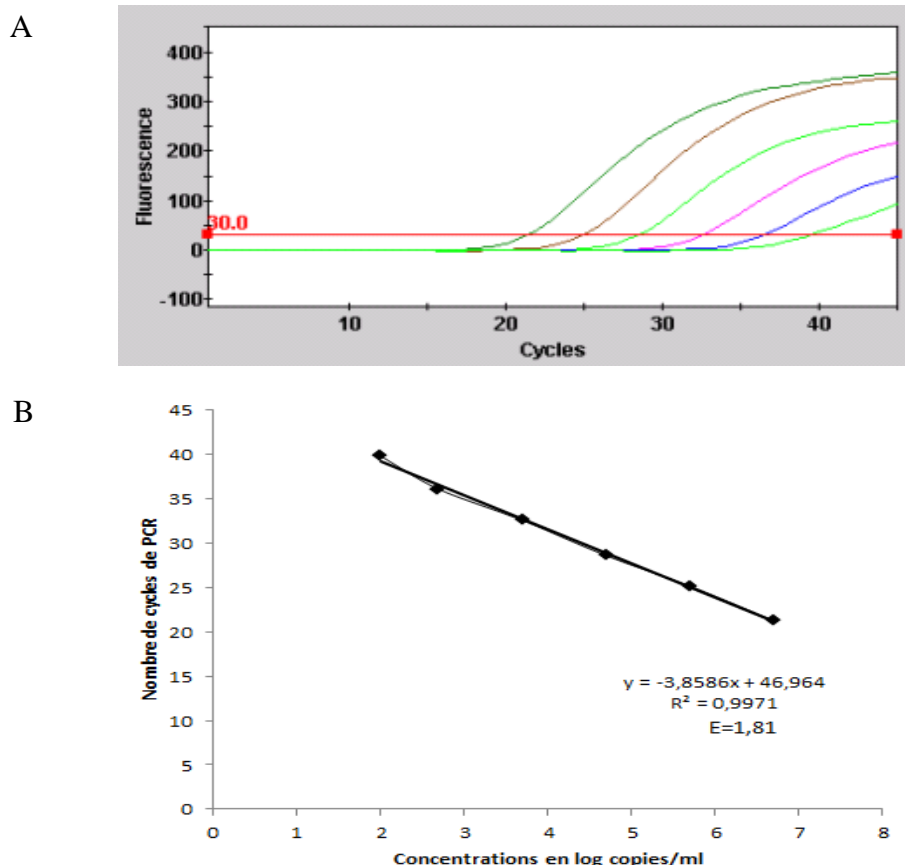


Figure 11 : Exemple d'amplification de la gamme de quantification.

A : Intensité de fluorescence en ordonnée et nombre de cycle de PCR en abscisse et B : droite de régression obtenues avec les points de gamme exprimée en logarithme des concentrations en fonction du Ct. (courbe verte foncée : 5×10^6 log copies/ml, rouge : 5×10^5 , verte claire : 5×10^4 , rose : 5×10^3 , bleue : 5×10^2 puis verte claire : 100).

4.1.2.2 Linéarité et limite de détection

Le coefficient de régression linéaire moyen, obtenu pour les 4 droites de régression allant de 5×10^6 à 100 copies/ml, est de 0,99. Si on inclut les valeurs basses de 50 et 25 copies, il diminue à 0,98.

Les coefficients de variation des Ct (ou cycles seuils de détection), établis pour chaque point des 4 gammes, montre des variations inférieures à 2.5% jusqu'à 100 copies/ml mais qui, au-delà,

augmentent à 4.5% (cf. tableau 7). Le seuil de quantification de la technique où l'on constate une perte de linéarité de la détection des points de gamme est donc fixé à 100 copies/ml.

Tableau 7 : Linéarité de la technique et seuil de quantification.

Témoin VHE (copies/ml)	Témoin VHE (log copies/ml)	Min (Ct)	Max (Ct)	Moyenne (Ct)*	Ecart-type (Ct)*	Coefficient de variation (%)*
5,00E+06	6,69	21,18	21,35	21,27	0,08	0,39
5,00E+05	5,69	24,86	25,3	25,14	0,16	0,64
5,00E+04	4,69	28,38	29,16	28,61	0,25	0,87
5,00E+03	3,69	32,11	33,1	32,54	0,29	0,89
1,00E+03	3	34,74	36,3	35,26	0,43	1,23
500	2,69	35,15	37,37	36,15	0,64	1,77
250	2,39	36,88	38,14	37,57	0,42	1,11
100	2	38,13	41,34	39,78	1,01	2,54
50	1,69	39,23	44,87	41,43	2,03	4,89
25	1,39	40,7	44,04	42,34	1,41	3,34

*réalisés sur 4 expériences indépendantes.

La limite de détection de la technique est de 50 copies/ml. En effet la concentration de 25 copies/ml n'est détectée que 2 fois/9 passages ce qui fait un pourcentage de détection de 11% (cf. tableau 8).

Tableau 8 : Limite de détection de la technique.

Témoin VHE (copies/ml)	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Taux succès
100	9	9	100%
75	9	9	100%
50	9	9	100%
25	9	2	11%

4.1.2.3 Répétabilité

La répétabilité de la technique est évaluée sur 3 niveaux de concentration de transcrits VHE testés 4 fois dans une même expérience (cf tableau 9).

Tableau 9 : Répétabilité de la technique.

Témoin VHE (copies/ml)	Témoin VHE (Log copies/ml)	Moyenne (Ct)	Ecart-type (Ct)	Coefficient de variation (%)
5E+05	5,69	25,14	0,12	0,45
5E+03	3,69	32,54	0,05	0,15
100	2	39,38	1,10	2,77

Le coefficient de variation du Ct est faible pour les 3 valeurs et est comparable avec le coefficient de variation déjà trouvé pour le test de concentration basse de 100 copies/ml.

4.1.2.4 Reproductibilité

La reproductibilité a été testée sur 3 niveaux de concentration de transcrits VHE lors de 4 séries réalisées par 4 opérateurs différents. Deux lots de kit d'amplification différents ont été utilisés (cf tableau 10).

Tableau 10 : Reproductibilité de la technique.

Témoin VHE (copies/ml)	Témoin VHE (log copies/ml)	Moyenne (Ct)	Ecart-type (Ct)	Coefficient de variation (%)
5E+05	5,69	25,09	0,08	0,3
5E+03	3,69	32,49	0,20	0,6
100	2	39,86	0,91	2,3

Le coefficient de variation du Ct est faible pour les 3 valeurs et est comparable avec le coefficient de variation déjà trouvé pour le test de concentration basse de 100 copies/ml.

4.2 Etudes cliniques

4.2.1 Population de co-infectés VIH-VHC RIBAVIC

4.2.1.1 Caractéristiques de la population

Les données démographiques des 111 patients issus de la cohorte ANRS HC02 RIBAVIC au moment de leur inclusion dans le protocole thérapeutique sont précisées dans le tableau 11.

La population testée est constituée de 69% d'hommes (sex-ratio à 2,3). L'âge médian des patients est de 39 ans (IQR= 5). 78,4% sont originaires de France et 16,2% sont issus d'autres pays du bassin méditerranéen. 57% des patients testés pour le VHE dans cette étude ont été recrutés dans des centres hospitaliers ou hospitalo-universitaires du nord de la France. La région sud de la France, comprenant les principaux centres autour des villes de Marseille et de Toulouse, représente ainsi 43% de la population étudiée.

84 patients inclus dans cette étude se sont contaminés par toxicomanie avec le VIH et/ou le VHC. Ils ont un âge médian de 39 ans. 63% sont des hommes, 23% ne sont pas nés en France et 45% d'entre eux (38 patients) sont suivis dans le sud de la France.

Tableau 11 : Démographie des 111 patients issus de la cohorte ANRS HC02 RIBAVIC, France, 2000-2002 testés pour le VHE.

Sexe					
	N=111				
Sex-ratio	2,3 (77/34)				
Age (années)					
	N=111	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		39	36-41	5	27-54
Origine géographique					
	N=111	%			
France	87	78,4			
Bassin méditerranéen	18	16,2			
Afrique Noire	2	1,8			
Asie	1	0,9			
Autres	3	2,7			
Centres de recrutement					
	N=111	%			
Nord	63	56,8			
Sud	48	43,2			

Les données cliniques et biologiques des patients co-infectés par les virus du VIH et du VHC, lors de leur inclusion dans le protocole thérapeutique ANRS-HC02-RIBAVIC, sont détaillées dans le tableau 12.

L'ancienneté moyenne de l'infection par le VIH est de 12 ans avec une majorité de patients connaissant leur statut depuis au moins 10 ans. L'ancienneté du diagnostic concernant le VHC est plus importante avec une médiane de 16 ans et un statut connu positif variant principalement de 13 à 20 ans.

Concernant le VIH, la majorité des patients (85,6%) de cette étude sont à un stade A et/ou B de la classification d'Atlanta. Peu de patients (14,4%) ont atteints le stade Sida. De plus, les taux de CD4 sont supérieurs à 350/mm³ pour 75% des patients, supérieurs à 500/mm³ dans 49% des cas. Les charges virales du VIH sont inférieures à 400 copies/ ml pour 68,5% des patients.

87.4% des patients de cette étude bénéficient d'un traitement antirétroviral. Les 14 cas non traités correspondent à des stades A.

Concernant le virus de l'hépatite C, 46.9 % des patients de cette étude sont infectés par un virus de génotype 1 et 39,6% de génotype 3. Les enzymes hépatiques sont augmentées jusqu'à 2,5 fois la normale pour la majorité des patients. La médiane des charges virales C est de 5,9 log copies/ml (IQR=1). La plupart des patients (71.6%) ont un score Métavir de fibrose ou d'activité inférieur ou égal à 2.

Tableau 12 : Données cliniques et biologiques des 111 patients co-infectés VIH-VHC lors de leurs inclusions dans le protocole thérapeutique ANRS-HC02-RIBAVIC.

Infection par le VIH					
Ancienneté de l'infection VIH (années)	N=111	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		12	9,6-14,2	4,58	0,7-18,4
Mode de contamination VIH	N=111	%			
Toxicomanie	75	67,6			
Hétérosexuel	19	17,1			
Homo/bisexuel	4	3,6			
Hémophilie	7	6,3			
Transfusion	6	5,4			
Stades CDC (Atlanta 1993)*	N=111	%			
A	55	49,6			
A1	27	24,3			
A2	28	25,3			
A3	0	0			
B	40	36			
B1	18	16,2			
B2	21	18,9			
B3	1	0,9			
C	16	14,4			
C1	9	8,1			
C2	6	5,4			
C3	1	0,9			
Taux de CD4 (par mm³)	N=111	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		495	347,5-623	275,5	177-1259
Charge virale VIH (copies/ml)	N=111	%			
<400	76	68,5			
>400	35	31,5			

Charge virale VIH > à 400 renseignées (copies/ml)	N=35	Médiane 2120	IQR1-IQR3 870-7822	IQR 6952	Min-Max 466-75000
Thérapeutique antirétrovirale**	N=111	%			
NRTI	96	86,5			
PI	44	36,6			
NNRTI	41	36,9			
Aucun	14	12,6			
Infection par le VHC					
Ancienneté de l'infection VHC (années)	N=111	Médiane 16	IQR1-IQR3 13-20	IQR 7	Min-Max 0-30
Mode de contamination VHC	N=111	%			
Toxicomanie	84	75,7			
Transfusion	12	10,8			
Inconnu	10	9			
Autre	5	4,5			
Génotypes VHC	N=111	%			
1	52	46,9			
2	3	2,7			
3	44	39,6			
4	12	10,8			
Taux des ALAT (X Normal)	N=111	Médiane 1,7	IQR1-IQR3 1,1-2,6	IQR 1,5	Min-Max 0,4-7,7
Taux des ASAT (X Normal)	N=111	Médiane 1,7	IQR1-IQR3 1,1-2,4	IQR 1,3	Min-Max 0,3-8,3
Charge virale VHC (log copies/ml)	N=111	Médiane 5,9	IQR1-IQR3 5,4-6,4	IQR 1	Min-Max 3,8-7,2
Score METAVIR	N=109	%			
A1 ou 2 et F1 ou 2	78	71,6			
A1 ou 2 et F3 ou 4	31	28,4			
Stéatose***	N=109	%			
<30%	79	72,5			
30-70%	23	21,1			
>70%	7	6,4			

*Les stades 1, 2, 3 issus de la classification CDC d'Atlanta de 1993 en fonction des CD4 sont : A1 : >500 CD4/mm³, A2 : 200-499 CD4/mm³, A3 : < 200 CD4/mm³.

**NRTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, PI : inhibiteur de protéase, NNRTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

***Les stades utilisés pour grader la stéatose hépatique (grade I, II et III) reposent sur les données de l'article : ANRS HC 02 RIBAVIC : impact de la stéatose au cours de la co-infection VIH-VHC, S. Pol *et al.* [150].

4.2.1.2 Résultats sérologiques et moléculaires pour le VHE

Le tableau 13 présente les résultats des marqueurs sérologiques et moléculaires pour le VHE des 111 patients issus de la cohorte ANRS-HC02-RIBAVIC.

Aucun sérum ne révèle la présence d'IgM et seuls 3 patients présentent des IgG anti-VHE avec des index de 1,4, 3,4, 1,1 en faveur d'un contact ancien avec le virus. Ces 3 sérums ont été contrôlés (index de 1,3, 2,3, 1,2 respectivement). La séroprévalence obtenue parmi la population des co-infectés VIH-VHC est donc de 2,7%.

Si l'on restreint la population aux seuls patients connus toxicomanes ayant été contaminés par le VIH et/ou le VHC la séroprévalence est de 3,6% (3/84). La séroprévalence chez les toxicomanes inclus dans le sud de la France est de 5,3% (2/38)

La recherche d'ARN du VHE est négative pour les 111 patients. L'amplification de l'ARNm de la GAPDH utilisée comme contrôle de qualité du prélèvement donne des valeurs comprises entre 102 et 1550 copies/ml.

Tableau 13 : Résultats sérologiques et moléculaires en VHE des patients issus de la cohorte ANRS-HC02-RIBAVIC à J0.

	IgG VHE	IgM VHE	ARN VHE
Présence	3 (2,7%)	0	0
Absence	108	111	111
Total	111	111	111

Concernant les 3 patients ayant des anticorps anti VHE, le premier est un homme âgé de 39 ans, d'origine française et suivi à Marseille (Provence-Alpes-Côte d'Azur). Son statut VIH est connu depuis 8 ans. Il est au stade C de la maladie avec des CD4 à 498/mm³ et une charge virale à 5160 copies/ml. Il est sous traitement antirétroviral avec 3 NRTI. Il est infecté par le VHC depuis 10 ans par une souche de génotype 1a. Ses enzymes hépatiques sont augmentées (ALAT : 3,5N, ASAT : 1,6N), sa charge virale en VHC est à 6,68 log copies/ml et la ponction biopsie hépatique montre un parenchyme hépatique évalué au stade Métavir A1F3 sans stéatose.

Le second patient est un homme âgé de 35 ans, d'origine française suivi à Charleville (Champagne-Ardenne). Son statut VIH est connu depuis 14 ans. Il est au stade B de la maladie avec des CD4 à 578/mm³ et une charge virale à 2710 copies/ml. Il est sous tri-thérapie avec 2 NRTI et 1 IP. Il est infecté par le VHC depuis 17 ans par une souche de génotype 1a. Ses

enzymes hépatiques sont augmentées (ALAT : 1,6N, ASAT : 1,2N), sa charge virale en VHC est à 6,5 log copies/ml et la ponction biopsie hépatique montre un parenchyme hépatique évalué au stade Métavir A2F2 sans stéatose.

Enfin, le dernier patient est une femme de 38 ans suivie à Toulouse (Midi-Pyrénées) originaire du bassin méditerranéen. Son statut VIH est connu depuis 15 ans. Elle est au stade B de la maladie avec des CD4 à 586/mm³, une charge virale inférieure à 400 copies/ml. Elle ne poursuit aucun traitement antirétroviral. Elle est infectée par le VHC depuis 15 ans par une souche de génotype 4. Ses enzymes hépatiques sont à des taux normaux, sa charge virale en VHC est à 6,2 log copies/ml et la ponction biopsie hépatique montre un parenchyme hépatique évalué au stade Métavir A2F2 sans stéatose.

Ces 3 patients présentant des IgG anti-VHE ont contracté le VIH et/ou le VHC par toxicomanie.

4.2.2 Patients transplantés hépatiques

4.2.2.1 Caractéristiques de la population

Les données démographiques et cliniques de la population des transplantés hépatiques du CHU de Grenoble inclus dans cette étude sont présentées dans le tableau 14.

Il s'agit majoritairement d'hommes (76%). Le sex-ratio est de 3,2 en post-transplantation et 3,5 en pré-transplantation.

L'âge médian en post-transplantation est de 60 ans (IQR=14) avec des extrêmes variant de 20 à 79 ans. 20 patients ont moins de 45 ans. L'âge médian au moment de la transplantation est de 56 ans (IQR=11 ans).

Les patients sont principalement d'origine française (71,6%). 16% sont originaires d'Europe et 10,7% du bassin méditerranéen.

Environ la moitié des patients (56,8%) vivent en milieu rural en post-transplantation. La population testée en pré-transplantation vit plus fréquemment en milieu urbain (60,5%).

Le délai médian entre la transplantation et le dernier sérum disponible est de 4 ans. 18,8% des patients ont été testés à moins de un an de leur transplantation, 31,4% à moins de 4 ans. Le délai minimum entre le test et la transplantation est de 4 mois pour les patients transplantés début 2010.

La principale étiologie liée à la transplantation hépatique est l'éthylisme chronique (53,8%) puis viennent les hépatites virales B et C (33,7%). Les autres étiologies regroupent des atteintes auto-

immunes ou des pathologies d'origines diverses. 18/21 formes mixtes correspondent à l'association d'un éthyisme chronique avec une atteinte virale B ou C.

La plupart des patients sont traités par tacrolimus.

Tableau 14 : Données épidémiologiques et cliniques des transplantés hépatiques testés suivis au CHU de Grenoble en pré et post-transplantation.

	Post-transplantation (Post-T)		Pré-transplantation (Pré-T)		
Sexe	N=169		N=81		
Sex-ratio	129/40	3,2	63/18	3,5	
Age post-T (années)	N=169	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		60	51-65	14	20-79
Age pré-T (années)	N=81	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		56	49-60	11	28-68
Origine géographique	N=169	%	N=81	%	
France	121	71,6	56	69,2	
Europe	27	16	18	22,2	
Bassin méditerranéen	18	10,7	6	7,4	
Afrique	1	0,6	0	0	
Asie	2	1,1	1	1,2	
Lieu de vie	N=169	%	N=81	%	
Rural	96	56,8	32	39,5	
Urbain*	73	43,2	49	60,5	
Intervalle TH-test VHE (années)	N=169	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	Min-Max
		4	1,1-8,9	7,8	0,3-24,4
Etiologies	N=169	%	N=81	%	
OH	91	53,8	50	61,7	
VHB	21	12,4	10	12,3	
VHC	36	21,3	21	25,9	
MAI**	11	6,5	3	3,7	
Autres***	31	18,3	10	12,3	
mixtes	21	12,4	13	16	
Co-transplantations	N=169	%	N=81	%	
Rein	7	4,1	1	1,2	
Thérapeutiques	N=169	%	N=81	%	
<u>Anticalcineurines</u>	159	94	77	95,1	
Tacrolimus	134	79,3	69	85,2	
Ciclosporine	25	14,8	8	9,9	

<u>I de mTOR</u>	9	5,32	4	4,9
Sirolimus	8	4,7	3	3,7
Everolimus	1	0,6	1	1,2
<u>Antimétabolites</u>	71	42	37	45,7
Myfortic®	3	1,8	1	1,2
Cellcept®	67	39,6	36	44,4
Imurel®	1	0,6	0	0
<u>Corticoïdes</u>	3	1,8	0	0

*Les critères définissant une zone urbaine regroupent les villes de plus de 10 000 habitants et/ou la périphérie proche d'agglomérations régionales.

**Les maladies auto-immunes (MAI) incluent des pathologies de type: cirrhose biliaire primitive, hépatite auto-immune, cholangite sclérosante primitive et cirrhose auto-immune.

**Les autres cas incluent des pathologies d'origines diverses: congénitale, vasculaire, toxique, métabolique ou indéterminée.

4.2.2.2 Séroprévalence pour le VHE de la population témoin

Une population témoin de 221 personnes issues du personnel de l'hôpital a été testée en sérologie pour le VHE (âge médian :38 ans, sex-ratio : 0,3). 12 d'entre eux présentent des IgG anti-VHE. Ainsi, la séroprévalence obtenue au sein de la population témoin est de 5,4%.

4.2.2.3 Marqueurs sérologiques et moléculaires du VHE en pré et post-transplantation

Les résultats obtenus en marqueurs sérologiques pour le VHE au sein de la population des transplantés hépatiques en post-transplantation et pré-transplantation sont présentés dans le tableau 15.

13 soit 7,7% des patients possèdent des IgG anti-VHE en post-transplantation. 5 patients présentent des IgM en post-transplantation à des index variant de 1,3 à 5,4 (moyenne : 3, écart-type : 1,9) dont 3 associées à des IgG. En pré-transplantation, 8 patients possèdent des IgG sans IgM.

La recherche systématique d'une virémie du VHE en pré et post-transplantation s'est révélée négative. La recherche quantitative de l'ARNm de la GAPDH comme contrôle de la qualité des sérums montre des valeurs comprises de 5×10^4 à $1,5 \times 10^5$ copies/ml.

Tableau 15 : Marqueurs sérologiques pour le VHE chez les transplantés hépatiques en pré et post-transplantation.

	IgG post-T (%)	IgM post-T (%)	IgG pré-T (%)	IgM pré-T (%)
Présence	13 (7,7%)	5 (3%)	8 (9,9%)	0
Absence	156	164	73	81
Total	169	169	81	81

4.2.2.4 Séroprévalence pour le VHE des transplantés hépatiques

La séroprévalence du VHE au sein de la population des transplantés hépatiques suivis au CHU de Grenoble en 2010 est de 7,7% ce qui n'est pas significativement différent de la population témoin ($p=0,1830$). La séroprévalence en pré-transplantation, estimée sur un plus faible échantillon, est de 9,9% ($p=0,0889$).

Les principales données de séroprévalence selon les informations démographiques et cliniques des 169 patients étudiés en post-transplantation et des 81 en pré-transplantation sont détaillées dans le tableau 16.

Les IgG anti-VHE en post-transplantation sont plus fréquentes chez l'homme (9 hommes versus 4 femmes). En pré-transplantation, ce sont 5 femmes versus 3 hommes qui possèdent des IgG anti-VHE ($p= 0,011$).

Les âges des patients positifs en IgG anti-VHE en post-transplantation sont significativement plus élevés ($>$ à 52 ans) ($p= 0,021$) avec un âge moyen de 64 ans \pm 7 ans. En pré-transplantation, l'âge moyen des patients porteurs d'anticorps est de 61 ans \pm 5 ans.

8 patients sur les 13 détectables en IgG anti-VHE en post-transplantation sont originaires du territoire français. 3 autres patients sont originaires d'un pays européen (Italie et Portugal pour 2 patients) et 2 du bassin méditerranéen.

7 cas sur 13 vivent dans une zone rurale de moins de 10 000 habitants en post-transplantation. 6 patients sur 8 porteurs d' IgG VHE en pré-transplantation vivent en milieu urbain.

L'éthylisme chronique est la cause de la transplantation pour la majeure partie des patients immunisés contre le VHE (8 cas/13), contre deux cas chez des patients transplantés suite à une infection virale C. Les 3 derniers patients ont été transplantés suite à une polykystose hépatorenale, une cirrhose biliaire primitive et une cholangite sclérosante primitive.

Un seul patient, sur les 7 ayant eu une double transplantation foie-rein présente des IgG anti-VHE en post-transplantation. Son statut pré-transplantation est inconnu du fait d'une transplantation trop ancienne par rapport au test.

Tableau 16 : Données de séroprévalence selon les informations démographiques et cliniques recueillies parmi la population des transplantés hépatiques du CHU de Grenoble en pré et post-transplantation.

	Post-T		Pré-T	
	IgG VHE (%)	p value	IgG VHE (%)	p value
Sexe				
H	9/129 (7%)		3/63 (4.8%)	
F	4/40 (10%)	0.509 ⁽²⁾	5/18 (27.8%)	0.011 ⁽²⁾
Age				
<52 ans	0/46 (0%)		0/20 (0%)	
≥52 ans	13/123(10.6%)	0.021 ⁽²⁾	8/61 (13.1%)	0.189 ⁽²⁾
Origine géographique				
France	8/121 (6.6%)		7/56 (12.5%)	
Europe	3/27 (11.1%)	0.575 ⁽²⁾	1/18 (5.6%)	0.726 ⁽²⁾
Autres	2/21 (9.5%)	0.666 ⁽²⁾	0/7 (0%)	0.590 ⁽²⁾
Lieu vie				
Urbain	6/73 (8.2%)		6/49 (12.2%)	
Rural	7/96 (7.3%)	0.823 ⁽¹⁾	2/32 (6.3%)	0.465 ⁽²⁾
Intervalle TH-Test				
<1ans	3/31 (9.7%)		-	-
<4 ans	2/53 (3.8%)	0.372 ⁽²⁾	-	-
≥4 ans	8/85 (9.4%)	0.399 ⁽¹⁾	-	-
Etiologies				
OH alcool	8/91 (8.8%)	0.773 ⁽²⁾	5/50 (10%)	0.587 ⁽²⁾
VHB	0/21 (0%)		0/10 (0%)	
VHC	2/36 (5.6%)	0.737 ⁽²⁾	1/21 (4.8%)	0.672 ⁽²⁾
MAI	2/11 (18.2%)	0.202 ⁽²⁾	1/3 (33.3%)	0.268 ⁽²⁾
Autres	1/31 (3.3%)	1.000 ⁽²⁾	1/10 (10%)	0.251 ⁽²⁾
Co-TH	1/7 (14.3%)	0.435 ⁽²⁾	0/1 (0%)	
Traitements				
<u>Anticalcineurines</u>	13/159 (8.2%)		8/77 (10.4%)	
Tacrolimus	10/134 (7.5%)	0.733 ⁽²⁾	8/69 (11.6%)	0.596 ⁽²⁾
Ciclosporine	3/25 (12%)	0.412 ⁽²⁾	0/8 (0%)	
<u>inhibiteurs de mTOR</u>	0/9 (0%)		0/4 (0%)	
Sirolimus	0/8 (0%)		0/3 (0%)	
Everolimus	0/1 (0%)		0/1 (0%)	
<u>Antimétabolites</u>	7/71 (9.9%)		4/37 (10.8%)	
Myfortic®	1/3 (33.3%)	0.215 ⁽²⁾	0/1 (0%)	
Cellcept®	6/67 (8.9%)	0.769 ⁽²⁾	4/36 (11.1%)	0.725 ⁽²⁾
Imurel®	0/1 (0%)		0/0 (0%)	
<u>Corticoides</u>	0/3 (0%)		0/0 (0%)	

(1)Test du Chi-2, (2) Test exact de Fisher.

4.2.2.5 Recherche de cas de réactivations et d'infections virales E chez les transplantés hépatiques

Afin d'identifier la présence d'éventuelles infections ou réactivations du virus parmi la population des transplantés hépatiques suivis au CHU de Grenoble, une recherche clinico-biologique a été réalisée autour des 17 patients porteurs d'IgG et/ou IgM en pré et/ou post-transplantation. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 12.

Ces 17 patients positifs en IgG et/ou IgM sont regroupés comme suit :

- 6 patients sont positifs en anticorps IgG anti-VHE en pré et post-transplantation. L'un d'eux présente des IgM en post-greffe,
- 2 patients sont séropositifs IgG en pré-transplantation uniquement,
- 5 patients sont uniquement positifs en IgG en post-transplantation, de statut inconnu en pré-transplantation,
- 4 patients sont porteurs d'IgM en post-greffe. 2 patients présentent des IgG associées.

Les 6 patients, positifs en IgG en pré et post-transplantation sont suivis sur une médiane de 18 mois et présentent des index en IgG similaires entre les 2 tests. La recherche d'une cytololyse et/ou d'une cholestase hépatique inexplicée ou de lésions suspectes sur les ponctions-biopsies hépatiques s'avère infructueuse. L'analyse rétrospective au laboratoire des marqueurs sérologiques et moléculaires de ces 6 patients porte sur 20 sérums. Aucune réactivation n'est détectée. Une réactivité non spécifique est suspectée pour le patient positif en IgM. En effet, celui-ci présente des IgM reproductibles (index faibles) à 4 reprises sur un intervalle de 5 ans sans virémie associée. Le test rapide ASSURE ne révèle pas la présence d'IgM sur le dernier sérum testé. Aucun épisode de cytololyse n'est constaté sur la période étudiée. Une infection chronique à EBV peut être liée à cette positivité non spécifique.

Deux patients ne présentent plus d'IgG détectables en post-transplantation. Les index en IgG en pré-transplantation sont de 1,5 et 2. L'un des patients est testé à 6 mois de sa transplantation, le second à 2 ans. L'analyse de leurs dossiers médicaux ne montre pas d'élément suspect d'une infection virale E. Les marqueurs du VHE n'ont pu être recherchés par manque de sérums antérieurs.

Cinq patients séropositifs pour le VHE en post-transplantation sont de statut inconnu en pré-transplantation, l'analyse n'ayant pu être réalisée en pré-transplantation du fait d'une

transplantation trop ancienne par rapport au délai de conservation des sérums. L'intervalle du test post-transplantation est de 14 ans en moyenne et varie de 8 à 20 ans. L'analyse de leurs dossiers médicaux ne montre pas d'élément suspect d'une infection virale E.

Quatre patients présentent des IgM en post-transplantation dont 2 en présence d'IgG. L'analyse initiale de leurs dossiers médicaux se révèle négative en élément suspect d'une infection virale E. 19 prélèvements sont alors testés et mettent en évidence 3 hépatites virales E dont 2 d'évolution chronique. Ces 3 cas sont présentés sous forme de cas clinique dans le chapitre suivant.

Le 4^{ème} patient, séronégatif en pré-transplantation, présente des IgM isolées reproductibles à un an puis à 2 ans post-transplantation. Le test rapide ASSURE ne retrouve pas d'IgM sur le dernier sérum testé. Une réactivité non spécifique est suspectée devant l'absence de séroconversion et de virémie associée dans un contexte de récurrence virale C non traitée.

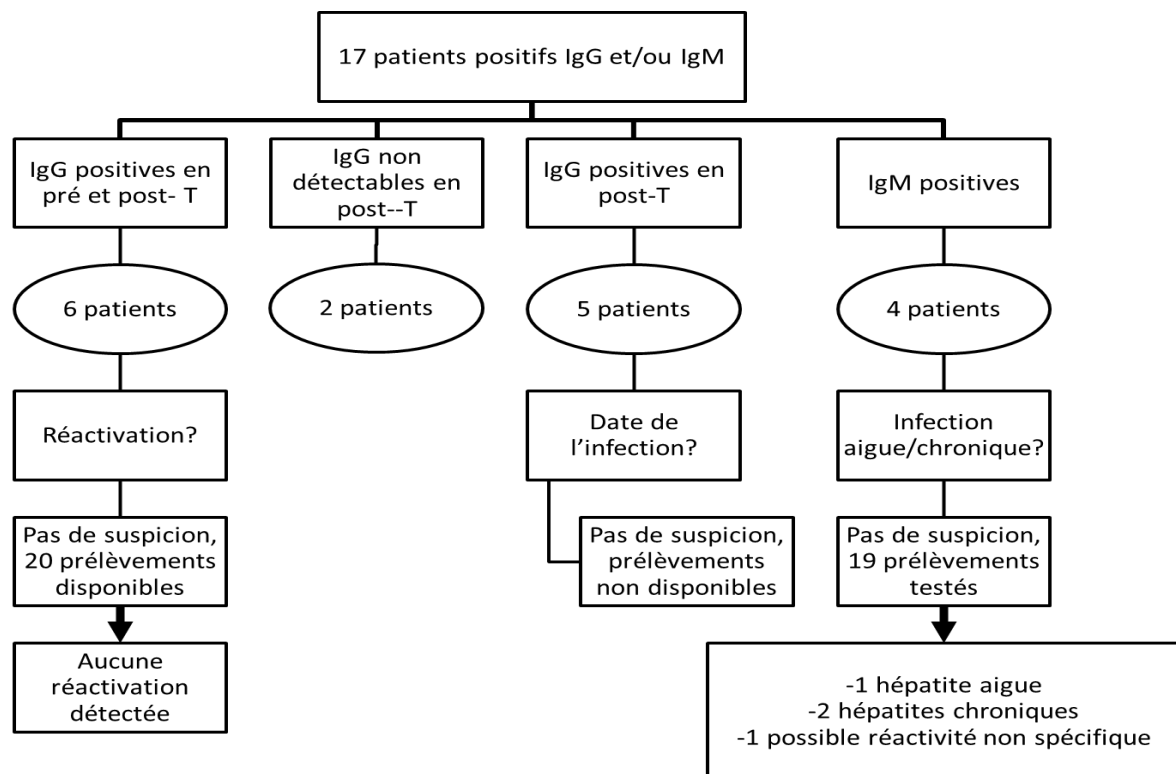


Figure 12 : Evolution des marqueurs sérologiques du virus de l'hépatite en pré et post-transplantation.

4.2.2.6 Cas cliniques

Les données clinico-biologiques des 3 patients présentant des marqueurs d'infection par le VHE sont décrites ci-dessous sous forme de cas cliniques.

Cas clinique 1

Mr A est né en France en 1957. Il vit en milieu rural et a subi une transplantation hépatique pour cirrhose éthylique en septembre 2008. Ses sérologies VHB et VHC sont négatives. Il possède un chien depuis 2007. Il consomme occasionnellement des produits à base de porc bien cuits, des crustacés et pratique régulièrement la pêche.

Depuis sa transplantation, on retient des sténoses biliaires récidivantes avec cholestase traitées par cholangiographie rétrograde, une sténose de l'anastomose artérielle d'environ 50% non traitée et un rejet cellulaire aigu minime sur PBH en décembre 2008.

En Septembre 2009, l'analyse rétrospective à la recherche d'ARN du VHE dans son sérum est positive à 250 copies/ml (cf figure 13). Le virus est de génotype 3. La recherche du virus au niveau hépatique est négative. Le patient est alors asymptomatique et son bilan biologique met en évidence une cytolyse (ALAT à 179), une cholestase (PA à 634) et des GGT à 266. Son traitement est Prograf® 1,5mg/j. La PBH montre la persistance d'un obstacle biliaire ainsi qu'une régénération parenchymateuse pouvant évoquer un problème vasculaire ou infectieux avec fibrose péri-sinusoïdale étendue, lymphocytose sinusoïdale, dystrophies hépatocytaires.

En mai 2010, une mauvaise observance thérapeutique est suspectée. Une récurrence d'obstacle biliaire est traitée. La PBH objective un rejet cellulaire aigu sur rejet chronique débutant qui est alors traité par intensification de l'immunosuppression. Une reprise de la consommation alcoolique est également suspectée sur la PBH. En septembre 2010, la RT-PCR pour le VHE est toujours positive dans le sérum. En septembre 2011, une cholestase anictérique persiste après ablation de prothèse biliaire. Seules les IgM anti-VHE sont détectées dans le sérum. Le traitement immunosuppresseur est poursuivi. La PBH ne retient pas d'argument pour une pathologie d'obstacle biliaire mais un aspect histologique évoquant toujours un rejet chronique débutant avec cholestase hépato-canaliculaire et la persistance d'un rejet cellulaire aigu discret non gradable.

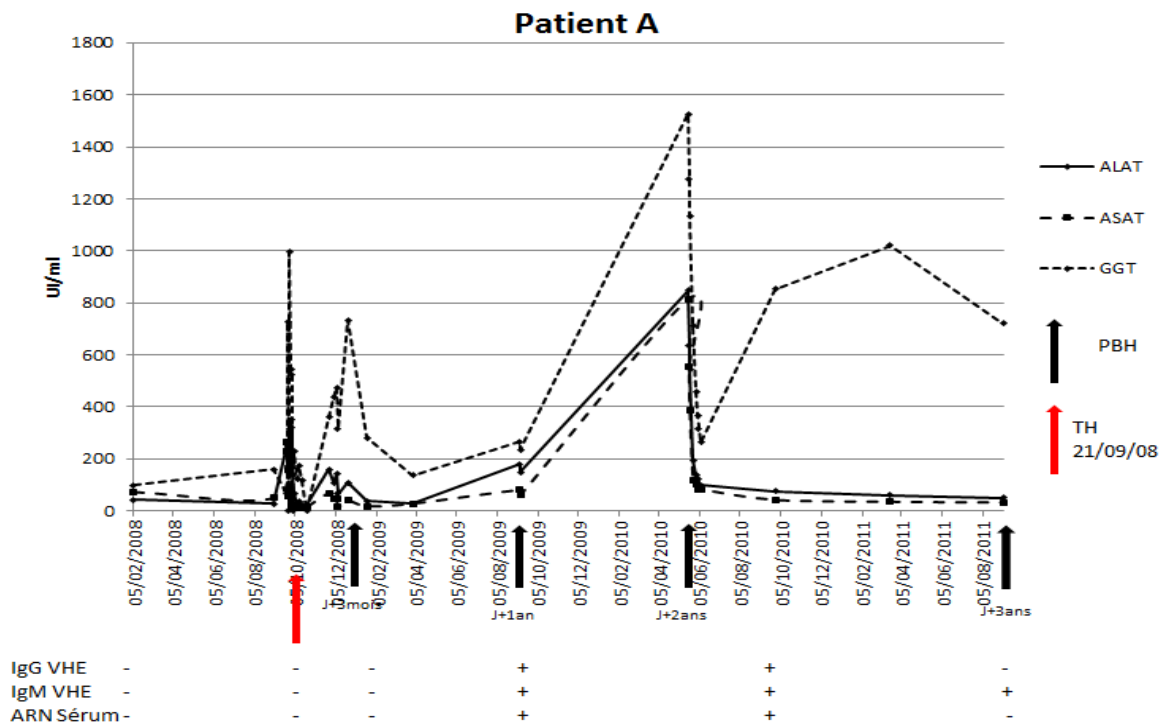


Figure 13 : Cas clinique 1 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.

La relecture de la PBH réalisée en septembre 2009 met en relief des lésions histologiques d'hépatite aiguë caractérisées par infiltrat inflammatoire lobulaire et portal à prédominance mononucléé, sans fibrose portale, suggérant une étiologie virale (figures 14 et 15).

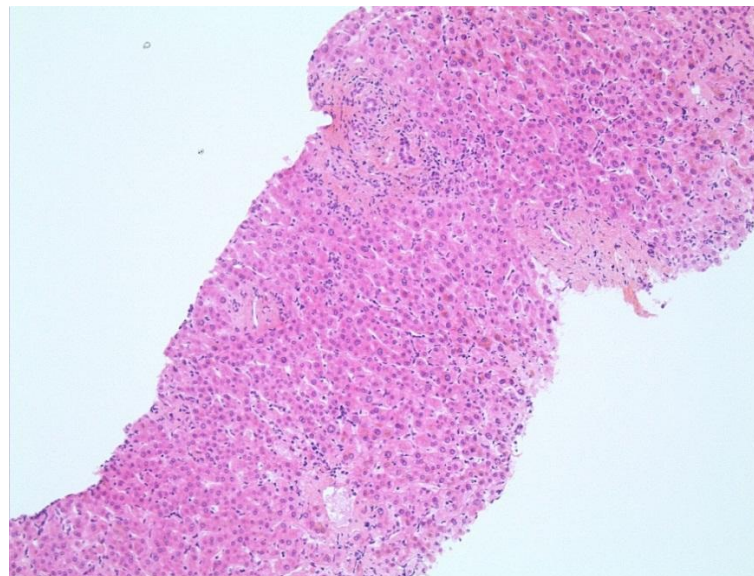


Figure 14 : Cas Clinique 1 : Lésions histologiques présentes en septembre 2009. Présence d'un infiltrat portal et lobulaire à prédominance mononucléé, sans fibrose portale. (x10)

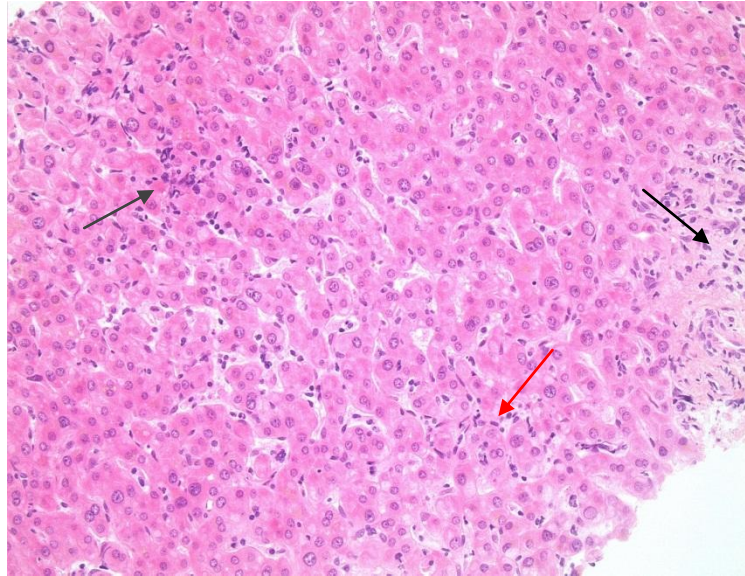


Figure 15 : Cas Clinique 1 : Lésions histologiques présentes en septembre 2009. Infiltrat portal polymorphe à prédominance mononucléé (lymphocytes, quelques histiocytes et polynucléaires neutrophiles)(→). Lymphocytose sinusoidale (→) avec quelques images de nécrose lobulaire (amas de lymphocytes au contact de corps apoptotiques de Councilman →). (x20)

La biopsie hépatique réalisée en 2010 montre des lésions d'hépatite chronique, avec une fibrose portale associée à un infiltrat inflammatoire portal à prédominance mononucléé (lymphocytes, très rares polynucléaires) respectant la lame bordante, et quelques images de nécrose lobulaire caractérisées par quelques corps apoptotiques et des amas lymphohistiocytaires parfois polymorphes.

Conclusion :

Une perturbation du bilan hépatique associée à la persistance sur plus de 6 mois d'une virémie VHE atteste d'une hépatite E chronique.

Cas clinique 2

Mr B est né en France en 1945. Il vit en milieu rural et a bénéficié d'une transplantation en 1993 pour cirrhose éthylique. Ses principaux antécédents sont un syndrome métabolique, une fibrose pulmonaire interstitielle et une insuffisance rénale iatrogène. Une hépatite auto-immune *de novo* est diagnostiquée en 2004.

En juin 2009, l'analyse rétrospective des sérums montre une séroconversion en IgG (index à 6,6) et IgM (index à 7,9) confirmée un an plus tard (cf figure 16). Le patient présente alors une obésité morbide préoccupante et son bilan biologique montre une cytolyse (ALAT à 75) associée à une cholestase (PA à 116) et des GGT à 129. Son traitement est Néoral 100mg/jour et Cellcept 1 gr/jour. En juillet 2010, l'évolution clinico-biologique est marquée par une majoration des perturbations biologiques au niveau hépatique qui conduit à la découverte de métastases hépatiques d'un carcinome endocrine à cellules intermédiaires d'origine pulmonaire. La PBH, à J+17 ans, décrit de multiples foyers carcinomateux, un aspect oedémateux et inflammatoire des espaces portes élargis (infiltrat inflammatoire, modéré à dense, mononucléé discrètement polymorphe) et une cholangite aiguë probablement due à la compression des masses tumorales. La RT-PCR hépatique à la recherche du VHE est négative. Il poursuit le même traitement. Le patient décède en aout 2010 d'un choc septique sur neutropénie fébrile post-chimiothérapie.

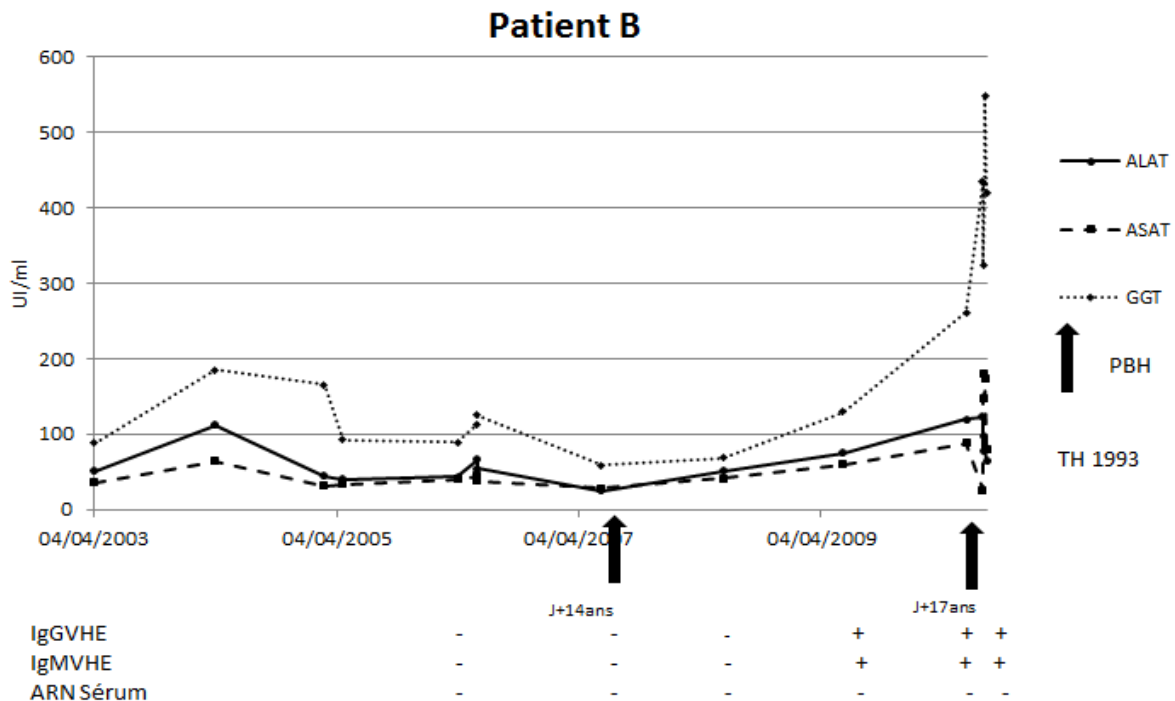


Figure 16 : Cas clinique 2 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.

Les lésions histologiques observées en juillet 2010 en zone non tumorale peuvent évoquer une hépatite active. Il existe une discrète fibrose portale renfermant un infiltrat inflammatoire abondant mononucléé riche en plasmocytes, réalisant des images de nécrose parcellaire, pouvant mimer une hépatite auto-immune (figures 17 et 18) .

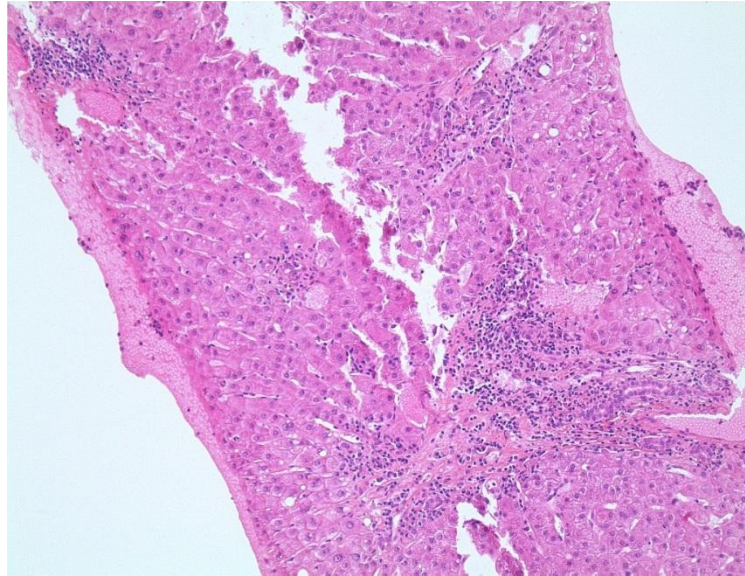


Figure 17 : Cas Clinique 2 : Lésions histologiques présentes en juillet 2010. Infiltrat inflammatoire portal réalisant des lésions de nécrose parcellaire (région périportale). (x20)

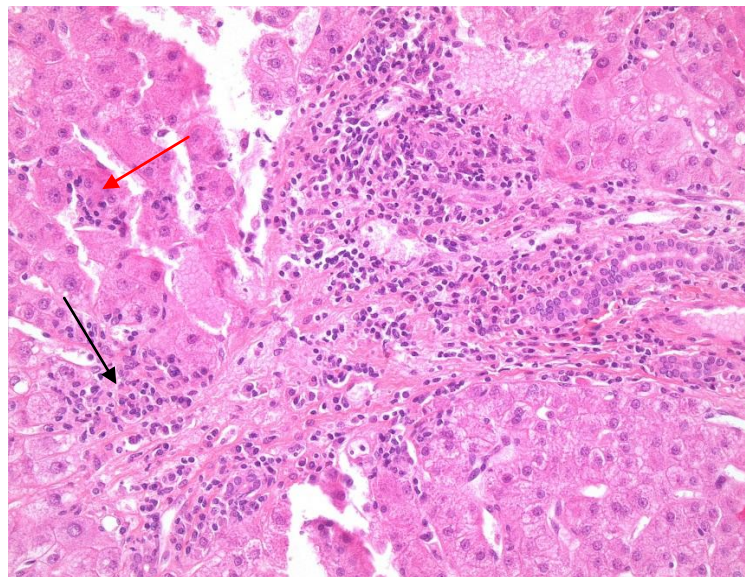


Figure 18 : Cas Clinique 2 : Lésions histologiques présentes en juillet 2010. Infiltrat portal mononucléé riche en plasmocytes réalisant des images de nécrose parcellaire (→) associées à de rares images de nécrose lobulaire (→). (x20)

Conclusion :

Une séroconversion pour le VHE en présence d'une augmentation des enzymes hépatiques traduit une probable infection aiguë malgré l'absence de virémie détectée.

Cas clinique N°3

Mr C est né en France en 1937. Il vit en milieu urbain et a été transplanté en 1994 pour cirrhose post-virale B avec CHC. Un rejet chronique en 1996 a conduit à une seconde transplantation. Il possède 2 chiens et un chat en 2006. Il consomme occasionnellement des produits à base de porc bien cuits, figatelles séchées, crustacés. Les principales antécédents du patient sont une insuffisance rénale chronique modérée et un carcinome *in situ* de vessie découvert en 2007.

Le VHE est mis en évidence en mai 2006 sur tissu hépatique (cf figure 19). En février 2007, 9 mois plus tard, il est détecté dans le sérum à 5×10^4 logcopies/ml. Le virus est de génotype 3. En mai 2006, le bilan biologique révèle une cytololyse (ALAT : 154) associée à une cholestase (PA : 162) et des GGT à 92. Le patient présente alors des douleurs abdominales avec fébricule et frissons apparus au décours d'une modification de traitement immunosuppresseur (Switch Néoral-Prograf). La PBH évoque un rejet cellulaire aigu douteux (Score de Banff : 3) sur des lésions discrètes et dissociées probablement décapitées par les modifications récentes du traitement immunosuppresseur. Une immunosuppression haute par Prograf® 1,5 mgX2/j et Cellcept® 1g/j est maintenue. L'évolution clinique est rapidement favorable. En février 2007, une suspicion de récurrence virale B est suspectée et traitée par zeffix 1 cp/j. Les marqueurs en hépatites B sont négatifs. L'évolution clinico-biologique est favorable courant 2007 de manière concomitante à une diminution progressive de l'immunodépression.

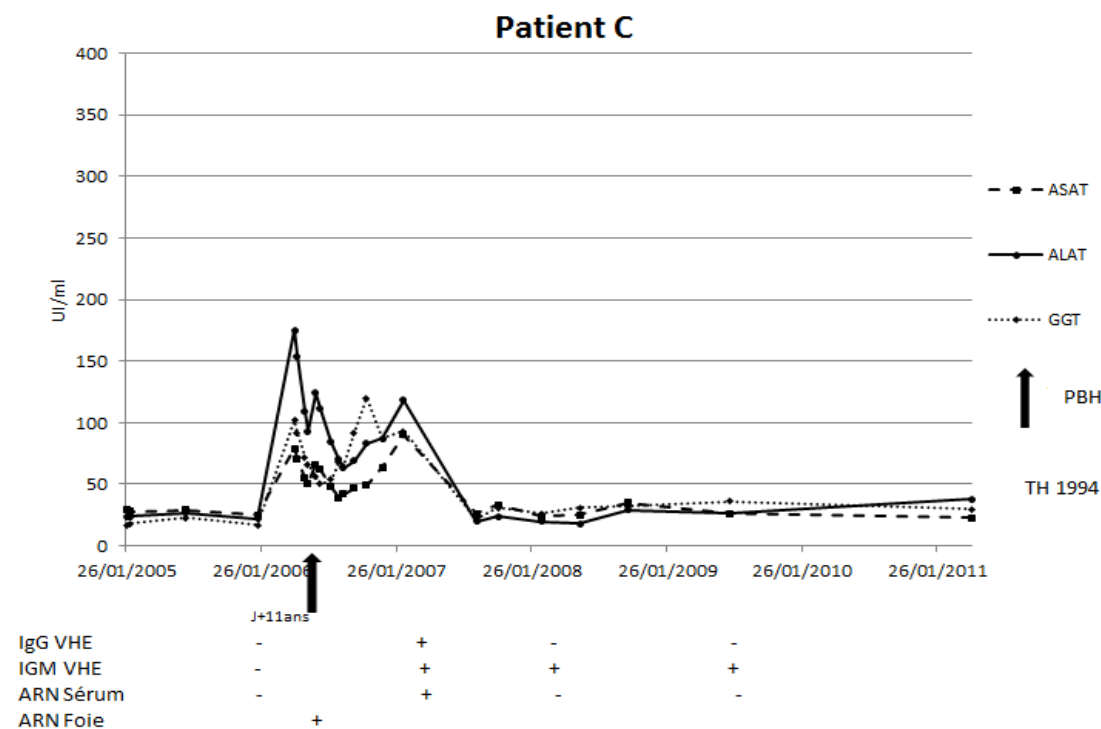


Figure 19 : Cas clinique 3 : Evolution des enzymes hépatiques et marqueurs biologiques du VHE.

Les lésions histologiques observées en 2006 peuvent évoquer des lésions d'hépatite sub-aiguë ou chronique débutante, associant une fibrose portale et un infiltrat mononucléé à prédominance lymphocytaire, portal et plus discrètement péri-portal et lobulaire (figures 20 et 21).

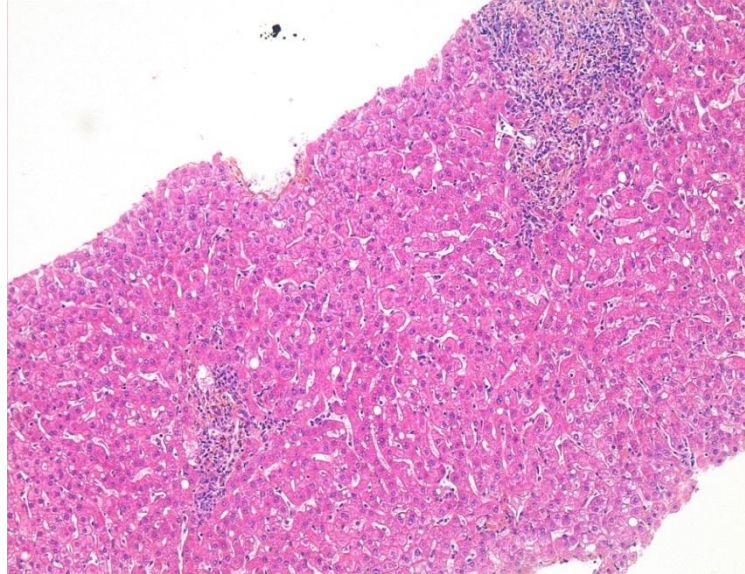


Figure 20 : Cas clinique 3 : Lésions histologiques présentes en mai 2006. Infiltrat inflammatoire mononucléé portal et lobulaire discret. (x10)

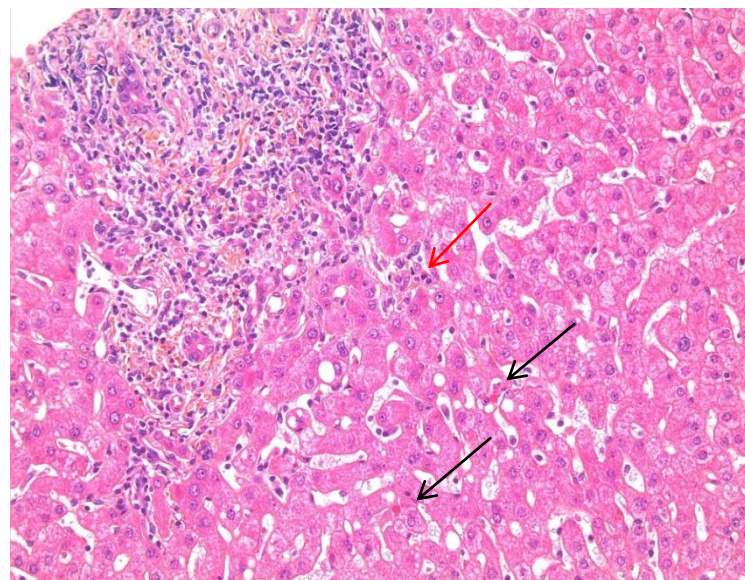


Figure 21 : Cas clinique 3 : Lésions histologiques présentes en mai 2006. Infiltrat portal mononucléé à prédominance lymphocytaire. Quelques images de nécrose lobulaire (corps apoptotiques (→), amas de cellules inflammatoires (→)). (x20)

Conclusion :

La présence d'une virémie du VHE sur plus de 6 mois associée à une augmentation des enzymes hépatiques est en faveur d'une hépatite virale E chronique.

5 Discussion

Afin de permettre un meilleur diagnostic du VHE au CHU de Grenoble, ce travail de thèse a consisté, en premier lieu, à mettre en place au laboratoire de virologie une technique de diagnostic moléculaire du VHE. La technique choisie est une RT-PCR en temps réel avec utilisation d'une sonde Taqman®. Le choix de la technique de RT-PCR temps réel à adapter parmi celles décrites dans la littérature, a été la première étape de ce travail. Nous avons initialement testé le protocole décrit par Enouf *et al.* [140] lequel ne nous a pas permis d'amplifier 3 souches disponibles au laboratoire de génotype 3. Le principal défaut de ce protocole serait lié à un manque d'efficacité de la technique quant à la détection de ce génotype [116]. Les données comparatives des différentes techniques temps-réel sont très rares. Seule l'équipe canadienne de Ward *et al.* en 2009 [146] a comparé 4 techniques de RT-PCR réel [136-138, 140] pour la détection de 190 échantillons de selles ou de sérums chez le porc, tous ces échantillons étant de génotype 3. Les résultats obtenus montrent des performances de détection nettement supérieures avec la technique de Jothikumar et au moins comparables à la technique de nested RT-PCR en point-final de référence conseillée par le CNR [128]. C'est donc cette technique, décrite initialement sur RAPID® Thermal Cycler après extraction manuelle grâce à un kit contenant 2 transcriptases inverses (Omniscript® et Sensiscritp® Reverse Transcriptase) et une HotStarTaq® DNA Polymérase que nous avons adaptée au laboratoire. Les concentrations optimales choisies pour le mix d'amplification ont été adaptées selon les recommandations du fournisseur du kit Superscript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System contenant des enzymes différentes : une reverse transcriptase (SuperScript® III Reverse Transcriptase) et une Platinum® taq DNA Polymérase. Concernant le programme d'amplification sur Smart-Cycler®, la température de l'étape de transcription inverse a été augmentée pour approcher la température optimale d'hybridation des amorces dans les normes admise du fournisseur du kit. Les étapes de transcription inverse et de dénaturation ont été raccourcies adaptées aux performances de l'automate. Une extraction manuelle ou automatisée précédée d'un pré-traitement des échantillons au Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) pour une lyse de la capsid virale optimale a également été mise en place. Ce protocole optimisé nous a permis de détecter les 3 échantillons de génotype 3 de référence. La technique a ensuite été validée sur 2 échantillons de génotype 1, plus fréquemment rencontrés chez le voyageur. Le génotype 4 n'a pas été évalué au laboratoire mais a été amplifié par cette technique dans l'article princeps.

La région amplifiée dans la technique de Jothikumar se situe au niveau de l'ORF3 chevauchant l'ORF2 en 5' (position 5261-5330 de la souche Burma), celle d'Enouf *et al.* dans une région proche de l'ORF2 en 5' (position 5201-5297) alors que celle de Cooper *et al.* se situe au centre (position 5711-6441 de la souche prototype du porc) de l'ORF2. Les études phylogéniques du virus montrent une importante diversité génétique des génotypes 3 et 4 en lien avec leur potentiel zoonotique [151] cependant elles se basent sur des régions proches en dehors de notre zone d'amplification [36]. Nous avons donc voulu conforter la conservation de la région amplifiée en réalisant un alignement de séquences issues des 4 génotypes retrouvés chez l'homme qui nous montre une bonne conservation de la zone d'accrochage des amorces et de la sonde décrites par Jothikumar. L'analyse par Blast des amorces et de la sonde montre un pourcentage de similarité nucléotidique maximale avec une E-value basse pour un maximum de souches VHE de différents génotypes et confirme ainsi le risque minimal d'accrochage non spécifique sur d'autres organismes vivants. Inoue *et al.* décrivent également cette zone comme conservée par une analyse similaire de 70 génomes [130].

Les performances analytiques observées de cette RT-PCR temps-réel montrent une efficacité de PCR de 1,8, une linéarité de 100 à 10⁶ copies/ml, une limite de détection à 50 copies/ml et une spécificité de 100%. La détermination de ces paramètres a été réalisée selon le guide de validation des méthodes en biologie médicale du COFRAC [152] et les recommandations du MIQE (Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) [153]. Comparativement à l'article princeps et aux autres protocoles disponibles dans la littérature, il apparaît que notre efficacité de RT-PCR à 1,8 est légèrement inférieure à ce qui a été décrit. En effet, l'efficacité doit se rapprocher de 2 pour signifier un doublement des amplicons à chaque cycle. Les données de l'article princeps se basent sur une efficacité à 1,90. Les données des autres RT-PCR temps réel pour la détection du VHE font apparaître des valeurs à 1,89. Mais contrairement à la technique développée au laboratoire où la quantification est basée sur une gamme de transcrits ARN, la plupart des études utilisent des plasmides pour construire les courbes de calibration nécessaires au calcul de l'efficacité. L'étape de rétro-transcription subie par un transcrit d'ARN, et non par un ADNc, pourrait ainsi abaisser l'efficacité de la RT-PCR. Une baisse d'efficacité de 0,15 est constatée par Ahn *et al.* avec un transcrit synthétique comparativement à un plasmide [138].

Le seuil de quantification de 100 copies/ml, établi grâce à notre gamme d'ARN de synthèse de génotype 3, est satisfaisant. Le protocole de Mansuy *et al.* [136] utilisé à Toulouse permet d'obtenir une sensibilité moindre de 1000 copies/ml. Ce seuil de quantification s'intègre dans les

taux des virémies détectés en pratique de laboratoire. Nicand *et al.* décrivent des taux variant de 2.10^3 à $1.7.10^7$ copies par ml de sang et des taux en copies moitié moindre dans les selles [40]. Cependant, plus récemment, Baylis *et al.* en 2011 [131] ont rapporté des performances variables de sensibilité (de l'ordre de 100 à 1000X copies/ml) entre différentes techniques de biologie moléculaire pratiquées dans 20 laboratoires de 10 pays différents, indépendamment du génotype testé. Notre gamme de transcrit d'ARN synthétique nous permet d'obtenir un reflet précis de la quantité d'ARN du VHE présent dans l'échantillon puisqu'elle subit toutes les étapes de reverse transcription et d'amplification contrairement à un témoin en ADNc généralement utilisé. Les principales limites liées à l'utilisation de ce type de transcrit synthétique sont la conservation et la justesse de la quantification initiale du transcrit. L'expérience du laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble démontre une stabilité de conservation dans le temps des transcrits concentrés à plus de 10^{11} copies/ml sur au moins un an. La technique de mesure de l'ARN par spectrophotométrie est la plus couramment utilisée et applicable au laboratoire.

Une limite à notre technique est l'absence de contrôle interne. Une inhibition de PCR par des taux forts du virus ou la présence d'inhibiteurs ne peuvent être exclues. Le contrôle interne utilisé au laboratoire, qui est un ADN de phage PhiX [154] peut être ajouté lors de l'extraction sans modifier les caractéristiques de la technique mais nécessite une amplification sur Light Cycler avec un autre kit de PCR. Une inhibition spécifique de la Superscript Platinum® ne serait alors pas détectée. Seule la qualité de l'échantillon mesurée par la GAPDH permet actuellement de conforter nos résultats et est le référentiel utilisé par le CNR en 2010.

La reproductibilité et la répétabilité de la technique mise en place au laboratoire donnent des variations faibles des Ct confortent les bonnes performances inhérentes à la technique utilisée.

Le choix de cette technique en temps réel par rapport à la technique de PCR nichée de référence du CNR se base sur plusieurs avantages du temps-réel. Outre une sensibilité comparable entre les 2 techniques [146], la technique temps réel, de pratique courante au laboratoire, offre de nombreux avantages dont une rapidité de réalisation de l'analyse, un risque faible de contamination, une meilleure reproductibilité et de larges capacités de quantification.. Du fait de l'ouverture des tubes entre les deux PCR, les techniques de PCR nichée sont plus sensibles au risque de contamination par amplicons [155]. De plus, l'utilisation d'une sonde de technologie Taqman®, permet d'améliorer la spécificité de l'amplification par rapport à une RT-PCR en point final ou en temps réel avec utilisation d'agent intercalant. Ainsi, les performances analytiques obtenues avec cette technique en valident l'application en diagnostic médical.

Deux études associant sérologie et diagnostic moléculaire du VHE chez des patients ayant une réponse humorale potentiellement diminuée ont ensuite été réalisées au laboratoire.

Les résultats obtenus dans la population de co-infectés VIH-VHC de RIBAVIC indiquent une faible séroprévalence de 2,7% au sein de cette population. Des données récentes peu nombreuses parmi des patients VIH établissent une séroprévalence variant selon un gradient Nord-sud. Une séroprévalence de 3% est décrite dans le nord de la France et de 9% dans le sud [156]. Dans une étude parisienne, 3.7% patients VIH avec hépatite cryptogénique présentent des IgG anti-VHE [157]. Ainsi, les données obtenues pourraient être comparables à celle du nord de la France comme attendu pour notre population majoritairement recrutée dans ces régions. L'infection par le VIH et ses modes de contamination pourraient ne pas représenter un facteur de risque d'exposition au virus. L'usage de drogues par voie intra-veineuse représente le mode principal de contamination par le VHC de façon générale et en particulier dans la cohorte RIBAVIC. La question de son imputabilité dans la transmission du VHE est posée par un article de Kaba *et al.* publié en 2010 [89]. En effet, cette étude montre une séroprévalence du VHE de 11.6% au sein d'une population de SDF du Sud de la France associée significativement à la toxicomanie. Peu de données sont disponibles sur la prévalence du VHE chez le toxicomane. D'anciennes études évoquent une forte prévalence chez les toxicomanes qui n'est pas retrouvée en 1994 par Montella *et al.* [158]. En Italie, Gessoni *et al.* établissent une séroprévalence significativement plus forte chez le toxicomane de 5,4% versus 2,4% dans la population générale en 1996 [159]. Fainboim *et al.* en Argentine décrivent un sur-risque (6.6% versus 1.8%) en 1999 [160]. Notre étude regroupe une majorité de patients toxicomanes et montre une faible séroprévalence de VHE même si l'on restreint l'analyse aux seuls usagers de drogues intra-veineuse. Ce mode d'exposition parentérale, ne semble donc pas une voie majeure de transmission du VHE et la séroprévalence trouvée dans la cohorte RIBAVIC pourrait refléter le niveau d'endémicité du virus en France. Les kits sérologiques utilisés sont identiques à ceux de l'étude de Kaba et ne peuvent donc pas expliquer ces discordances. Un plus faible échantillon de patients et des différences épidémiologiques comme une plus faible proportion d'hommes d'origine de l'Afrique du Nord sont à prendre en compte. Le statut VIH des patients de la cohorte RIBAVIC peut être associé à une diminution de sensibilité des tests sérologiques comme cela a déjà été décrit pour d'autres sérologies virales [161] mais l'immunité cellulaire des patients de cette étude est peu altérée (taux médian de CD4 : 495/mm³). Parmi cette cohorte RIBAVIC, aucune IgM ou virémie du VHE n'a été détectée. Une des limites à cette recherche peut être liée à une utilisation

répétée de ces sérums qui a pu conduire à une dégradation du virus par congélations-décongélations successives dans des études antérieures, le virus étant à ARN donc plus fragile.

Une seconde recherche sérologique et moléculaire du VHE a également été réalisée parmi la population de transplantés hépatiques suivis au CHU de Grenoble.

Les résultats, portant sur plus de la moitié des patients transplantés hépatiques du CHU de Grenoble depuis 1986, montrent une séroprévalence de 7.7% en post-T et de 9,9% en pré-T. Comparés aux autres données de la littérature, en France et en Europe, les taux obtenus dans notre étude peuvent être qualifiés d'intermédiaires. En effet, Legrand-Abravanel *et al.* ont rapporté une séroprévalence VHE de 12,3% en pré-T sur une série de 171 transplantés hépatiques suivis à Toulouse [162]. En post-T, d'autres études ont rapporté des taux plus bas comme aux Pays-bas (2,1%) [163], en Allemagne (4%) [164] et en Espagne (2.7%) [165]. Là encore, ces données de séroprévalence pourraient être sous-estimées du fait de l'altération de l'immunité humorale dans cette population liée aux thérapeutiques utilisées. Des cas de perte des anticorps ont été décrits après clairance du virus dans un contexte d'immunodépression [163]. Les discordances obtenues pourraient également être le fait de performances variables des trousseaux ou techniques maison utilisées dans les différentes études. Des variations épidémiologiques ou de facteurs d'exposition au virus peuvent exister. Nos résultats peuvent être le reflet d'un niveau d'endémicité du VHE local. En effet, la séroprévalence de notre population témoin (5,4%) est non significativement différente de la population des TH en post-T ($p=0,1830$). Ces résultats peuvent conduire à considérer que la population des transplantés hépatiques ne constitue pas un groupe plus à risque d'infection pour le VHE comparativement aux données locales.

Les facteurs d'exposition au virus dans la population des TH sont peu connus. Notre étude fait apparaître un lien entre la séroprévalence du VHE et un âge supérieur à 52 ans en post-T ainsi qu'avec le sexe féminin en pré-T. Ce seuil de 52 ans a été repris d'après l'article de Legrand-Abranel *et al.* [162]. Legrand-Abranel *et al.* ne rapportent pas d'association significative entre la séroprévalence pré-T des transplantés et les données démographiques et cliniques recueillies dans ce même article [162]. Concernant le caractère féminin, Boutrouille *et al.* ont cependant constaté chez les donneurs de sang du nord de la France une augmentation de la séroprévalence du VHE chez les femmes de 35-44 ans sans facteur épidémiologique identifié [71]. Notre recherche de facteurs d'exposition reste limitée devant le manque de puissance statistique liée au faible nombre de patients positifs.

Les cas d'infection par le VHE chez les TH sont rares d'après notre étude. La recherche rétrospective d'infection par le VHE chez les patients porteurs de marqueurs sérologiques a permis de détecter 3 cas d'infections par le virus. Le nombre rapportés par Legrand-Abravanel en région sud-ouest est nettement supérieur avec 34 cas d'infections autochtones dont 12 chez des transplantés hépatiques sur 4 ans [162]. Le nombre de cas chez les transplantés hépatiques reste faible en Europe et aux USA avec 85 cas rapportés chez les transplantés, dont 26 hépatiques, dans une étude multicentrique en 2011 qui incluait majoritairement des cas originaires de Toulouse [166]. Ce taux élevé dans la région sud-ouest est attribué à une recherche biologique systématique du virus dans une région à séroprévalence plus élevée [166].

La recherche rétrospective d'éléments clinico-biologiques ou histologiques évocateurs d'une infection par le VHE s'est avérée délicate face à des dossiers souvent complexes. Rétrospectivement, aucun cas n'était clairement suspect et seul un cas (cas clinique n°1) aurait du conduire à suspecter le virus sur des lésions histopathologiques évocatrices. L'investigation rétrospective des 3 cas nous a permis de retrouver plusieurs notions communes aux autres cas décrits d'infections aiguës et/ou chroniques par le VHE chez les transplantés. Le caractère autochtone de ces infections est probable étant donné l'absence de voyage des patients dans des zones endémiques pour le VHE et le génotype 3 mis en évidence pour 2 de ces patients [166]. L'origine de la contamination reste méconnue. La consommation de gibier a été reconnue comme un facteur de risque de contamination chez les transplantés [82] mais l'interrogatoire rétrospectif de 2 patients ne retrouve pas ce facteur.

Les 3 cas étaient asymptomatiques et 2 présentaient une cytolysse avec des transaminases modérées (2-7N) comme cela a déjà été décrit [166]. L'âge des 3 patients diffère en étant plus élevé dans notre étude [162]. Le caractère persistant des IgM dans les 3 cas a été décrit avec les mêmes trousse sérologiques utilisées au laboratoire, jusqu'à 12-29 mois après résolution de l'infection [82]. De même la disparition des IgG, comme observée dans les cas 1 et 3, avait déjà été décrite par Kamar *et al.* [166] et Legrand-Abravanel *et al.* [162]. Le degré d'immunosuppression et les différentes thérapeutiques utilisées interviennent dans la progression vers la chronicité. Les 2 cas de dévolution prolongée vers la chronicité étaient sous tacrolimus, qui est la drogue la plus fréquemment retrouvée associée à cette évolution selon Kamar *et al.* [101]. De plus, pour ces cas, un délai proche de la transplantation ou une augmentation de l'immunodépression ont pu concourir au maintien d'une répllication virale [166]. Un délai proche de la transplantation (40 versus 70 mois) a été décrit en analyse univariée comme facteur de risque d'infection chronique par Kamar *et al.* en 2011 [166]. Une diminution lente des enzymes hépatiques est constatée pour le cas 3 même si elles restent au-dessus de leur niveau basal pré-T

[166]. A ce jour, l'évolution est favorable au niveau hépatique pour les 2 patients encore en cours de suivi. La lecture *a posteriori* des biopsies hépatiques met en avant les lésions causées par le VHE. Elle souligne également la difficulté et parfois la complexité du diagnostic anatomopathologique dans des contextes d'immunosuppression et des tableaux souvent multifactoriels présentés par ces patients. De plus, d'autres entités, comme la récurrence virale C et hépatites auto-immunes notamment, peuvent présenter des lésions communes comme vues dans le cas 2.

Parmi les patients porteurs d'IgM, 2 cas n'ont pas été retenus comme infectés par VHE. L'un d'eux présentait une infection chronique concomitante liée à l'EBV. Le second était porteur d'une infection par le VHC. Un défaut de spécificité du test sérologique par stimulation polyclonale à EBV a été décrit [167]. Par ailleurs, une possible réactivité croisée avec le VHC serait possible et liée à des épitopes proches [109].

Comme dans l'étude de Legrand-Abravanel en 2011, aucun cas de réactivation post-T n'a été retrouvé [162]. Ces cas restent exceptionnels dans la littérature et non décrits chez le transplanté d'organes solides [166].

En conclusion, la mise en évidence du VHE par recherche des marqueurs sérologiques et moléculaires semble donc une aide diagnostique importante pour des atteintes hépatiques multifactorielles, post-transplantation hépatique, même si les cas avérés sont rares. Les 3 cas rétrospectifs investigués dans cette étude présentaient ces marqueurs à la phase aiguë de la maladie. Ainsi, malgré une implication clinique relativement peu fréquente dans notre région, un diagnostic biologique sérologique et moléculaire du VHE semble donc nécessaire devant une perturbation inexplicée du bilan hépatique d'un transplanté ce qui pourrait aider à éclaircir certaines situations cliniques complexes.

6 Conclusion

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable depuis les années 1990 d'hépatites aiguës autochtones rares mais en augmentation dans les pays industrialisés. Plus récemment, des formes chroniques ont été décrites chez des patients immunodéprimés.

La première étape de ce travail a consisté en la mise en place au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble d'une technique de diagnostic du VHE par RT-PCR temps réel. Celle-ci a été adaptée à partir d'une technique décrite par Jothikumar et al publiée en 2006. La zone amplifiée est une région conservée de l'ORF3 et permet de détecter les 4 génotypes viraux. L'analyse des performances analytiques de la technique modifiée, selon les critères du MIQE (Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments), montre une spécificité de 100% et une variabilité intra et inter-essais faible. Le seuil de détection, établi grâce à une gamme de transcrits d'ARN de synthèse, est de 50 copies/ml et la technique permet une quantification linéaire de 100 à 10^6 copies/ml. Ces résultats confortent la robustesse et la fiabilité de notre technique et en valident l'application en diagnostic médical.

La deuxième partie de notre travail a porté sur l'utilisation de cette méthode moléculaire en lui associant un test sérologique commercialisé (IgG +IgM) pour évaluer la prévalence de l'infection VHE dans deux populations de patients immunodéprimés. Une première étude rétrospective a été menée sur 111 sérums de patients co-infectés par le VIH et le VHC, inclus en 2000 dans le protocole thérapeutique multicentrique français ANRS-HCO2-RIBAVIC. Une faible séroprévalence du VHE de 2,7% (3/111) a été retrouvée dans cette cohorte où la toxicomanie était la principale cause de contamination par le VIH et le VHC. Aucun patient n'était positif en PCR VHE. Contrairement à une étude française publiée en 2010, ces résultats suggèrent que la toxicomanie intraveineuse n'est pas en soi un facteur de risque supplémentaire d'infection par le VHE. La deuxième étude rétrospective a porté sur 169 patients transplantés hépatiques suivis au CHU de Grenoble. Pour 81 d'entre eux nous disposons de prélèvements sanguins pré et post transplantation. La séroprévalence VHE en pré-transplantation était de 9,9% (8/81) et en post-transplantation de 7,7% (13/169). La séroprévalence chez les sujets sains évaluée parmi le personnel hospitalier grenoblois était de 5,4% et ne diffère donc pas significativement de celle retrouvée chez les patients transplantés hépatiques ($p=0,1830$). Aucun cas de réactivation virale (apparition d'une PCR positive chez les patients séropositifs en pré ou post transplantation) n'a été détecté sur un délai médian de suivi de 18 mois. Trois cas de primo-infections (2 cas PCR positives avec séroconversion et une séroconversion isolée) ont été mis en évidence avec passage à la chronicité probable dans 2 cas. Ces résultats suggèrent que la

population des transplantés hépatiques à Grenoble ne semble pas plus à risque d'infection par le VHE que la population générale locale et qu'une évolution vers la chronicité reste possible mais peu fréquente.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble le 17/10/2011

Le Doyen

Professeur J.P. Romanet



Le président de la thèse

Professeur

A large, stylized handwritten signature in blue ink, written over the word "Professeur".

BIBLIOGRAPHIE

1. **Khuroo MS.** 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 68: 818-24.
2. **Aggarwal R.** 2011. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1: 72-82.
3. **Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al.** 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20: 23-31.
4. **Reyes GR, Yarbough PO, Tam AW, Purdy MA, Huang CC, Kim JS, et al.** 1991. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 26 Suppl 3: 142-7.
5. **Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al.** 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185: 120-31.
6. **Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, et al.** 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191: 550-8.
7. **Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM.** 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 2: 876-9.
8. **Purcell RH, Emerson SU.** 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 48: 494-503.
9. **Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al.** 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9860-5.
10. **Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo PY, Knigge MF, Smalley DL, et al.** 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79 (Pt 3): 447-56.
11. **Pavio N, Meng XJ, Renou C.** 2010. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41: 46.
12. **Meng XJ.** 2011. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 161: 23-30.
13. **Delaune D.** Le virus de l'hépatite E. [consulté le 01.10.11]. Disponible à partir de URL: <http://www.cnrvha-vhe.org/standard-1425-1.html>.
14. **Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU.** 1999. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* 73: 8848-50.
15. **Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU.** 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80: 5919-26.
16. **Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ.** 2007. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J Virol* 81: 3018-26.
17. **Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW.** 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8259-63.
18. **Agrawal S, Gupta D, Panda SK.** 2001. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* 282: 87-101.
19. **Rehman S, Kapur N, Durgapal H, Panda SK.** 2008. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370: 77-92.

20. **Pudupakam RS, Kenney SP, Cordoba L, Huang YW, Dryman BA, Leroith T, et al.** 2011. Mutational Analysis of the Hypervariable Region of the Hepatitis E Virus Reveals Its Involvement in the Efficiency of Viral RNA Replication. *J Virol* 85: 10031-40.
21. **Meng XJ.** 2010. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 17: 153-61.
22. **Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S.** 1999. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* 73: 4074-82.
23. **Graff J, Zhou YH, Torian U, Nguyen H, St Claire M, Yu C, et al.** 2008. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol* 82: 1185-94.
24. **Surjit M, Jameel S, Lal SK.** 2004. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol* 78: 320-8.
25. **Meng XJ.** 2010. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 140: 256-65.
26. **Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK.** 2002. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem* 277: 22759-67.
27. **Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, et al.** 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90: 1880-91.
28. **Graff J, Nguyen H, Yu C, Elkins WR, St Claire M, Purcell RH, et al.** 2005. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* 79: 6680-9.
29. **Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S.** 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 33: 451-64.
30. **Chandra V, Kalia M, Hajela K, Jameel S.** 2010. The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex. *J Virol* 84: 3857-67.
31. **Ahmad I, Holla RP, Jameel S.** 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.*
32. **Li S, Tang X, Seetharaman J, Yang C, Gu Y, Zhang J, et al.** 2009. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. *PLoS Pathog* 5: e1000537.
33. **Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al.** 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39: 3040-6.
34. **Ippagunta SK, Naik S, Jameel S, Ramana KN, Aggarwal R.** 2011. Viral RNA but no evidence of replication can be detected in the peripheral blood mononuclear cells of hepatitis E virus-infected patients. *J Viral Hepat* 18: 668-72.
35. **Mushahwar IK.** 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80: 646-58.
36. **Lu L, Li C, Hagedorn CH.** 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16: 5-36.
37. **Legrand-Abravanel F, Mansuy JM, Dubois M, Kamar N, Peron JM, Rostaing L, et al.** 2009. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 15: 110-4.
38. **Nicand E, Grandadam M.** 2003. Virus de l'hépatite E. *Virologie* 7: 87-96.
39. **Okamoto H.** 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127: 216-28.
40. **Nicand E, Bigaillon C, Tesse S.** 2009. [Hepatitis E: an emerging disease?]. *Pathol Biol (Paris)* 57: 203-11.

41. **Izopet J, Kamar N, Abranel F, Dubois M, Lhomme S, Mansuy J-M.** L'hépatite E chronique. [consulté le 01.10.11]. Disponible à partir de URL: http://www.webneurologie.com/e-docs/00/04/54/66/document_article.phtml.
42. **Grandadam M, Tebbal S, Caron M, Siriwardana M, Larouze B, Koeck JL, et al.** 2004. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 85: 3189-94.
43. **Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, et al.** 2010. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant* 10: 1321-4.
44. **Peron J-M, Mansuy J-M.** 2009. Hépatite virale E. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hépatologie, 7-015B-55.
45. **Srivastava R, Aggarwal R, Bhagat MR, Chowdhury A, Naik S.** 2008. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat* 15: 910-6.
46. **Srivastava R, Aggarwal R, Jameel S, Puri P, Gupta VK, Ramesh VS, et al.** 2007. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol* 20: 56-65.
47. **Prabhu SB, Gupta P, Durgapal H, Rath S, Gupta SD, Acharya SK, et al.** 2011. Study of cellular immune response against Hepatitis E Virus (HEV). *J Viral Hepat* 18: 587-94.
48. **Bryan JP, Tsarev SA, Iqbal M, Ticehurst J, Emerson S, Ahmed A, et al.** 1994. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* 170: 517-21.
49. **Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al.** 1994. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10198-202.
50. **Purcell RH, Emerson SU.** 2010. Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Dis* 202: 819-21.
51. **Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M.** 2008. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 8: 698-709.
52. **Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Yarbough PO, Legters LJ, Moskal T, et al.** 1994. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol* 43: 135-42.
53. **Aggarwal R.** 2010. The Global Prevalence of Hepatitis E Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review. [consulté le 01.10.11]. Disponible à partir de URL: http://www.who.int/immunization/documents/WHO_IVB_10.14/en/index.html.
54. **Khuroo MS.** 2011. Discovery of hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.*
55. **Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD.** 2010. The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis* 51: 328-34.
56. **Teo CG.** 2010. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect* 16: 24-32.
57. **Renou C, Nicand E, Pariente A, Cadranel J-F, Pavio N.** 2009. Quand rechercher et comment diagnostiquer une hépatite E autochtone ? *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 33: 27-35.
58. **Hamid SS, Atiq M, Shehzad F, Yasmeen A, Nissa T, Salam A, et al.** 2002. Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 36: 474-8.
59. **Ramachandran J, Eapen CE, Kang G, Abraham P, Hubert DD, Kurian G, et al.** 2004. Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 134-8.
60. **Kumar Acharya S, Kumar Sharma P, Singh R, Kumar Mohanty S, Madan K, Kumar Jha J, et al.** 2007. Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *J Hepatol* 46: 387-94.

61. **Aggarwal R, Naik S.** 2009. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* 24: 1484-93.
62. **Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN.** 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 778-84.
63. **Borgen K, Herremans T, Duizer E, Vennema H, Rutjes S, Bosman A, et al.** 2008. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect Dis* 8: 61.
64. **Renou C, Moreau X, Pariente A, Cadranel JF, Maringe E, Morin T, et al.** 2008. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 1086-93.
65. **Romano L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR.** 2011. Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol* 54: 34-40.
66. **Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, et al.** 2008. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 198: 1732-41.
67. **Lewis HC, Boisson S, Ijaz S, Hewitt K, Ngui SL, Boxall E, et al.** 2008. Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis* 14: 165-7.
68. **Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, Joseph M, Thurairajah PH, Warshow U, et al.** 2007. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 26: 1429-35.
69. **Lewis HC, Wichmann O, Duizer E.** 2010. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect* 138: 145-66.
70. **Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, et al.** 2008. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48: 1368-75.
71. **Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Cruciere C, Pavio N.** 2007. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol* 45: 2009-10.
72. **Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al.** 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202: 825-34.
73. **Mansuy JM, Legrand-Abrevanel F, Calot JP, Peron JM, Alric L, Agudo S, et al.** 2008. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol* 80: 289-93.
74. **N. Kamar FA, J.-M. Mansuy, J.-M. Peron, J. Izopet, L. Rostaing.** avril 2010. Infection par le virus de l'hépatite E en dialyse et après transplantation. *Néphrologie et thérapeutique* 6: 83-7.
75. **Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S.** 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-3.
76. **Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al.** 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11: 1958-60.
77. **Deest G, Zehner L, Nicand E, Gaudy-Graffin C, Goudeau A, Bacq Y.** 2007. Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat. *Gastroenterol Clin Biol* 31: 1095-7.
78. **Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ.** 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88: 912-7.
79. **Couturier E.** 2010. L'hépatite E : Synthèse de l'épidémiologie humaine. *Bull Epidemiol Hebd* 14 Sept 2010 Hors-série: 18-19.
80. **Pavio N, Lunazzi A, Barnaud E, Bouquet J, Rogée S.** 2010. Hépatite E : Nouvelles connaissances du côté animal. *Bull Epidemiol Hebd* 14 Sept 2010 Hors-série: 19-21.

81. **Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ.** 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* 123: 32-7.
82. **Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM, et al.** 2010. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* 202: 835-44.
83. **Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al.** 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40: 117-22.
84. **Renou C, Cadranel JF, Bourliere M, Halfon P, Ouzan D, Rifflet H, et al.** 2007. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg Infect Dis* 13: 1094-6.
85. **Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al.** 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis* 15: 1738-44.
86. **Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C.** 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 13: 648-9.
87. **Mansuy JM, Huynh A, Abravanel F, Recher C, Peron JM, Izopet J.** 2009. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* 48: 373-4.
88. **Siddiqui AR, Jooma RA, Smego RA, Jr.** 2005. Nosocomial outbreak of hepatitis E infection in Pakistan with possible parenteral transmission. *Clin Infect Dis* 40: 908-9.
89. **Kaba M, Brouqui P, Richet H, Badiaga S, Gallian P, Raoult D, et al.** 2010. Hepatitis E virus infection in sheltered homeless persons, France. *Emerg Infect Dis* 16: 1761-3.
90. **Irshad M.** 1999. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology* 42: 252-62.
91. **Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, et al.** 2011. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis* 17: 173-9.
92. **Colson P, Payraudeau E, Leonnet C, De Montigny S, Villeneuve L, Motte A, et al.** 2008. Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol* 46: 2450-2.
93. **Serratrice J, Disdier P, Colson P, Ene N, de Roux CS, Weiller PJ.** 2007. Acute polyarthrititis revealing hepatitis E. *Clin Rheumatol* 26: 1973-5.
94. **Jaroszewicz J, Flisiak R, Kalinowska A, Wierzwicka I, Prokopowicz D.** 2005. Acute hepatitis E complicated by acute pancreatitis: a case report and literature review. *Pancreas* 30: 382-4.
95. **Selves J, Kamar N, Mansuy JM, Peron JM.** 2010. [Hepatitis E virus: A new entity]. *Ann Pathol* 30: 432-8.
96. **Peron JM, Mansuy JM, Recher C, Bureau C, Poirson H, Alric L, et al.** 2006. Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1223-4.
97. **Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, et al.** 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res* 37: 113-20.
98. **Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S.** 2009. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361: 1025-7.
99. **Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P.** 2009. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* 45: 269-71.
100. **Colson P, Dhiver C, Poizot-Martin I, Tamalet C, Gerolami R.** 2011. Acute and chronic hepatitis E in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Viral Hepat* 18: 227-8.

101. **Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L, et al.** 2010. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 89: 353-60.
102. **Le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, Rocken C, Vuong GL, Neuburger S, et al.** 2009. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 58: 699-702.
103. **Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al.** 2010. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 50: e30-3.
104. **Alric L, Bonnet D, Beynes-Rauzy O, Izopet J, Kamar N.** 2011. Definitive clearance of a chronic hepatitis e virus infection with ribavirin treatment. *Am J Gastroenterol* 106: 1562-3.
105. **Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Jr., Thapa GB, Thapa N, et al.** 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 356: 895-903.
106. **Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al.** 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376: 895-902.
107. **Okamoto H.** 2011. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res.*
108. **Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen MP, Jr., Sedyaningsih ER, et al.** 2006. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J Clin Microbiol* 44: 1581-3.
109. **Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H.** 2010. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol* 82: 799-805.
110. **Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP.** 2007. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol* 14: 562-8.
111. **Li RC, Ge SX, Li YP, Zheng YJ, Nong Y, Guo QS, et al.** 2006. Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 12: 1682-8.
112. **Bigaillon C, Tesse S, Lagathu G, Nicand E.** 2010. Use of hepatitis E IgG avidity for diagnosis of hepatitis E infection. *J Virol Methods* 164: 127-30.
113. **Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, et al.** 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43: 49-56.
114. **Tokita H, Harada H, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H.** 2003. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993. *J Gen Virol* 84: 421-7.
115. **Herremans M, Duizer E, Jusic E, Koopmans MP.** 2007. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol* 14: 276-80.
116. **Zehner L.** Diagnostic biologique de l'infection par le virus de l'hépatite E: Analyse de 9 cas recensés au CHU de Tours (2005-2007). Thèse Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie-Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale. Université de Poitiers. 2009, 78p.
117. **Innis BL, Seriwatana J, Robinson RA, Shrestha MP, Yarbough PO, Longer CF, et al.** 2002. Quantitation of immunoglobulin to hepatitis E virus by enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 639-48.
118. **Robinson RA, Burgess WH, Emerson SU, Leibowitz RS, Sosnovtseva SA, Tsarev S, et al.** 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 12: 75-84.

119. **Seriwatana J, Shrestha MP, Scott RM, Tsarev SA, Vaughn DW, Myint KS, et al.** 2002. Clinical and epidemiological relevance of quantitating hepatitis E virus-specific immunoglobulin M. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1072-8.
120. **Myint KS, Guan M, Chen HY, Lu Y, Anderson D, Howard T, et al.** 2005. Evaluation of a new rapid immunochromatographic assay for serodiagnosis of acute hepatitis E infection. *Am J Trop Med Hyg* 73: 942-6.
121. **Chen HY, Lu Y, Howard T, Anderson D, Fong PY, Hu WP, et al.** 2005. Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 593-8.
122. **Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM, Saune K, Vischi F, Peron JM, et al.** 2009. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol* 16: 772-4.
123. **Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, et al.** 2000. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol* 38: 3915-8.
124. **Zhang JZ, Im SW, Lau SH, Chau TN, Lai ST, Ng SP, et al.** 2002. Occurrence of hepatitis E virus IgM, low avidity IgG serum antibodies, and viremia in sporadic cases of non-A, -B, and -C acute hepatitis. *J Med Virol* 66: 40-8.
125. **Zhou H, Jiang CW, Li LP, Zhao CY, Wang YC, Xu YW, et al.** 2008. Comparison of the reliability of two ELISA kits for detecting IgM antibody against hepatitis E virus. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42: 667-71.
126. **Merviel C, Mansuy JM, Dubois M, Izopet J.** 2010. Development of a multiplex technique for detecting simultaneously HAV RNA and HEV RNA. *Pathol Biol (Paris)*, sous presse.
127. **Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, et al.** 2005. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia. *Clin Lab* 51: 429-35.
128. **Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, et al.** 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 43: 1684-8.
129. **Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, et al.** 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 40: 3209-18.
130. **Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H.** 2006. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 137: 325-33.
131. **Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM.** 2011. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol* 49: 1234-9.
132. **Mansuy JM, Peron JM, Bureau C, Alric L, Vinel JP, Izopet J.** 2004. Immunologically silent autochthonous acute hepatitis E virus infection in France. *J Clin Microbiol* 42: 912-3.
133. **Nicand E, Grandadam M, Teyssou R, Rey JL, Buisson Y.** 2001. Viraemia and faecal shedding of HEV in symptom-free carriers. *Lancet* 357: 68-9.
134. **Peron JM, Mansuy JM, Poirson H, Bureau C, Dupuis E, Alric L, et al.** 2006. Hepatitis E is an autochthonous disease in industrialized countries. Analysis of 23 patients in South-West France over a 13-month period and comparison with hepatitis A. *Gastroenterol Clin Biol* 30: 757-62.

135. **Orru G, Masia G, Romano L, Piras V, Coppola RC.** 2004. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods* 118: 77-82.
136. **Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, et al.** 2004. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74: 419-24.
137. **Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR.** 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131: 65-71.
138. **Ahn JM, Rayamajhi N, Gyun Kang S, Sang Yoo H.** 2006. Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56: 269-74.
139. **Li X, Kamili S, Krawczynski K.** 2006. Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J Viral Hepat* 13: 835-9.
140. **Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, Guerin PJ, Caron M, Marechal V, et al.** 2006. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol* 78: 1076-82.
141. **Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R.** 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol* 40: 7416-22.
142. **Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belak S, Widen F.** 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* 146: 226-35.
143. **Zhao C, Li Z, Yan B, Harrison TJ, Guo X, Zhang F, et al.** 2007. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J Med Virol* 79: 1966-73.
144. **Qiao C, Zhang H, Lai P, Gao Z, Wang L, Pu J, et al.** 2008. [Development and application of real-time quantitative RT-PCR assay for the detection of hepatitis E virus]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24: 892-7.
145. **Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al.** 2004. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44: 934-40.
146. **Ward P, Poitras E, Leblanc D, Letellier A, Brassard J, Plante D, et al.** 2009. Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *J Appl Microbiol* 106: 1360-9.
147. **Corpet F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-90.
148. **Wilkening S, Bader A.** 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *J Biomol Tech* 15: 107-11.
149. **Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, et al.** 2004. Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. *JAMA* 292: 2839-48.
150. **Pol S.** 2009. ANRS HC 02 RIBAVIC: Impact de la stéatose au cours de la co-infection VHC-VIH. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 33 Suppl 2: S110-112.
151. **Schlauder GG, Mushahwar IK.** 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 65: 282-92.
152. **COFRAC.** Guide COFRAC LAB GTA 04. Guide de validation des méthodes en biologie médicale. Révision 00. Juin 2004.

153. **Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-22.
154. **Brengel-Pesce K, Morand P, Schmuck A, Bourgeat MJ, Buisson M, Bargues G, et al.** 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol* 66: 360-9.
155. **Torbenson M, Thomas DL.** 2002. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2: 479-86.
156. **Renou C, Lafeuillade A, Cadranel JF, Pavio N, Pariente A, Allegre T, et al.** 2010. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS* 24: 1493-9.
157. **Sellier P, Mazon MC, Tesse S, Badsì E, Evans J, Magnier JD, et al.** 2011. Hepatitis E virus infection in HIV-infected patients with elevated serum transaminases levels. *Virol J* 8: 171.
158. **Montella F, Rezza G, Di Sora F, Pezzotti P, Recchia O.** 1994. Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men. *Lancet* 344: 1433.
159. **Gessoni G, Manoni F.** 1996. Hepatitis E virus infection in north-east Italy: serological study in the open population and groups at risk. *J Viral Hepat* 3: 197-202.
160. **Fainboim H, Gonzalez J, Fassio E, Martinez A, Otegui L, Eposito M, et al.** 1999. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* 6: 53-7.
161. **Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, Atlas A, et al.** 2006. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108: 1580-7.
162. **Legrand-Abrevanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F, et al.** 2011. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* 17: 30-7.
163. **Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, et al.** 2009. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 15: 1225-8.
164. **Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, et al.** 2010. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 16: 74-82.
165. **Buti M, Cabrera C, Jardi R, Castells L, Esteban R.** 2010. Are recipients of solid organ transplantation a high-risk population for hepatitis E virus infection? *Liver Transpl* 16: 106-7; author reply 8.
166. **Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al.** 2011. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 140: 1481-9.
167. **Fogeda M, de Ory F, Avellon A, Echevarria JM.** 2009. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol* 45: 259-61.

ANNEXES

ANNEXE 1 : « Hepatitis E virus prevalence in HIV-hepatitis C virus co-infected IDU patients in France ». Article en attente de publication dans la revue « Emerging Infectious Disease ».

Hepatitis E virus prevalence in HIV-Hepatitis C virus co-infected IDU patients in France

Authors: S Larrat, S Gaillard, M Baccard, L Piroth, P Cacoub, S Pol, C Perronne, F Carrat and P Morand for the ANRS HC02 ribavirin study team

Affiliation: Laboratoire de Virologie/ Département des Agents Infectieux /UMI 3265 CNRS-UJF-EMBL, CHU A Michallon, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

To the editor: Kaba and al. (1) reported a seroprevalence of 11.6% for hepatitis E virus (HEV) in homeless persons in the city of Marseille located in the South of France, and a multivariate analysis suggested that intravenous drug use (IDU) was an independent risk factor of HEV transmission.

We conducted a retrospective subanalysis of HEV seroprevalence in the multicenter French ANRS-HC02-RIBAVIC therapeutic trial in HIV/HCV co-infected patients (2). Eighty-four IDU patients, enrolled between 2000 and 2002 in this trial, had still-available sera stored at -80°C. The patients' mean \pm SD age was 39 \pm 4 years, 63% were men, 23% were born out of France and 38 (45%) were living in the South of France. HEV antibodies were tested with the same assay as that used by Kaba et al. (1) and HEV-RNA was detected with an in-house real-time-RT-PCR (3). None of the patients had detectable anti-HEV-IgM or HEV-RNA. Three patients (3.6%) were HEV-IgG-positive. Two of them lived in the South of France, giving a 5.3% (2/38) HEV prevalence in IDU patients living in this region where HEV-IgG prevalence in healthy blood donors has been reported as high as 9%–16.6% (4). The difference between our study with a low HEV-IgG prevalence in IDUs, even in the South of France, and the

results from [Kaba et al. \(1\)](#) must be interpreted with caution because there were several epidemiological differences between the two populations. Moreover, there was a risk of a false-negative serology result in HIV patients due to impaired immunity, and the predictive value of serologic testing is probably low due to the low HEV prevalence in this population. Despite these limitations, this study suggests that the high prevalence of HEV infection in homeless persons in the South of France was not favored by IDU but reflected the general epidemiology of HEV in this region.

1. [Kaba M](#), [Brouqui P](#), [Richet H](#), [Badiaga S](#), [Gallian P](#), [Raoult D](#), et al. Hepatitis E virus infection in sheltered homeless persons, France. [Emerg Infect Dis](#). 2010 Nov;16(11):1761-3.
2. [Carrat F](#), [Bani-Sadr F](#), [Pol S](#), [Rosenthal E](#), [Lunel-Fabiani F](#), [Benzekri A](#), et al. Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. [Jama](#). 2004 Dec 15;292(23):2839-48.
3. [Iothikumar N](#), [Cromeans TL](#), [Robertson BH](#), [Meng XJ](#), [Hill VR](#). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. [J Virol Methods](#). 2006 Jan;131(1):65-71.
4. [Mansuy JM](#), [Legrand-Abravanel F](#), [Calot JP](#), [Peron JM](#), [Alric L](#), [Agudo S](#), et al. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. [J Med Virol](#). 2008 Feb;80(2):289-93.

ANNEXE 2: « Hepatitis E virus infection in liver transplantation in an area of low seroprévalence ». Poster présenté lors du congrès ESCV en septembre 2011.



Hepatitis E Virus Infection in Liver Transplantation in an Area of Low Seroprevalence

Sylvie Larrat¹, Stephanie Gaillard¹, Marie-Noelle Hilleret², Monique Baccard¹, Vincent Leroy² and Patrice Morand¹

¹-Laboratoire de Virologie Département des Agents Infectieux /UMI 3265 CNRS-UJF-EMBL, ²- Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie CHU A Mich

Objective: In the South-West of France, hepatitis E (HEV) seroprevalence is approximately 15% in the general population, and infection can evolve into chronic hepatitis in up to 60% of solid-organ transplant recipients. The present study describes HEV infection in liver transplant (LT) patients in a French area of lesser prevalence (5.4% in healthy healthcare providers from the Grenoble University Hospital staff).

Sexe	Post-transplantation		Pré-transplantation		
	N=169	%	N=81	%	
Sex-ratio (M/F)	129/40	3.22	63/18	3.5	
Age post-transplantation (years)	N	Médiane	IQR1-IQR3	IQR	
	169	60	51-65	14	
Min-Max				20-79	
Geographical Origin	France	121	71.6	56	69.2
	Europe	27	16	18	22.2
	Mediterranean Basin	18	10.7	6	7.4
	Africa	1	0.6	0	0
	Asia	2	1.1	1	1.2
Residence	Rural	96	56.8	32	39.5
	Urban*	73	43.2	49	60.5
Cause of liver transplantation	Alcoholic cirrhosis	91	53.8	50	61.7
	HBV	21	12.4	10	12.3
	HCV	36	21.3	21	21
	Auto-immune diseases	11	6.5	3	3
	others	31	18.3	10	10
mixed	21	12.4	13	13	
Co-transplantation	Associated with kidney transplantation	7	4.14	1	1.23
	Immunosuppressive therapy				
Anti-calcepsurins	159	94	77	95.1	
Tacrolimus	134	79.3	69	85.2	
Ciclosporine	25	14.8	8	9.9	
mTOR inhibitor	9	5.32	4	4.9	
Sirolimus	8	4.7	3	3.7	
Everolimus	1	0.6	1	1.2	
Antimetabolites	81	47.9	37	45.67	
Myfortic [®]	13	7.7	1	1.2	
Cellcept [®]	67	39.6	36	44.4	
Imurel [®]	1	0.6	0	0	
Corticoids	3	1.8	0	0	

Table 1: Characteristics of the 169 LT recipients

Method: A total of 315 adult patients underwent a liver transplantation between January 1986 and May 2010 at Grenoble University Hospital: 169 of them were still followed in this hospital and had recent (<1 year) serum available (table 1). For 81 of these patients, pre-LT serum was also stored. Each serum sample was tested for HEV IgG and IgM using HEV IgG and IgM kits (Diapro, Ingen, Paris, France) and for HEV RNA with an ORF3 real-time RT-PCR (Jothikumar, JVM, 2006) associated with the amplification of a housekeeping mRNA.

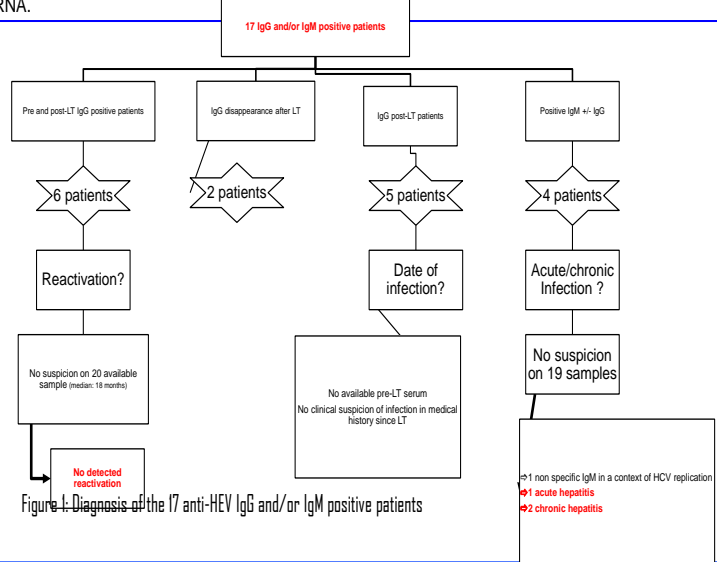


Figure 1: Diagnosis of the 17 anti-HEV IgG and/or IgM positive patients

Results: HEV IgG were detected in 13 of 169 LT patients (7.7%). 8/81 were already positive before LT (9.9%). The details of their serological evolution were described figure 1. No reactivation was observed despite one patient displaying HEV IgM persistence for more than 5 years after LT with concomitant EBV infection. Three patients developed acute infection after their LT, confirmed by transient HEV RNA positivity and/or HEV IgG seroconversion. For all of them, HEV IgM persisted for more than 1 year as well as HEV RNA for two patients assessing chronic hepatitis. These three cases were described figure 2.

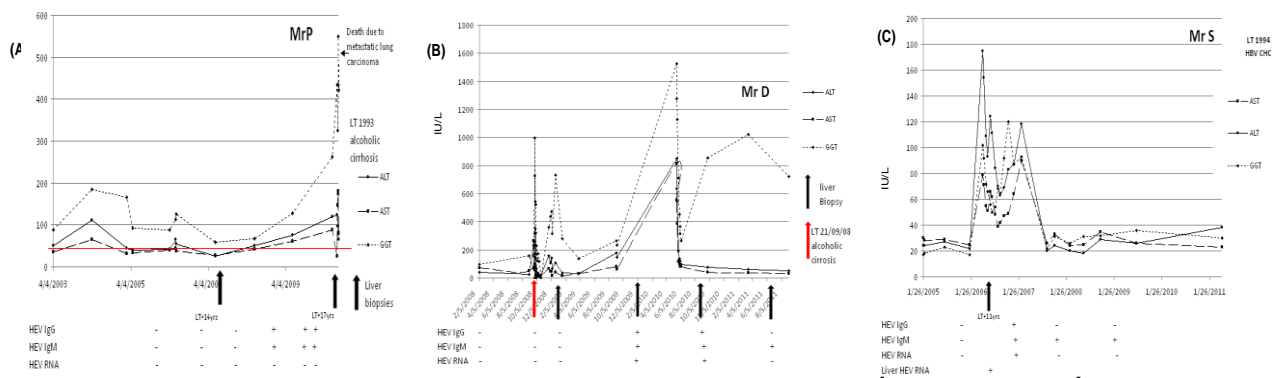


Figure 2: The course of one acute (A) and two chronic (HEV RNA positivity >6 months) (B and C) hepatitis E in three patients after LT presently found to have IgM antibodies to HEV.

Conclusion: In this retrospective study of 169 French LT recipients, 7.7% and 3% of the patients were HEV IgG-positive and HEV IgM-positive, respectively. Prolonged persistence of HEV IgM for >1 year was observed in all IgM-positive patients including the two cases of chronic E hepatitis assessed this study.

In area of low HEV seroprevalence, reactivation or chronic E hepatitis in liver transplant patients seems very rare.

SERMENT D'HYPPOCRATE



Qui diis memorem laudes, repetamque fideles
 Ingenij dotes, Hippocratisque decus.
 Democriti auditor Phœbea, ô, Coë propago,
 Certius an quis te tradidit artis opes?

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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.

GAILLARD Stéphanie

Virus de l'hépatite E: Mise en place du diagnostic moléculaire au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble. Etudes de prévalence chez les patients co-infectés VIH-VHC et les transplantés hépatiques

RESUME:

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'hépatites aiguës autochtones. Il est actuellement décrit chez des patients immunodéprimés avec passage à la chronicité.

Nous avons adapté une technique de RT-PCR temps réel du VHE décrite par Jothikumar *et al* en 2006 amplifiant une région conservée de l'ORF3. Ses performances analytiques montrent une quantification linéaire de 100 à 10⁶ copies/ml, une spécificité de 100% et une variabilité intra et inter-essais faible confortent la robustesse et fiabilité de notre technique.

Les études rétrospectives de prévalence du VHE ont associées cette méthode moléculaire et un test sérologique commercialisé (IgG +IgM).

La première a été menée parmi 111 patients co-infectés par le VIH et le VHC inclus dans l'étude multicentrique française ANRS-HCO2-RIBAVIC. Nous rapportons une faible séroprévalence à 2,7% sans marqueurs d'infection récente. La toxicomanie, mode principal de contamination de cette population, ne nous apparaît pas comme un facteur de risque supplémentaire d'infection par le VHE.

La seconde a été réalisée sur 169 sérums post-transplantation hépatique et 81 pré-transplantation de patients suivis au CHU de Grenoble. La séroprévalence du VHE en pré-transplantation est de 9,9% et en post-transplantation de 7,7%. La séroprévalence trouvée à 5,4% parmi le personnel hospitalier grenoblois n'est pas significativement différente ($p=0,1830$). Aucune réactivation virale n'a été détectée. Trois primo-infections sont retrouvées avec évolution chronique dans 2 cas. Ces résultats suggèrent que cette population ne semble pas plus à risque d'infection par le VHE que la population générale locale et qu'une évolution chronique reste possible.

MOTS-CLES :

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| - Virus de l'hépatite E | -co-infection VIH/VHC |
| - RT-PCR | - toxicomanie |
| - séroprévalence | - transplantés hépatiques |

JURY :

Monsieur le Professeur P. Morand
Monsieur le Professeur V. Leroy
Madame le Docteur N. Sturm
Madame le Docteur S. Larrat

ADRESSE DE L'AUTEUR :

GAILLARD Stéphanie
6 chemin des grenouilles
38700 La Tronche