

Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite E.

M. Grandadam (1), E. Nicand (1), H. Van Cuyck-Gandré (2) & Y. Buisson (1)

(1) Laboratoire de biologie clinique, Hôpital d'instruction des armées Val-de-Grâce, Paris, France. Tél. : 33 (0)1 40 51 46 30, fax: 33 (0)1 40 51 42 98, e-mail : rt@filnet.fr

(2) Centre de recherches du Service de santé des armées, Unité de virologie, La Tronche, France.

Summary: Geographical Distribution of Hepatitis E Virus Genotypes.

Hepatitis E virus (HEV) is the major agent of acute hepatitis in developing countries where the infection occurs sporadically or in large waterborne epidemics. HEV, classified in the Caliciviridae, is not culturable. The detection of HEV RNA by RT-PCR in serum and stool samples is reliable during the 7 to 15 days following the onset of the disease. Restriction endonuclease analysis, cloning and sequencing of PCR products allow a phylogenetic analysis of HEV isolates. Although they belong to a single serotype, strains recovered from different geographical regions display a significant genetic heterogeneity. Sequencing data from ORF1 and ORF2 regions has led to the characterization of 3 distinct genotypes : genotype I gathering the Asian and African subgenotypes ; genotype II gathering swine and human US strains ; genotype III limited to the Mexico prototype. Novel variants are currently described from Africa (Nigeria), China and Europe (Greece and Italy). Each genotype appears to be related to a well defined geographical area. Nevertheless, a genetic variability is observed within endemic regions such as Asia or Africa. Nigerian endemic isolates especially could represent an intermediate stage in the evolutionary process towards genetic diversity. The animal reservoir, proved by the detection of HEV sequences by PCR among pigs in Nepal and in the USA, could help to resolve unanswered questions about the origin of HEV genotypes, their spread and evolution.

Key-words: Hepatitis E virus - Genotype - Epidemiology

Résumé :

Le virus de l'hépatite E (VHE) est le principal agent d'hépatites aiguës dans les pays en voie de développement. Le diagnostic sérologique peut être complété par la détection du génome viral par RT-PCR dans les selles et dans le sérum pendant 7 à 15 jours après le début de la maladie. Par cartographie de restriction et séquençage des produits d'amplification, il est possible d'effectuer une analyse phylogénétique des isolats. Trois génotypes de VHE sont caractérisés : le génotype I regroupe des sous-génotypes asiatiques et africains, le génotype II correspond à des souches humaines et porcines isolées aux États-Unis, le génotype III se limite à l'unique souche Mexico. Si chaque génotype est relié à une zone géographique bien définie, une variabilité génétique peut s'observer au sein d'une même région endémique pour l'hépatite E. Cette variabilité apparaît particulièrement importante dans le continent africain où la caractérisation des souches endémiques du Nigéria révèle un statut intermédiaire dans la diversification phylogénétique des VHE. Une étude extensive du réservoir animal permettra de mieux appréhender l'évolution des génotypes dans le temps et dans l'espace.

Mots-clés : Virus de l'hépatite E - Génotype - Épidémiologie

Introduction

Identifié en 1990, le virus de l'hépatite E (VHE) est le principal agent d'hépatites virales entéro-transmissibles dans de nombreux pays en développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine. Essentiellement propagé par l'eau de boisson contaminée, il provoque une hépatite aiguë, comparable à celle de l'hépatite A, n'évoluant pas vers la chronicité. Après une phase prodromique de 3 à 7 jours, associant inconstamment une asthénie fébrile et des troubles digestifs, apparaît un syndrome ictérique qui régresse au bout d'une semaine. Les manifestations extra-hépatiques et les rechutes sont rares. L'infection est asymptomatique dans plus de la moitié des cas, plus fréquemment chez l'enfant que chez l'adulte. Les formes fulminantes sont responsables d'une létalité de 1 à

3 % chez les adultes des deux sexes et de 10 à 20 % chez les femmes enceintes au cours du dernier trimestre de la grossesse.

Classé dans la famille des *Caliciviridae*, le VHE est un virus sphérique, non enveloppé, mesurant 32-34 nm de diamètre et présentant des spicules et des indentations à sa surface. Il possède un génome de 7 194 nucléotides constitué d'un ARN simple brin, polyadénylé de polarité positive. Il existe 3 cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames : ORF) partiellement chevauchants. Le plus grand, ORF1, commence à l'extrémité 5' du génome et comporte 5 079 nucléotides. Il code des protéines non structurales, dont une hélicase et une ARN polymérase. Le second cadre de lecture de 1 980 nucléotides, ORF2, est prolongé en 3' par un segment non codant de 65 bases, puis d'une extrémité polyadénylée. ORF2 code la protéine

majeure de capsidie contenant les principaux épitopes viraux. Son extrémité carboxy-terminale joue un rôle dans l'encapsulation du virus. Le troisième cadre de lecture, ORF3, de 369 nucléotides, code une protéine dont la fonction est inconnue à l'heure actuelle. Il chevauche ORF1 et ORF2 d'un et de 328 nucléotides, respectivement (3).

Il n'existe qu'un seul sérotype du VHE, les séquences peptidiques des isolats provenant de différentes régions du monde étant relativement bien conservées, en dépit d'une importante variabilité génétique.

L'hépatite E dans le monde

L'hépatite E est endémo-épidémique dans de nombreux pays économiquement défavorisés et dont le niveau d'hygiène collective est insuffisant. Généralement dues à une source de contamination unique, les épidémies sont de type hydrique, avec un début brutal et des dizaines de milliers de cas, notamment dans le sous-continent Indien (Inde, Pakistan, Bangladesh), en Asie du Sud-est (Birmanie, Thaïlande, Indonésie, Chine, Népal), en Afrique (pays du Maghreb, Egypte, Somalie, Kenya) et en Amérique latine (Mexique). Des périodes plus ou moins longues séparent les bouffées épidémiques, de quelques années à plusieurs dizaines d'années, la maladie s'exprimant alors sur un mode sporadique. L'apport de sujets neufs en zone endémique peut aussi engendrer des épidémies, comme parmi les militaires français engagés au Tchad entre 1983 et 1985 (10) et en Somalie en 1993 (5). Des cas sporadiques d'hépatite E ont été rapportés dans les pays industrialisés, en Amérique du Nord, en Europe, au Japon et en Australie. Il s'agit presque toujours de cas importés, se déclarant moins de trois mois après un séjour dans une région endémique. Certains cas ont cependant été décrits chez des patients n'ayant pas effectué de voyage récent dans de telles régions (16,17). Les enquêtes séro-épidémiologiques réalisées dans différentes régions du monde donnent des résultats inattendus : les taux de séroprévalence des anticorps anti-VHE sont relativement faibles dans les régions de forte endémicité et relativement élevés dans les régions de faible endémicité. En Inde, seulement 33 à 40 % des adultes jeunes possèdent des anticorps anti-VHE (1), alors que, chez les donneurs de sang des pays développés, les taux sont de 1 à 3 %, faisant soupçonner une circulation occulte de VHE ou de virus antigéniquement apparentés (20).

Méthodes d'identification et de typage des souches de VHE

Prélèvements

Le VHE est présent dans les selles 8 à 10 jours avant l'apparition de l'ictère. La densité peut atteindre 10^8 particules virales par gramme de selles, mais l'excrétion fécale diminue très vite, le virus n'étant généralement plus détectable par immunomicroscopie électronique après 10 jours. On peut aussi le rechercher dans le sérum, la bile et le foie par des méthodes d'amplification génomique. La virémie précède l'apparition de l'ictère de 2 à 3 jours, persiste au moins une semaine et peut se prolonger durant une vingtaine de jours. Le génome viral peut être mis en évidence précocément dans le sang ou dans les selles, avant qu'apparaissent les anticorps spécifiques dans le sérum, et peut rester détectable plusieurs jours à plusieurs semaines après la séroconversion. La sensibilité diagnostique des méthodes d'amplification est évaluée à 69 % sur les selles et à 85 % sur le sérum (9).

Amplification de l'ARN viral

Deux régions indépendantes du génome du VHE sont amplifiées par *reverse transcriptase - nested polymerase chain reaction* (RT-PCR nichée), l'une au niveau du gène de la polymérase dans l'ORF1 (11), l'autre dans la région 3' de l'ORF2 (23). Les amorces utilisées correspondent aux séquences de la souche Burma (19). Les génotypes des souches sont déterminés sur les produits d'amplification après contrôle de leur spécificité par hybridation moléculaire.

Cartographie de restriction

Après amplification, l'analyse des produits de PCR par les enzymes de restriction *Kpn I*, *Bsm I*, *Not I* pour l'ORF2 et *Sma I* pour l'ORF1 permet d'effectuer un génotypage rapide des isolats de VHE, réalisable en 2 à 3 heures (11).

Clonage et séquençage

Les amplicons fraîchement préparés sont purifiés et clonés dans un plasmide. Les plasmides recombinants sont sélectionnés, puis purifiés. Trois clones au moins sont séquencés pour chaque souche de VHE afin d'établir une séquence consensus fiable. Le séquençage direct à partir des produits internes d'amplification est également possible. Les séquences sont déterminées à partir des deux brins pour lever d'éventuelles ambiguïtés.

Analyse phylogénétique

Les séquences d'acides aminés correspondant aux régions amplifiées étant hautement conservées, l'étude de la diversité génétique du VHE est réalisée par analyse des séquences nucléotidiques (21). Toutefois, le seuil de divergence entre deux génotypes différents reste arbitraire. Par analogie avec la classification des *Picornaviridae*, la répartition des souches de VHE en génotypes distincts a été effectuée sur la base d'un seuil de divergence des séquences nucléotidiques de 15 %, une distance génétique supérieure à 7,5% permettant de différencier des sous-génotypes au sein de chaque génotype (13). La construction d'arbres phylogéniques impose l'emploi de méthodes statistiques, telles que *neighbor joining* (NJ) ou *maximum parsimony* (MP), qui permettent de quantifier la précision des groupements de souches (21).

Hétérogénéité génétique du VHE

Les premiers isolats de VHE complètement séquencés sont la souche prototype Burma isolée en Birmanie (Myanmar) (19), la souche Mexico isolée au Mexique (12), une souche pakistanaise (22) et une souche chinoise (2). La divergence la plus importante est observée dans la région ORF1 codant l'ARN polymérase, avec seulement 77 % d'homologie entre la souche Burma et la souche Mexico, qui représentent à ce jour les deux génotypes les plus éloignés phylogéniquement.

La comparaison des séquences des gènes ORF2, sur des isolats d'origine géographique différente, montre que la variabilité de cette zone s'accroît de la partie 3' vers la partie 5'. L'analyse d'hétérogénéité dans l'ORF2 permet de distinguer actuellement trois génotypes (21). Le génotype I réunit l'ensemble des souches asiatiques et africaines séquencées à ce jour. Le génotype II est représenté par une souche porcine (15) et deux souches humaines isolées aux États-Unis (16). Le génotype III n'est constitué que d'une seule souche, le prototype Mexico.

Très récemment, 6 isolats d'origine chinoise ont été analysés et proposés pour la définition d'un quatrième génotype (25). Mais leurs séquences, de longueur restreinte ou établies dans des régions non habituelles pour le génotypage du VHE, ne permettent pas encore de valider ce génotype.

Il existe une variabilité intragénotypique qui, dans l'état actuel des connaissances, ne peut être décrite qu'au sein du génotype I. Deux sous-types sont individualisés : le sous-type asiatique I-1 et le sous-type africain I-2. Le sous-type asiatique est lui-même subdivisé en trois groupes : I-1a (type chinois), I-1b (type Burma) et I-1c (type fulminant) (21). Les premiers isolats d'Afrique, qui étaient apparus plus proches des isolats asiatiques que de celui du Mexique (7,24), forment un groupe homogène dans le génotype I (figure 1).

Étude des génotypes africains

Nous avons pu étudier des amplicons obtenus à partir d'échantillons de sérums ou de selles prélevés en phase aiguë d'hépatite E chez des patients contaminés dans différents pays africains du nord (Algérie), de l'est (Djibouti, Somalie) et du centre (Tchad, République centrafricaine, Nigeria). La cartographie de restriction sur les produits d'amplification de la région 3' de l'ORF2 révèle un polymorphisme génétique au sein du génotype I-2, le séquençage démontrant une importante hétérogénéité temporelle et spatiale sur le continent africain. La véritable surprise est venue du Nigeria avec l'étude de cas sporadiques d'hépatite E observés à Port-Harcourt en 1997 et 1998 (4, 6). Le séquençage de 6 isolats a révélé l'existence d'un sous-génotype plus proche de la souche Mexico (87 % d'homologie dans la région ORF1 et 80 % dans la région ORF2) que des souches africaines classées dans le génotype I (74 % d'homologie en ORF1 et 77 % en ORF2). C'est la première fois que des souches de VHE apparentées au génotype III sont isolées et caractérisées depuis la description du prototype Mexico (12). Le fait que la souche Nigeria conserve quelques marqueurs génétiques spécifiques du génotype I (tableau I) suggère qu'elle se situe à un niveau intermédiaire dans la diversification phylogénétique des VHE (6).

Tableau I.

Cartographie de restriction des régions ORF1 (polymérase) et ORF2 (extrémité 3') sur les souches de VHE de référence (Burma, Mexico) et sur différentes souches africaines. Cartography of restrictions of regions ORF1 (polymerase) and ORF2 (extremity 3') on reference HVE strains (Burma, Mexico) and various strains.

Souches de VHE	génotypes	ORF2			
		ORF1 Sma I	Kpn I	Not I	Bsm I
Burma	I	-	+	-	+
Mexico	III	+	-	+	+
Djibouti, RCA, Somalie	I	-	+	-	+
Nigeria	III	+	-	+	+

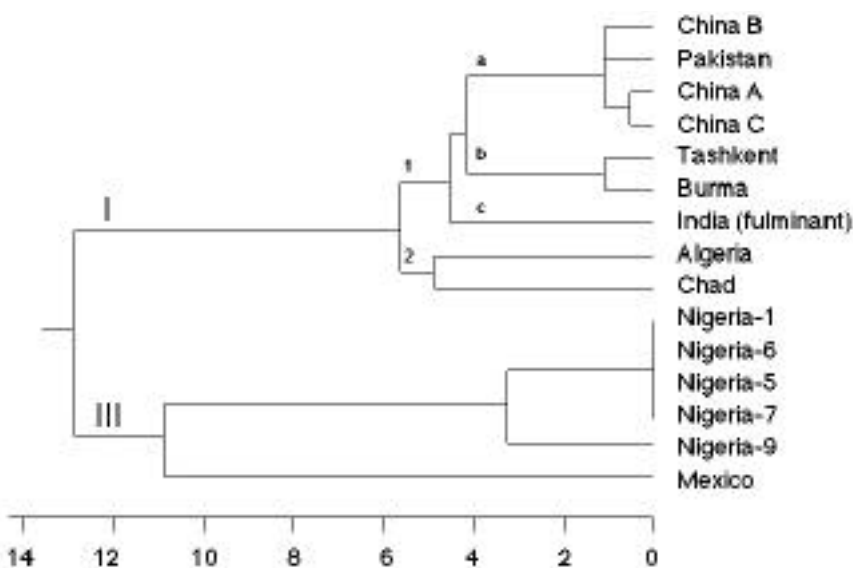
Entre parenthèses, position du site de restriction.

L'hépatite E est-elle une zoonose ?

Il est tentant d'essayer de faire coïncider la diffusion des différents génotypes du VHE dans les continents avec les grandes migrations de populations qui ont jalonné l'histoire de l'humanité. Cette démarche, très téméraire si l'on tient compte du faible nombre de souches de VHE séquencées à ce

Figure 1.

Variabilité génétique des souches de VHE dans les génotypes I et III (séquençage de la région 3' de l'ORF2, une échelle graduée indique le pourcentage de différences génétiques). Genetic variability of HVE strains in genotypes I and III.



jour, pourrait être compromise par la méconnaissance du rôle joué par le réservoir animal.

En effet, de nombreux arguments soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'hépatite E serait avant tout une zoonose. Le premier tient à sa classification dans la famille des *Caliciviridae* qui regroupe une majorité de virus d'origine animale dont certains ont montré leur aptitude à franchir les barrières d'espèces (18).

L'hypothèse d'un réservoir animal offre une solution intéressante à l'énigme du devenir du VHE en période interépidémique, le portage du VHE chez l'homme étant limité dans le temps. Comment admettre que ce virus, fragile dans les conditions de laboratoire, puisse conserver son infectivité plusieurs années dans l'environnement ? En 1995, 18 porcs domestiques sur 55 testés ont été trouvés porteurs d'anticorps anti-VHE dans la vallée de Katmandou au Népal ; 3 étaient positifs en RT-PCR (8). En 1997, aux États-Unis, une souche de VHE a été identifiée chez le porc, appartenant à un génotype différent des génotypes humains décrits jusqu'alors (15). L'année suivante, deux cas d'hépatite E aiguë ont été rapportés chez des adultes résidant aux États-Unis et n'ayant pas fait de voyage récent en région d'endémie ; ces deux souches (US-1 et US-2), génétiquement très proches de la souche porcine, définissent le génotype II (16). L'inoculation de singes rhésus avec la souche porcine et l'inoculation de porcs avec les souches US-1 et US-2 provoquent l'infection, démontrant l'aptitude de ces souches à franchir la barrière d'espèce dans les deux sens (14).

On observe, enfin, que le VHE est mal adapté à l'homme comme en témoignent sa faible transmissibilité de personne à personne, la fréquence des infections asymptomatiques sans séroconversion et la faible amplitude des réponses immunitaires.

Conclusion

Identifié il y a moins de 10 ans, le VHE semble beaucoup plus largement répandu dans le monde que ne le laissent supposer les premières données épidémiologiques. La répartition géographique des différents génotypes et de leurs variants soulève de nombreuses questions non résolues. L'identification des hôtes réservoirs préférentiels du VHE sera une étape décisive vers la compréhension de son origine et de son évolution phylogénétique.

Références bibliographiques

- ARANKALLE VA, TSAREV SA, CHADLA MS, ALLING DW, EMERSON SU *et al.* - Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982-1992. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 447-450.
- BI SL, CHONGBAI L, XIUYI C *et al.* - Molecular cloning and sequencing of the whole Chinese hepatitis E virus genome. *Chinese J Virol*, 1992, **8**, 271-279.
- BRADLEY DW - Hepatitis E: a brief review of the biology, molecular virology and immunology of a novel virus. *J Hepatol*, 1995, **22** (Supp 1), 140-145.
- BUISSON Y, CHEVAL P, GRANDADAM M, NICAND E, BÉGOT L *et al.* - Nigerian hepatitis E virus isolates are closely related to the Mexico genotype. Abstract H162, *38th ICAAC Proceedings*, San Diego, 1998.
- BUISSON Y, COURSAGET P, BERCIÓN R, ANNE D, DEBORD T & ROUÉ R - Hepatitis E virus infection in soldiers sent to endemic regions. *Lancet*, 1994, **344**, 1165-1166.
- BUISSON Y, GRANDADAM M, NICAND E, CHEVAL P, VAN CUYCK-GANDRÉ H *et al.* - Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria: a lacking link between African and Latin American strains? *J Gen Virol*, 1999 (soumis pour publication).
- CHATTERJEE R, TSAREV S, PILLOT J, COURSAGET P, EMERSON SU & PURCELL RH - African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J Med Virol*, 1997, **53**, 139-144.
- CLAYSON ET, INNIS BL, MYINT KSA, NARUPITI S, VAUGHNDW *et al.* - Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **53**, 228-232.
- CLAYSON ET, MYINT KSA & SNITBHAN R - Viremia, fecal, shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis*, 1995, **172**, 927-933.
- COURSAGET P, KRAWCZYNSKI K, BUISSON Y, NIZOU C & MOLINIÉ C - Hepatitis E and hepatitis C virus infections among French soldiers with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol*, 1993, **39**, 163-166.
- GOUVEA V, HOKE CH & INNIS B - Genotyping of hepatitis E virus in clinical specimens by restriction endonuclease analysis. *J Virol Methods*, 1998, **70**, 71-78.
- HUANG C, NGUYEN D, FERNANDEZ J, YUN KY, FRY KE *et al.* - Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 1992, **191**, 550-558.
- LEMON SM & ROBERTSON BH - Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin Virol*, 1993, **4**, 285-295.
- MENG XJ, HALBUR PG, SHAPIRO M, GOVINDARAJAN S, BRUNA JD *et al.* - Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*, 1998, **72**, 9714-9721.
- MENG XJ, PURCELL RH, HALBUR PG, LEHMAN JR, WEBB DM *et al.* - A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 9860-9865.
- SCHLAUDER GG, DAWSON GJ, ERKER JC, KWO PY, KNIGGE MF *et al.* - 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*, 1998, **79**, 447-456.
- SCHLAUDER GG, DESAI SM, ZANETTI AR, TASSOPOULOS NC & MUSHAHWAR IK - Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*, 1999, **57**, 243-251.
- SMITH AW, SKILLING DE, CHERRY N, MEAD JH & MATSON DO - Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis*, 1998, **4**, 13-20.
- TAM AW, SMITH MM, GUERRA ME, HUANG CC, BRADLEY DW *et al.* - Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991, **185**, 120-131.
- THOMAS DL, YARBOUGH PO, VLAHOV D, TSAREV SA, NELSON KE *et al.* - Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 1244-1247.
- TSAREV SA, BINN LN, GOMATOS PJ, ARTHUR RR, MONIER MK *et al.* - Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol*, 1999, **57**, 68-74.
- TSAREV SA, EMERSON SU, REYES GR, TSAREVA TS, LEGTERS LJ *et al.* - Characterisation of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**, 559-563.
- Van CUYCK-GANDRÉ H, CAUDILL JD, ZHANG HY, LONGER CF, MOLINIÉ C *et al.* - Short report: polymerase chain reaction detection of hepatitis E virus in north African fecal samples. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 134-135.
- Van CUYCK-GANDRÉ H, ZHANG HY, TSAREV S, CLEMENTS NJ, COHEN SJ *et al.* - Characterization of Hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J Med Virol*, 1997, **53**, 340-347.
- WANG Y, LING R, ERKER JC, ZHANG H, LI H *et al.* - A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol*, 1999, **80**, 169-177.