

Virus de l'hépatite E : de l'organisme infecté à la réponse cellulaire

Sébastien Lhomme^{1,2,3}Florence Abravanel^{1,2,3}Nicolas Capelli^{1,2,3}Olivier Marion^{1,3,4}Hicham El Costa^{1,2}Nabila Jabrane-Ferrat^{1,3}Qian Chen^{1,3}Jordi Gouilly^{1,3}Éric Champagne^{1,3}Sabine Chapuy-Regaud^{1,2,3}Nassim Kamar^{1,3,4}Jacques Izopet^{1,2,3}

¹ Inserm U1043/CNRS U5282, Centre de physiopathologie Toulouse-Purpan, Équipe « infection virale : persistance, réponse de l'hôte et physiopathologie », CHU Purpan, BP3028, 31024 Toulouse cedex 3, France

² CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de virologie, Institut fédératif de biologie de Purpan, 330 avenue de Grande-Bretagne, 31300 Toulouse, France

³ Université Paul-Sabatier, 118 Route de Narbonne 31330 Toulouse, France

<lhomme.s@chu-toulouse.fr>

⁴ CHU de Toulouse, Hôpital Rangueil, Service de néphrologie-hypertension artérielle-dialyse-transplantation, 1 avenue du Pr Jean Poulhès, 31400 Toulouse, France

Résumé. Le virus de l'hépatite E (VHE) est largement répandu à l'échelle planétaire. Dans les pays en développement, les épidémies liées aux génotypes 1 et 2 (VHE1 et VHE2) sont dues à l'ingestion d'eau contaminée. Dans les pays industrialisés, les cas sporadiques liés aux génotypes 3 et 4 (VHE3 et VHE4) sont principalement dus à la consommation de viande contaminée du fait de l'existence d'un réservoir animal (porc, sanglier, cerf, lapin. . .). Les travaux les plus récents ont mis en évidence de nouvelles formes cliniques, en particulier les manifestations neurologiques lors d'infections par le VHE3. Le rôle de différentes protéines virales a pu être précisé. La polyprotéine non structurale ORF1 semble jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée. La protéine de capsid ORF2 a été décrite sous deux formes : une libre, glycosylée, retrouvée dans le plasma et une non glycosylée s'assemblant pour former la capsid. La protéine ORF3, impliquée dans la sortie du virus de la cellule, se comporte comme une protéine de canal ionique ou viroporine. Enfin, l'utilisation de nouveaux systèmes de culture cellulaire et de nouveaux modèles animaux vont permettre de mieux décrire le cycle de réplication et la pathogenèse de l'infection.

Mots clés : virus de l'hépatite E, virologie moléculaire, immunité innée, pathogenèse, culture cellulaire, modèle animal

Abstract. Hepatitis E virus (HEV) presents a worldwide distribution. In developing countries, hepatitis E, related to HEV1 and HEV2, is a waterborne disease. In developed countries, hepatitis E is a zoonotic disease due to HEV3 and HEV4. It is mainly transmitted through meat consumption from animal reservoirs such as pig, boar, deer and rabbit. New clinical forms include neurological manifestations that are now clearly associated with HEV3 infection. Recent studies showed that ORF1 polyprotein was able to disrupt the innate immune response. It was also shown that ORF2 protein exists at least in two forms: a free, glycosylated form and a non-glycosylated form, which assembles to form the capsid. Lastly, it was shown that ORF3 protein, involved in the virus egress, acts as a viroporin. New culture systems and animal models have been developed recently, and will be very helpful to complete our understanding of HEV life cycle and pathogenesis.

Key words: hepatitis E virus, molecular virology, innate immunity, pathogenesis, cell culture systems, animal models

Introduction

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'épidémies dans les pays en développement où le virus est endémique. Le virus a été visualisé pour la première fois en microscopie électronique en 1983 à partir d'un prélèvement de

selles de l'investigateur infecté expérimentalement. Cette découverte a rapidement été suivie par le clonage et le séquençage du génome viral de souches isolées en Birmanie et au Mexique. Les cas d'hépatite E aiguë recensés dans les pays industrialisés ont été pendant longtemps considérés comme des cas importés. Cependant, la découverte d'un réservoir porcin au début des années 1990 a par la suite permis de conclure à l'origine autochtone de la plupart des cas d'infection par le VHE dans les pays industrialisés.

Tirés à part : S. Lhomme

La majorité des infections par le VHE sont asymptomatiques et spontanément résolutes. La persistance du virus chez les personnes immunodéprimées ainsi que la survenue de manifestations extrahépatiques, notamment neurologiques et rénales, n'ont été décrites que récemment. La mise au point de systèmes de culture cellulaire ainsi que l'utilisation de modèles animaux ont récemment permis d'améliorer notre compréhension concernant différents aspects de l'infection. Dans cette revue, nous nous intéresserons, dans un premier temps, aux modes de transmission, aux principales manifestations cliniques ainsi qu'aux moyens de contrôle de l'infection par le VHE. Nous aborderons ensuite les principales caractéristiques virologiques du VHE, son cycle de réplication ainsi que les principaux modèles *in vitro* et animaux ayant permis des avancées majeures.

Taxonomie

Le VHE appartient à la famille des Herpesviridae qui inclut deux genres (figure 1). Le genre *Orthohepevirus* regroupe les virus infectant les mammifères (*Orthohepevirus* A, C et D) et les oiseaux (*Orthohepevirus* B). Le genre *Pisciherpesvirus* a pour représentant unique un virus infectant la truite. Seules les souches appartenant à l'espèce *Orthohepevirus* A, comprenant actuellement huit génotypes (VHE1-8), ont été associées à des cas humains. La répartition géographique des principaux génotypes est indiquée sur la figure 2. Le VHE1 et le VHE2 infectent exclusivement l'homme tandis que le VHE3 et le VHE4 peuvent contaminer le porc, le sanglier, les cervidés ou le lapin. Le VHE5 et le VHE6, plus rares, ont été caractérisés chez le sanglier et les VHE7-VHE8 chez le chameau et le dromadaire. Les génotypes

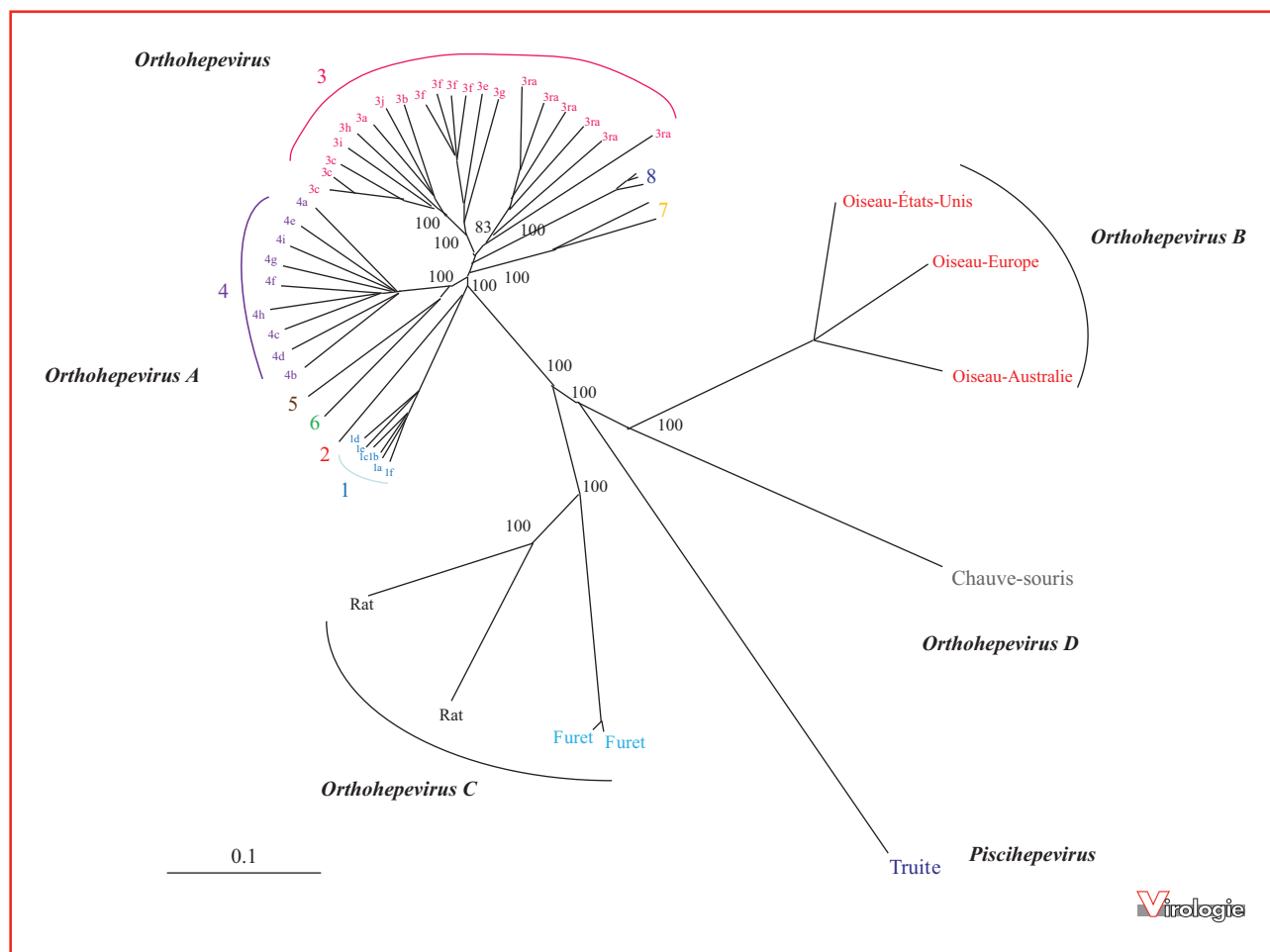


Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de génomes complets disponibles du virus de l'hépatite E (VHE). Les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel ClustalW. L'arbre phylogénétique a été obtenu avec la méthode de Neighbor-Joining (correction de Kimura à deux paramètres). L'espèce *Orthohepevirus* A est divisée en huit génotypes : les génotypes 1 et 2 sont strictement humains tandis que les génotypes 3 à 8 possèdent un réservoir animal. Plusieurs sous-génotypes (désignés par une lettre) ont été décrits pour les génotypes 1 à 4.

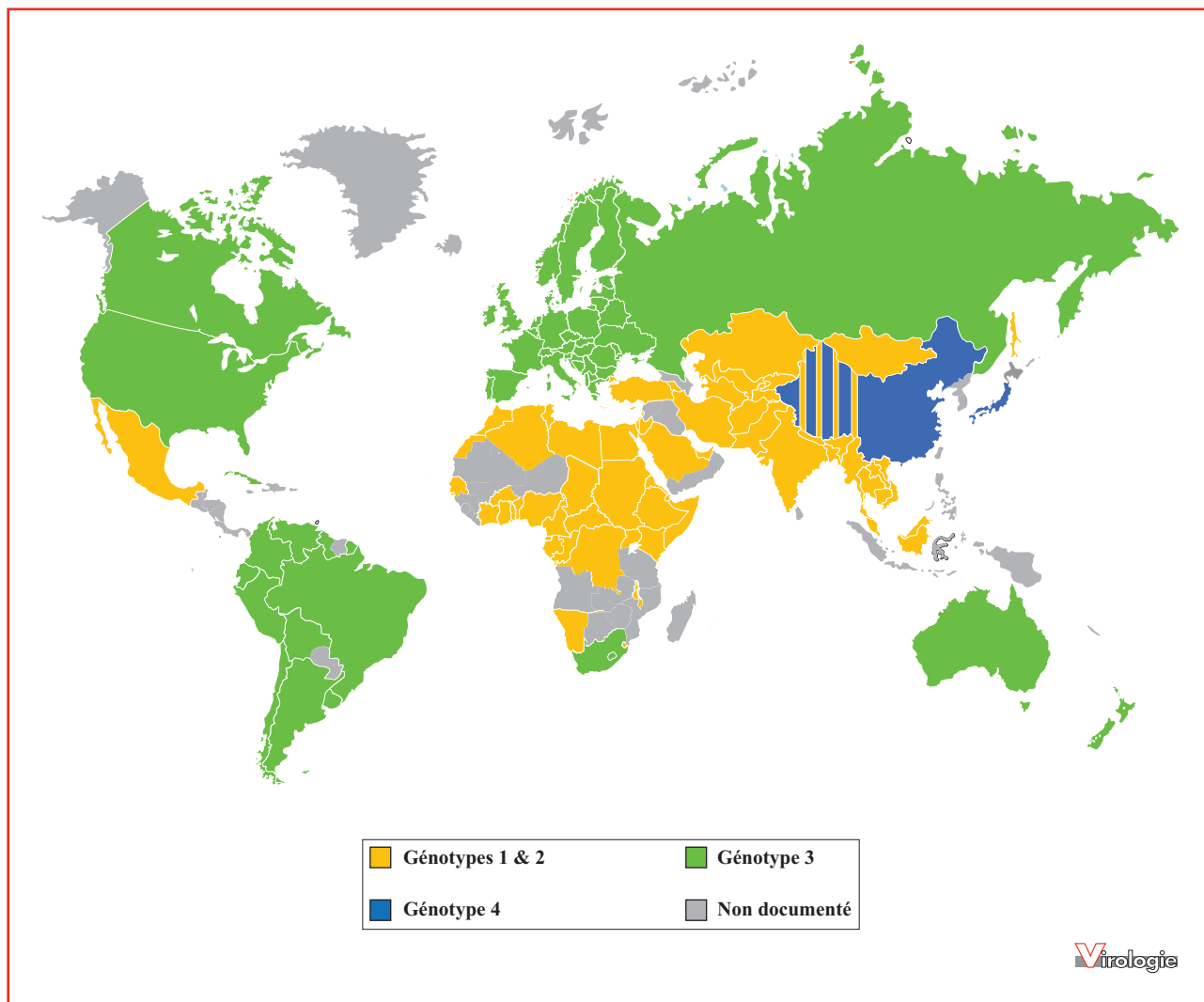


Figure 2. Répartition géographique des principaux génotypes du virus de l'hépatite E (VHE). Le génotype 4 est retrouvé de façon ponctuelle en Europe.

1 à 4 sont divisés en sous-génotypes et leur dénomination s'effectue par comparaison avec des séquences de référence [1]. Ainsi, le génotype 3, génotype prédominant en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, comporte plusieurs sous-génotypes appartenant à trois clades [2]. Le premier clade contient deux groupes phylogénétiques : le premier contenant les sous-génotypes 3a, 3b, 3j et 3k, rares en Europe, et le second contenant les sous-génotypes 3c, 3h et 3i. Le deuxième clade contient les sous-génotypes 3e, 3f et 3g. Enfin, le troisième clade correspond au sous-génotype 3ra (lapin).

Mode de transmission

Dans les pays en voie de développement où l'hygiène collective est insuffisante, la voie hydrique constitue le principal mode de contamination par le VHE1 et le VHE2. Dans les pays industrialisés, une transmission hydrique du VHE3 et du VHE4 ne peut être exclue. Une étude récente, menée chez les donneurs de sang français, a mis en évidence une séroprévalence des anticorps IgG anti-VHE plus élevée chez les personnes consommant l'eau du robinet plutôt qu'embouteillée [3]. En Europe, le VHE3 a été retrouvé

dans les eaux de rivière, les eaux usées ou bien encore dans les fruits de mer. Le VHE est le seul virus hépatotrope possédant un réservoir animal à l'origine d'une transmission zoonotique. Ce mode de contamination, lié à la consommation de viande contaminée insuffisamment cuite, concerne le VHE3 et le VHE4. Le porc représente le principal réservoir animal. Il peut être infecté par le VHE3 (Europe) ou par le VHE4 (Asie). La saucisse de foie, le figatellu, les abats et la viande de sanglier sont les aliments les plus à risque. Le contact direct avec des animaux infectés par le VHE représente un autre mode de contamination. La transmission du VHE par transfusion de produits sanguins labiles a été documentée aussi bien dans les pays en développement que dans les pays industrialisés [4]. Enfin, la transmission *in utero* du VHE de la mère à l'enfant est possible et peut atteindre 33 % [5].

Manifestations cliniques

Infection aiguë

Le VHE est responsable d'infections asymptomatiques dans 60 à 90 % des cas, mais des formes ictériques ou fulminantes avec insuffisance hépatique sévère sont possibles. Dans les pays à ressources limitées, les cas d'hépatite E aiguë concernent plutôt l'adolescent et l'adulte jeune (15-35 ans), avec une prédominance masculine. Plusieurs études ont rapporté une gravité supérieure de l'infection par le VHE chez la femme enceinte. Le taux de létalité maternelle est d'environ 25 % lorsque l'infection survient au cours du troisième trimestre. L'infection par le VHE au cours de la grossesse est associée à des avortements spontanés plus élevés, une plus grande mortalité intra-utérine, une prématurité des enfants, un petit poids de naissance et une plus grande mortalité périnatale [6].

Dans les pays industrialisés, le VHE touche préférentiellement les hommes, à un âge plus avancé (> 55 ans). Les formes sévères n'ont pas été décrites chez la femme enceinte. La surinfection par le VHE sur une hépatopathie existante conduit à une plus forte morbidité et mortalité [6]. Elle peut entraîner une décompensation sévère se manifestant par une ascite et une encéphalopathie hépatique plus ou moins prononcée.

Infection chronique

Des infections chroniques par le VHE, définies par la persistance de l'ARN viral pendant plus de trois mois dans le sang, ont été décrites chez les patients immunodéprimés, notamment les patients transplantés d'organes solides [7, 8], les patients atteints d'une hémopathie [9] ou les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec un faible nombre de lymphocytes T CD4 [10].

Chez les patients transplantés d'organes, une évolution vers la chronicité est observée dans 60 % des cas. Une plus grande complexité et diversité de la quasi-espèce virale au stade aigu sont associées à l'évolution vers une infection chronique [11, 12]. La persistance du VHE conduit à une progression plus rapide de la fibrose hépatique comparativement au virus de l'hépatite C (VHC) [13, 14].

Manifestations extrahépatiques

Des manifestations extrahépatiques ont été décrites au cours des infections par le VHE, comme des thrombopénies, des anémies hémolytiques ou des pancréatites. Des manifestations neurologiques ont également été observées, en particulier un syndrome de Parsonage-Turner (amyotrophie névralgique), un syndrome de Guillain-Barré ou des méningo-encéphalites [15, 16]. Une étude prospective française a montré que 16,5 % des patients infectés par le VHE présentaient des troubles neurologiques à la phase aiguë de l'infection [17]. Les troubles neurologiques étaient retrouvés plus fréquemment chez les patients immunocompétents (22,6 %) comparativement aux patients immunodéprimés (3,2 %), suggérant l'implication du système immunitaire dans la physiopathologie des manifestations neurologiques. La réplication du VHE dans le système nerveux central pourrait également être à l'origine de certaines de ces manifestations. L'analyse des quasi-espèces virales dans le sérum et le liquide céphalorachidien d'un patient atteint d'un syndrome pyramidal bilatéral associé à des neuropathies périphériques était compatible avec l'émergence de variants neurotropes [18]. Enfin, des atteintes rénales incluant des glomérulonéphrites membranueuses et membranoprolifératives ont également été décrites [19].

Moyens de contrôle de l'infection

La recherche des marqueurs d'infection par le VHE doit être réalisée devant toute cytolase hépatique (élévation des alanine aminotransférases [ALAT]) au même titre que celle des marqueurs des virus de l'hépatite A, B ou C [20]. La cinétique des marqueurs du VHE au cours de l'infection aiguë est illustrée sur la figure 3. Les IgM apparaissent précocement au début de la phase aiguë et peuvent persister au-delà de trois mois. Les IgG apparaissent peu de temps après les IgM et peuvent persister plusieurs années.

Le diagnostic d'une hépatite E aiguë repose sur la mise en évidence des IgM anti-VHE. La présence des IgG anti-VHE en l'absence d'IgM anti-VHE indique une infection ancienne. L'ARN viral est présent dans le plasma et les selles des patients infectés. La détection de l'ARN du VHE est possible pendant trois à quatre semaines dans le

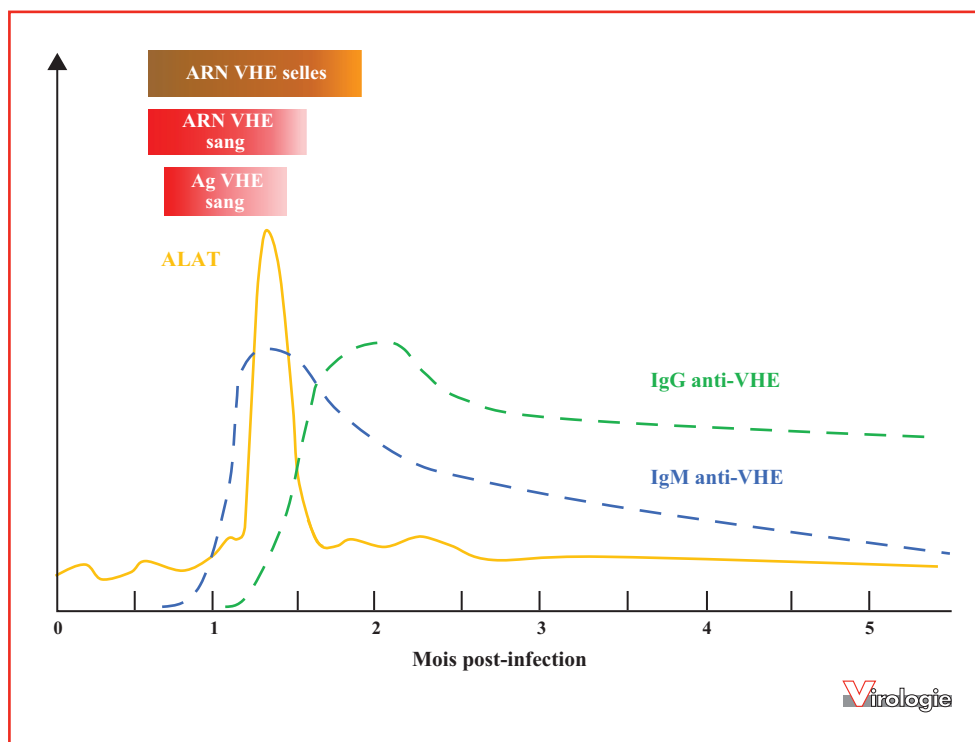


Figure 3. Évolution des paramètres biologiques lors de l'infection aiguë par le virus de l'hépatite E. Ag : antigène ; ALAT : alanine aminotransférases ; Ig : immunoglobuline ; VHE : virus de l'hépatite E.

sang et cinq à six semaines dans les selles après le début des symptômes. Chez l'immunocompétent, la mise en évidence des IgM anti-VHE permet habituellement de poser le diagnostic d'hépatite E aiguë. La sensibilité des tests sérologiques étant moins bonne chez l'individu immunodéprimé, la recherche de l'ARN viral dans le plasma ou les selles est indispensable. Un test antigénique détectant la protéine de capsid offre une alternative moins onéreuse pour le diagnostic direct qu'un diagnostic moléculaire.

Chez les patients chroniquement infectés par le VHE, l'allègement du traitement immunosuppresseur chez le patient transplanté d'organe, lorsque cela est possible, doit être envisagé en première intention. Il permet l'élimination du virus dans environ un tiers des cas [21]. L'effet antiviral sur le VHE de l'interféron (IFN)- α [22] et celui de la ribavirine [23] ont été démontrés. Compte tenu de son administration par voie orale, la ribavirine, administrée en monothérapie pendant trois mois, apparaît comme la molécule de choix pour le traitement d'une hépatite E chronique. Le suivi virologique par PCR dans le sang et les selles trois mois après l'arrêt du traitement permet d'objectiver l'éradication du virus qui survient dans plus de 75 % des cas.

La ribavirine pourrait s'avérer utile au stade aigu en cas d'hépatite E sévère ou en cas d'hépatopathie préexistante.

Bien que le sofosbuvir semble exercer un effet antiviral *in vitro* sur le VHE [24], l'efficacité *in vivo* de cette molécule n'a pas été démontrée, notamment en cas d'échec du traitement par ribavirine.

Un vaccin basé sur une protéine tronquée d'ORF2 (p239) est commercialisé exclusivement en Chine sous le nom d'Hecolin [25].

Le virus de l'hépatite E

Le VHE est un petit virus possédant une capsid à symétrie icosaédrique. Le VHE existe sous deux formes chez le patient infecté : une forme nue et une forme associée à des lipides [26]. Les particules nues, retrouvées dans les selles, possèdent un diamètre de 27-34 nm et une densité de 1,22 g/cm³ sur gradient d'iodixanol. Les particules virales retrouvées dans le sang, d'une cinquantaine de nanomètres de diamètre, présentent une densité de 1,08 g/cm³ sur gradient d'iodixanol du fait de l'association à une membrane lipidique entourant la nucléocapsid. Cette particularité, partagée avec le virus de l'hépatite A, a conduit à proposer le concept de virus quasi enveloppé. Contrairement aux virus enveloppés, le génome des virus quasi enveloppés ne code pas des protéines d'enveloppe (absence de péplomères).

Le génome du VHE est un ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 7,2 kb, coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Les extrémités 3' et 5' sont non codantes. Il existe trois cadres ouverts de lecture (*open reading frame* [ORF]) : ORF1, ORF2 et ORF3 (figure 4). Un quatrième cadre ouvert de lecture (ORF4), interne à ORF1, a été identifié pour le génotype 1 [27]. La protéine ORF4 de 158 acides aminés est synthétisée dans des conditions de stress du réticulum endoplasmique et favorise la réplication du virus en interagissant avec la polymérase virale.

La polyprotéine non structurale

ORF1, d'une taille approximative de 5 kb, est situé à l'extrémité 5' et code la polyprotéine non structurale [28]. Les principaux domaines fonctionnels identifiés sont une méthyltransférase, une cystéine protéase similaire à la papaine, une hélicase et une polymérase à ARN dépendante de l'ARN. Les activités enzymatiques de la méthyltransférase, de l'hélicase et de la polymérase ont été confirmées *in vitro*. La polyprotéine codée par ORF1 ne semble pas être clivée à l'issue de sa traduction [29] : la fonctionnalité ainsi que le rôle de la protéase virale restent à déterminer. Des travaux récents suggèrent que la protéase pourrait interférer avec la mise en place de la réponse immunitaire innée antivirale (cf. la section « Interférence avec la réponse immunitaire innée » page 245).

D'autres domaines ont été identifiés dans la protéine ORF1 par analogie avec d'autres virus : le domaine Y,

le domaine X (ou macrodomaine) et la région riche en proline (PPR) (ou région hypervariable [HVR]). Le domaine Y possède des résidus cystéines conservés au sein des quatre principaux génotypes (C336-C337) qui pourraient correspondre à des sites de palmitoylation. Ces résidus pourraient ainsi être impliqués dans l'interaction d'ORF1 avec les membranes cellulaires du réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi. Le macrodomaine, également retrouvé chez certains virus, comme le virus de la rubéole, catalyse la conversion de l'ADP-ribose-1''-phosphate en ADP ribose. L'ADP-ribosylation pouvant avoir des effets multiples sur les protéines (modification de leur activité enzymatique, ubiquitination et dégradation. . .), ce domaine pourrait favoriser la réplication virale en inhibant la réponse immunitaire innée. Le macrodomaine du VHE possède cette activité ADP ribose hydrolase [30]. La PPR possède une taille et une séquence en acides aminés qui varient en fonction de la souche étudiée. La PPR semble être une région intrinsèquement désordonnée, c'est-à-dire une région dépourvue de structure tridimensionnelle figée mais caractérisée par sa richesse en acides aminés polaires ou chargés [31]. Cette région pourrait jouer un rôle dans l'adaptation du virus à son hôte. L'intégration de fragments de gène humain codant différentes protéines (protéine ribosomale S17, S19, tyrosine aminotransférase, chaîne lourde de l'inter- α trypsine inhibiteur) ou la duplication de gènes du VHE (PPR, polymérase. . .) ont été décrites dans cette région [32-34]. Ces fragments confèrent au virus un avantage réplcatif *in vitro*. Les conséquences de la présence de ces variations de séquences *in vivo* restent à élucider.

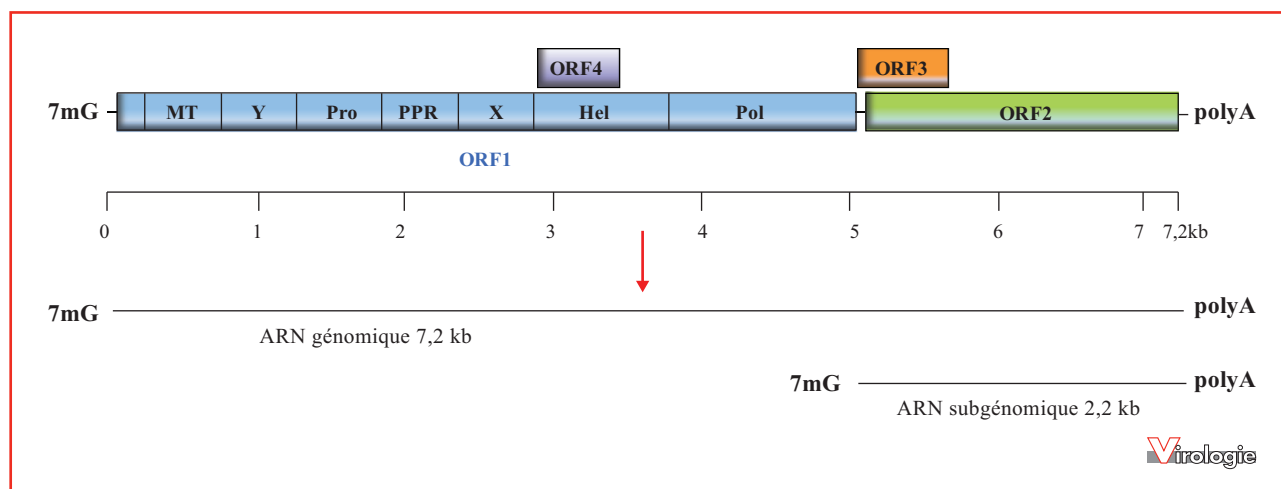


Figure 4. Organisation du génome du virus de l'hépatite E (VHE) pour les génotypes 1 à 4. 7mG : coiffe ; MT : méthyltransférase ; Y : domaine Y ; Pro : protéase ; PPR : région riche en proline ; X : domaine X ; Hel : hélicase ; Pol : ARN polymérase-dépendante de l'ARN ; polyA : queue polyadénylée.

Les protéines de structure ORF2 et ORF3

Les protéines codées par ORF2 et ORF3 sont traduites à partir du même ARN messager bicistronique sous-génomique. ORF2 code la protéine de capsid de 660 acides aminés. La protéine de capsid contient trois domaines. Le domaine S (pour *shell*), le domaine M (pour *middle*) et le domaine P (pour *protruding*) [35]. La protéine de capsid est hautement immunogène. Plusieurs études ont montré que les épitopes reconnus par les anticorps neutralisants sont localisés au niveau du domaine P. Plusieurs formes de protéine de capsid ont été récemment caractérisées [36, 37]. La forme dite infectieuse (protéine ORF2i), non glycosylée, s'assemble pour former la capsid du VHE. La forme libre, ORF2g, est codée à partir d'un codon d'initiation récemment décrit et s'assemble en homodimères. Elle est glycosylée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Cette protéine libre, sécrétée dans le sang, possède une réactivité antigénique proche d'ORF2i et pourrait servir de leurre pour les anticorps neutralisants. Une forme tronquée, ORF2c, a également été décrite. Son origine ainsi que son rôle restent à définir [37].

ORF3 code une petite protéine de 113 acides aminés pour le génotype 3 ou 114 acides aminés pour les génotypes 1, 2 et 4. L'analyse de la séquence primaire n'a montré aucune homologie avec les protéines décrites à ce jour. Cette protéine intervient dans le bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées en s'associant aux lipides. pORF3, grâce à un motif PSAP, interagit avec le gène de susceptibilité tumorale 101 (Tsg101) [38], une protéine du complexe ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) impliquée dans le bourgeonnement des virus enveloppés comme le VIH ou le virus Ebola. Plus récemment, il a été montré que pORF3 se comportait comme un canal ionique (viroporine) nécessaire à la libération des particules virales [39].

Cycle de réplication

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

Le site principal de réplication du VHE est le foie mais d'autres tissus sont probablement infectés. La mise en évidence de brins négatifs d'ARN, représentant des intermédiaires de réplication, au niveau de l'intestin grêle, du côlon et des ganglions lymphatiques chez le porc suggère une réplication du VHE dans ces compartiments. Ainsi, il est possible que le virus se réplique initialement dans le

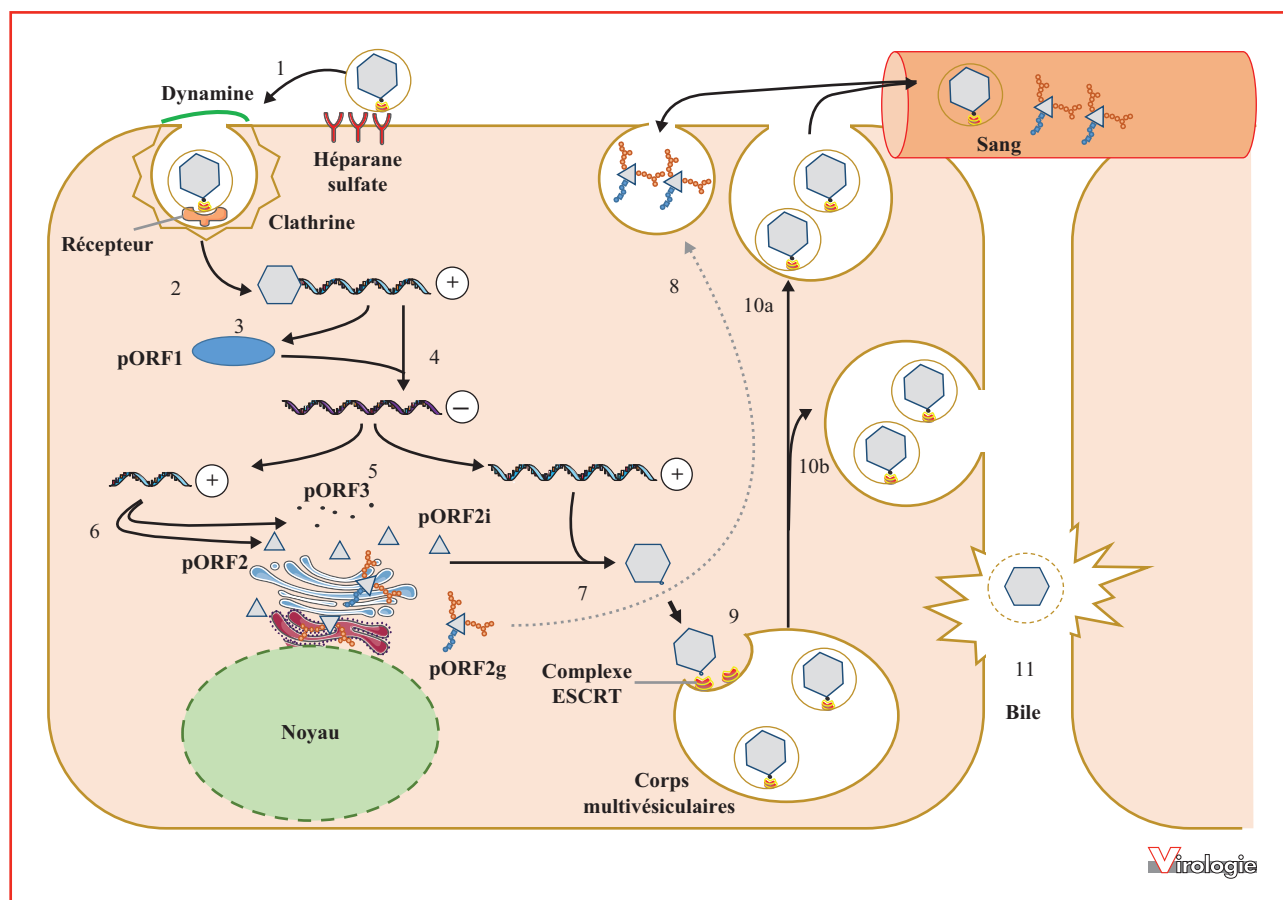
tractus intestinal avant d'atteindre le foie par voie hémato-gène.

L'interaction du virus avec des protéoglycanes à héparane sulfate présents à la surface des cellules cibles constituent l'étape initiale du mécanisme de l'entrée virale. Aucun récepteur d'entrée de haute affinité n'a été identifié à ce jour. L'entrée dans la cellule s'effectue par une cascade d'événements incluant une endocytose dépendante de la clathrine, qui implique la dynamine-2, le cholestérol membranaire et un remodelage du cytosquelette (*figure 5*, étape 1). L'entrée de la forme quasi enveloppée du VHE nécessite l'acidification des endoso-lysosomes permettant la dégradation des lipides. S'ensuit le processus de décapsidation (étape 2). Le VHE se réplique ensuite dans le cytoplasme. Le brin d'ARN positif est traduit à partir de sa coiffe en polyprotéine non structurale ORF1 (étape 3). La polymérase virale synthétise un brin d'ARN négatif (étape 4) qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique et sous-génomique (étape 5) permettant la traduction des protéines ORF2 et ORF3 (étape 6). La protéine de capsid non glycosylée est impliquée dans l'encapsidation de l'ARN génomique (étape 7). Une autre forme est glycosylée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et sécrétée sous forme libre non infectieuse (étape 8). La libération du VHE hors de la cellule détourne la voie d'exocytose par l'interaction d'ORF3 avec Tsg101. Cette interaction conduit au bourgeonnement des nouvelles particules virales dans les corps multivésiculaires (étape 9). Ces particules sont ensuite libérées dans le sang (étape 10a) ou la bile (étape 10b) sous une forme associée à des lipides. La propriété détergente des sels biliaires combinée à l'action des enzymes digestives conduit à l'excrétion d'un virus nu dans les selles des patients infectés (étape 11).

Interférence avec la réponse immunitaire innée

Les infections virales conduisent habituellement à la synthèse et à la sécrétion des IFN de type I et III. La synthèse de ces IFN est consécutive à la reconnaissance des ARN viraux par des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques regroupés sous le nom de *pattern recognition receptors* (PRR). L'activation de ces récepteurs déclenche une cascade de signalisation entraînant l'activation de molécules-clés telles que *TANK binding kinase 1* (TBK-1) ou *interferon regulatory protein 3* (IRF3), facteurs de transcription impliqués dans la production d'IFN.

Les IFN sécrétés conduisent à la transcription des gènes stimulés par l'IFN (*interferon stimulated genes* [ISG]) dans les cellules environnantes après transduction du signal par le système JAK/STAT. L'ISG15 est fortement induit par les IFN de type I. La fixation covalente d'ISG15 à des pro-



Virologie

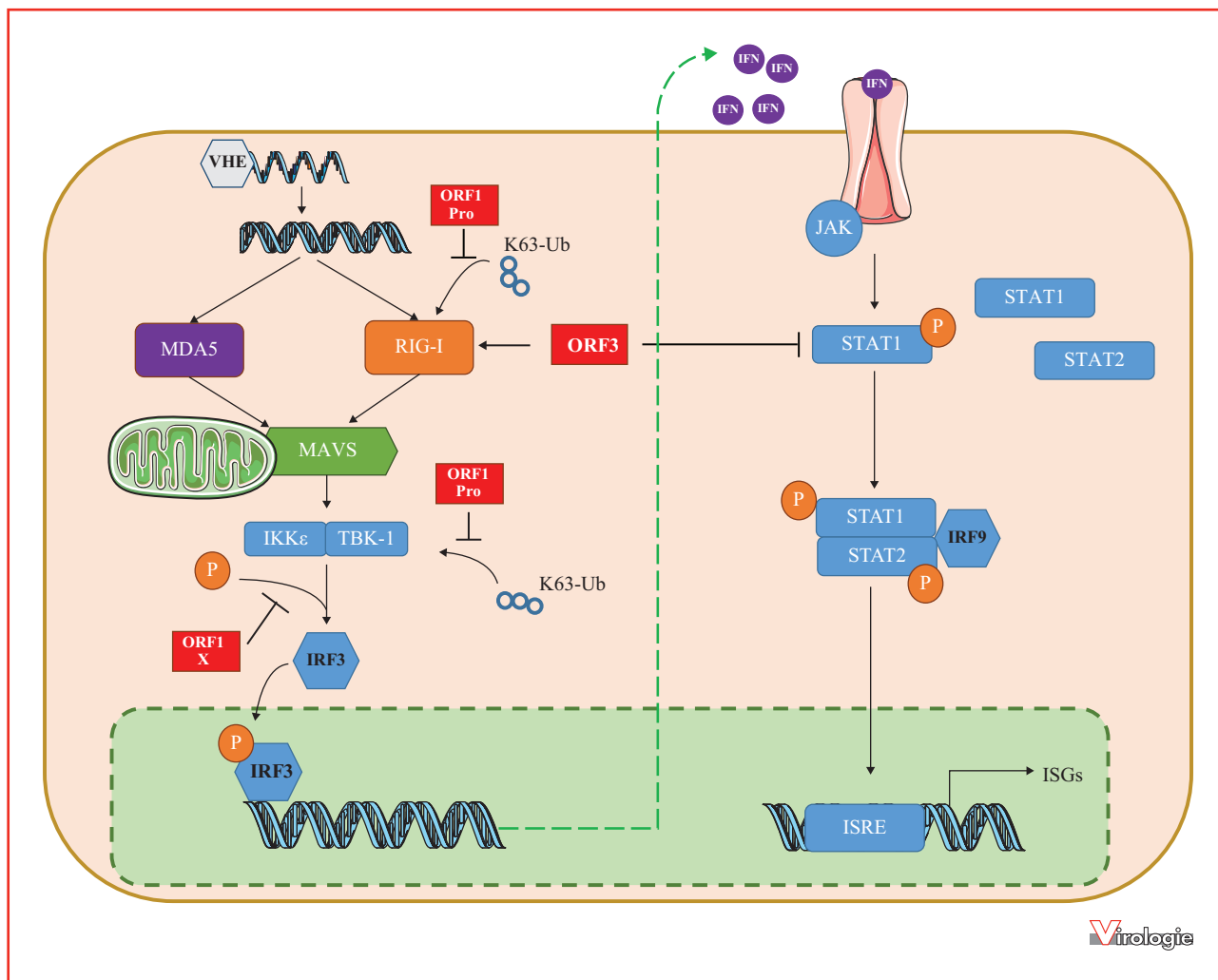
Figure 5. Cycle de réplication du virus de l'hépatite E (VHE). ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport* ; ORF2g : forme libre glycosylée d'ORF2 ; ORF2i : forme infectieuse non glycosylée d'ORF2 s'assemblant pour former la capside.

téines cibles est appelée ISGylation. Les conséquences de l'ISGylation sont partiellement connues. Une étude a montré que l'ISG15 entrerait en compétition avec l'ubiquitine pour les sites d'ubiquitination sur une protéine. Ce mécanisme régulerait de façon indirecte la dégradation des protéines cibles. Le rôle de ISG15 au cours de l'infection par le VHE reste à déterminer. ISG15 semble diminuer les effets antiviraux médiés par les IFN de type I, se traduisant en particulier par une faible augmentation des niveaux d'expression des autres ISG lors de l'infection par le VHE [40]. ISG15 pourrait donc jouer un rôle immunomodulateur plutôt qu'un rôle antiviral au cours de l'infection par le VHE.

Nan *et al.* ont montré que la polyprotéine codée par ORF1 limitait la production de l'IFN- β par l'intermédiaire du domaine X et de la protéase [41] (figure 6). La protéase inhiberait l'ubiquitination du *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) et de TBK-1 tandis que le domaine X inhiberait la phosphorylation d'IRF3. La même équipe a montré que la protéine codée par ORF3 semble augmenter la produc-

tion des IFN de type I en interagissant avec RIG-I dont il augmente la demi-vie [42]. Un autre groupe a montré que ORF3 pourrait limiter la phosphorylation de STAT1, limitant ainsi la transcription des ISG dans un modèle utilisant les cellules épithéliales respiratoires humaines A549 [43]. Ainsi, ORF3 stimulerait la production des IFN de type I *via* RIG-I mais interférerait avec la voie de signalisation des IFN, bloquant ainsi la production des protéines antivirales (figure 6).

Des travaux récents utilisant un système de surexpression de RIG-I ont montré que les effets antiviraux de son activation ne s'exerçaient pas exclusivement par l'intermédiaire de la synthèse des IFN [44]. Les voies de signalisation à l'origine de cette réponse antivirale indépendante des IFN restent à élucider. Inversement, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, la synthèse des IFN est indépendante des principaux *RIG-I like receptors*, *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) et *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS), mais dépendante d'IRF3/7 [45]. Cependant, ces résultats restent



Virologie

Figure 6. Interférence du virus de l'hépatite E (VHE) avec la réponse antivirale innée de l'hôte. L'ARN double brin, intermédiaire de réplication du VHE, est principalement reconnu par RIG-I. La protéase (Pro) dé-ubiquitine RIG-I et TBK-1, limitant leur activation. ORF3 semble avoir un effet contraire puisque son interaction avec RIG-I stimule la production d'interférons (IFN) *in vitro*. Le domaine X inhibe la phosphorylation d'IRF3. L'inhibition n'est pas totale et des IFN (essentiellement de type III) sont produits. Les IFN sécrétés se fixent à leurs récepteurs à la surface des cellules infectées et induisent l'expression des *interferon stimulated genes* (ISG) via la voie JAK/STAT de façon autocrine et paracrine. Cependant, l'interaction d'ORF3 avec STAT1 semble limiter sa phosphorylation ainsi que la voie de signalisation, limitant l'expression des ISG. Figurent en rouge les protéines virales identifiées comme interférant avec la mise en place de la réponse immunitaire innée. IKK ϵ : *I κ B-kinase-epsilon* ; IRF3 : *interferon regulatory protein 3* ; IRF9 : *interferon regulatory protein 9* ; ISG : *interferon stimulated genes* ; ISRE : *interferon stimulated response element* ; K63-Ub : ubiquitination de la lysine en position 63 de RIG-I ou TBK-1 ; MAVS : *mitochondrial antiviral-signaling protein* ; MDA5 : *melanoma differentiation-associated protein 5* ; TBK-1 : *TANK binding kinase 1* ; P : phosphorylation ; Pro : protéase ; RIG-I : *retinoic acid-inducible gene 1* ; X : domaine X.

à confirmer dans des modèles plus proches de l'infection naturelle.

Des travaux réalisés sur la lignée HepG2C3A issue d'un hépatocarcinome et sur des hépatocytes primaires ont montré que le VHE3 était capable de se multiplier malgré la production continue d'IFN de type III lors de l'infection [46]. La phosphorylation persistante de STAT1 conduit à l'activation permanente de la voie JAK/STAT, rendant les cellules réfractaires aux effets des IFN. Dans ce modèle,

la production d'IFN était dépendante de MAVS, MDA5 et également de RIG-I. La déplétion de MAVS, MDA5 ou de RIG-I à l'aide de shRNA, diminuait la production d'IFN et s'accompagnait d'une augmentation de la réplication du VHE. Contrairement aux virus de l'hépatite A et de l'hépatite C, le VHE n'est pas capable de cliver MAVS. Enfin, le VHE ne semble pas non plus interférer avec la signalisation de la voie JAK/STAT conduisant à l'expression des ISG. Ainsi, la capacité du VHE3 à se mul-

tiplier dans les cellules infectées malgré la réponse IFN pourrait expliquer la persistance du VHE chez les patients immunodéprimés qui ne présentent pas une réponse immunitaire T optimale du fait du traitement immunosuppresseur.

Modèles animaux

Les modèles animaux les plus fréquemment utilisés pour étudier la pathogenèse ou réaliser des études de vaccination sont les chimpanzés, les macaques *rhesus* et *cynomolgus*. Ils présentent l'avantage de pouvoir être infectés par les principaux génotypes du VHE. L'analyse du transcriptome hépatique de chimpanzés infectés par le VHE1 a montré une forte induction de gènes impliqués dans la réponse antivirale, en particulier les gènes induits par l'IFN [47]. De plus, l'infection par le VHE1 déclenche une réponse immunitaire de plus faible intensité et plus brève comparativement à celle induite par le VHC mais suffisante pour l'élimination du virus. La réponse immunitaire innée semble donc importante pour le contrôle de l'infection par le VHE1. Une étude comparative de l'infection par le VHE1 et le VHE3 a été réalisée chez le macaque *rhesus* [48]. À la phase précoce de l'infection, les gènes en lien avec la réponse immune hépatique (*interferon responsive gene*) étaient réprimés au cours de l'infection par le VHE1 alors qu'ils étaient stimulés au cours de l'infection par le VHE3. Ces résultats suggèrent que la réponse de l'hôte est dépendante du génotype du virus responsable de l'infection.

Des animaux infectables par les génotypes autres que le VHE1 et le VHE2 (strictement humains), comme le porc, le lapin, la gerbille, le rat ou le poulet, ont permis d'étudier certains aspects de l'infection. Par exemple, le porc et le lapin ont été utilisés pour démontrer l'existence de sites de réplication extrahépatiques. En 2017, l'infection chronique par un virus de génotype 3 a pu être établie chez des porcs recevant un traitement immunosuppresseur [49]. Ainsi, ce modèle développé récemment devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de persistance du VHE3. Plus récemment, des modèles de souris humanisées susceptibles à des infections par différents génotypes du VHE ont été mis au point [50-52]. Ce modèle permet la réplication des VHE1 et VHE3.

Systèmes de culture cellulaire *in vitro*

Le VHE est un virus difficile à cultiver et la production virale n'entraîne pas d'effet cytopathique. La première culture *in vitro* a été réalisée à partir d'un prélèvement de selles, de titre viral très élevé, sur la lignée cellulaire PLC/PRF/5 dérivant de cellules d'hépatocarcinome et sur la lignée A549 dérivant de cellules de cancer du

poumon. Plus récemment, la souche Kernow-C1, qui correspond à une souche de génotype 3 isolée de selles d'un patient chroniquement infecté par le VHE, a été adaptée sur la lignée cellulaire HepG2/C3A dérivant de cellules d'hépatocarcinome [33]. Les passages successifs ont permis la sélection d'un virus recombinant ayant intégré dans la PPR un fragment de gène humain codant la protéine ribosomale S17.

La culture du VHE a également pu être réalisée sur des lignées cellulaires dérivant de cellules humaines d'hépatocarcinome (HepaRG) ainsi que sur la lignée cellulaire embryonnaire de porc PCM-19. Ces deux lignées, capables d'exprimer les gènes d'hépatocytes primaires humains ou porcins, pourraient permettre une meilleure approche du cycle de multiplication du VHE.

Cependant, des facteurs cellulaires influençant l'infection ou la réplication virale peuvent manquer du fait de l'origine tumorale de ces lignées cellulaires (prolifération, métabolisme, immunité innée. . .). Ainsi, les hépatocytes primaires humains issus de foie d'adultes ou de fœtus représentent un système de culture cellulaire plus physiologique [46]. Cependant, la variabilité génétique des hépatocytes entre les différents donneurs, les possibilités limitées de modifications génétiques ainsi que la difficulté d'entretenir ces cellules primaires *in vitro* rendent difficile l'utilisation de ce modèle.

Les cellules souches embryonnaires (ESC) ou les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) différenciées en hépatocytes avec des protocoles standardisés représentent un modèle prometteur. La culture des virus de génotypes 1 à 4 à partir d'échantillons cliniques primaires non adaptés *in vitro* a pu ainsi être réalisée [53]. Il est intéressant de noter que la capacité répliquative de la souche Kernow-C1-P6 adaptée en culture après plusieurs passages était inférieure à celle de la souche primaire. De plus, l'effet proviral des inhibiteurs de calcineurine (tacrolimus et ciclosporine) et des inhibiteurs de mTOR (rapamycine et évérolimus) initialement décrit sur la lignée d'hépatocarcinome HuH7 n'a pas été observé [54, 55].

Enfin, le VHE est capable de se répliquer sur des lignées cellulaires non hépatocytaires comme la lignée cellulaire d'adénocarcinome colique Caco-2, la lignée oligodendrocytaire M03.13 ou la lignée cellulaire placentaire JEG-3 isolée de choriocarcinome humain. Ce tropisme élargi pourrait expliquer la diversité des manifestations cliniques observées lors de l'infection par le VHE.

Conclusion

Le VHE constitue un problème majeur de santé publique dans les pays en développement où il est responsable de grandes épidémies et d'une mortalité maternelle et infan-

tile élevée en cas d'infection chez les femmes enceintes. Dans les pays industrialisés, la transmission zoonotique, le risque transfusionnel, la persistance chez l'immunodéprimé et les formes sévères en cas de maladies chroniques du foie sont également à l'origine de problèmes sanitaires importants. L'utilisation de nouveaux systèmes de culture cellulaire et le développement de nouveaux modèles animaux ont permis de mieux comprendre le cycle infectieux du VHE et sa pathogénèse. Les travaux les plus récents ont mis en évidence l'importance de la réponse immunitaire innée pour l'élimination du virus. La possibilité de réplication du VHE3 malgré la réponse antivirale pourrait en partie expliquer le développement des formes chroniques chez les patients immunodéprimés. De futures recherches, telles que la caractérisation du récepteur cellulaire de haute affinité utilisé par le virus ou la modulation de la réponse immunitaire innée, devraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques chez les patients pour lesquels la ribavirine n'est pas efficace.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, John R, *et al.* Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol* 2016 ; 97 : 537-42.
- Nicot F, Jeanne N, Roulet A, Lefebvre C, Carcenac R, Manno M, *et al.* Diversity of hepatitis E virus genotype 3. *Rev Med Virol* 2018 ; 28 : e1987.
- Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, *et al.* A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* 2016 ; 63 : 1145-54.
- Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, *et al.* Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet* 2014 ; 384 : 1766-73.
- Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995 ; 345 : 1025-6.
- Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, *et al.* Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2017 ; 3 : 17086.
- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, *et al.* Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 811-7.
- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, *et al.* Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 2011 ; 140 : 1481-9.
- Tavittian S, Peron JM, Huynh A, Mansuy JM, Ysebaert L, Huguier F, *et al.* Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol* 2010 ; 49 : 141-4.
- Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 1025-7.
- Lhomme S, Garrouste C, Kamar N, Saune K, Abravanel F, Mansuy JM, *et al.* Influence of polyproline region and macro domain genetic heterogeneity on HEV persistence in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 2014 ; 209 : 300-3.
- Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, Kamar N, *et al.* Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol* 2012 ; 86 : 10006-14.
- Gerolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 859-60.
- Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, *et al.* Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant* 2008 ; 8 : 1744-8.
- Dalton HR, Kamar N, van Eijk JJ, McLean BN, Cintas P, Bendall RP, *et al.* Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol* 2016 ; 12 : 77-85.
- Dalton HR, van Eijk JJJ, Cintas P, Madden RG, Jones C, Webb GW, *et al.* Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: A prospective multicentre study. *J Hepatol* 2017 ; 67 : 925-32.
- Abravanel F, Pique J, Couturier E, Nicot F, Dimeglio C, Lhomme S, *et al.* Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *J Infect* 2018 ; 77 : 220-6.
- Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, *et al.* Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant* 2010 ; 10 : 1321-4.
- Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, *et al.* Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation* 2012 ; 93 : 617-23.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol* 2018 ; 68 : 1256-71.
- Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L, *et al.* Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 2010 ; 89 : 353-60.
- Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, *et al.* Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2010 ; 50 : e30-3.
- Kamar N, Izopet J, Tripson S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, *et al.* Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 2014 ; 370 : 1111-20.
- Dao Thi VL, Debing Y, Wu X, Rice CM, Neyts J, Moradpour D, *et al.* Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 82-85 e4.
- Zhang J, Shih JW, Xia NS. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2015 ; 372 : 2265-6.
- Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai S, *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 1112-25.
- Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005521.
- Kenney SP, Meng XJ. Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018 ; pii: a031724. doi: 10.1101/cshperspect.a031724. [EAP].
- Perttola J, Spuul P, Ahola T. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J Gen Virol* 2013 ; 94 : 807-16.
- Li C, Debing Y, Jankevicius G, Neyts J, Ahel I, Coutard B, *et al.* Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation. *J Virol* 2016 ; 90 : 8478-86.
- Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLoS One* 2012 ; 7 : e35974.

32. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Mansuy JM, Rostaing L, *et al.* Characterization of the polyproline region of the hepatitis E virus in immunocompromised patients. *J Virol* 2014 ; 88 : 12017-25.
33. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, *et al.* Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 2438-43.
34. Nguyen HT, Torian U, Faulk K, Mather K, Engle RE, Thompson E, *et al.* A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J Gen Virol* 2012 ; 93 : 526-30.
35. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, *et al.* Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 12986-91.
36. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, *et al.* Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018 ; 115 : 4773-8.
37. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier JC, Saliou JM, Ankavay M, *et al.* Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* 2018 ; 154 : 211-23 e8.
38. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, *et al.* Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 2011 ; 92 : 2838-48.
39. Ding Q, Heller B, Capuccino JM, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, *et al.* Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : 1147-52.
40. Sooryanarain H, Rogers AJ, Cao D, Haac MER, Karpe YA, Meng XJ. ISG15 Modulates Type I Interferon Signaling and the Antiviral Response during Hepatitis E Virus Replication. *J Virol* 2017 ; 91.
41. Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khattar SK, Fredericksen B, Zhang YJ. Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J Virol* 2014 ; 88 : 11924-32.
42. Nan Y, Ma Z, Wang R, Yu Y, Kannan H, Fredericksen B, *et al.* Enhancement of interferon induction by ORF3 product of hepatitis E virus. *J Virol* 2014 ; 88 : 8696-705.
43. Dong C, Zafrullah M, Mixson-Hayden T, Dai X, Liang J, Meng J, *et al.* Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* 2012 ; 55 : 1324-32.
44. Xu L, Wang W, Li Y, Zhou X, Yin Y, Wang Y, *et al.* RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology* 2017 ; 65 : 1823-39.
45. Wang W, Wang Y, Qu C, Wang S, Zhou J, Cao W, *et al.* The RNA genome of hepatitis E virus robustly triggers an antiviral interferon response. *Hepatology* 2018 ; 67 : 2096-112.
46. Yin X, Li X, Ambardekar C, Hu Z, Lhomme S, Feng Z. Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006417.
47. Yu C, Boon D, McDonald SL, Myers TG, Tomioka K, Nguyen H, *et al.* Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol* 2010 ; 84 : 11264-78.
48. Choi YH, Zhang X, Tran C, Skinner B. Expression profiles of host immune response-related genes against HEV genotype 3 and genotype 1 infections in rhesus macaques. *J Viral Hepat* 2018 ; 25 : 986-95.
49. Cao D, Cao QM, Subramaniam S, Yugo DM, Heffron CL, Rogers AJ, *et al.* Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : 6914-23.
50. Allweiss L, Gass S, Giersch K, Groth A, Kah J, Volz T, *et al.* Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J Hepatol* 2016 ; 64 : 1033-40.
51. van de Garde MD, Pas SD, van der Net G, de Man RA, Osterhaus AD, Haagmans BL, *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. *J Virol* 2016 ; 90 : 4394-401.
52. Sayed IM, Verhoye L, Cocquerel L, Abravanel F, Foquet L, Montpellier C, *et al.* Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* 2017 ; 66 : 920-9.
53. Wu X, Dao Thi VL, Liu P, Takacs CN, Xiang K, Andrus L, *et al.* Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication in Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. *Gastroenterology* 2018 ; 154 : 663-74 e7.
54. Zhou X, Wang Y, Metselaar HJ, Janssen HL, Peppelenbosch MP, Pan Q. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *J Hepatol* 2014 ; 61 : 746-54.
55. Wang Y, Zhou X, Debing Y, Chen K, Van Der Laan LJ, Neyts J, *et al.* Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology* 2014 ; 146 : 1775-83.