Caractérisation de l'immunité grégaire vis-à-vis du virus de l'hépatite E de la population humaine adulte et détection du virus chez les porcs domestiques en Corse

Lisandru Capai

▶ **To cite this version:**

Lisandru Capai. Caractérisation de l'immunité grégaire vis-à-vis du virus de l'hépatite E de la population humaine adulte et détection du virus chez les porcs domestiques en Corse. Biologie animale. Université Pascal Paoli, 2019. Français. NNT : 2019CORT0009 . tel-03479304

HAL Id: tel-03479304
https://theses.hal.science/tel-03479304

Submitted on 14 Dec 2021

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 DE CORSE-PASCAL PAOLI

ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE

EA 7310 BIOSCOPE MEDITERRANEE

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Mention : Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement par

LISANDRU CAPAI

le 22 novembre 2019

Caractérisation de l'immunité grégaire vis-à-vis du virus de l'hépatite E de la population humaine adulte et détection du virus chez les porcs domestiques en Corse

Directeurs :

Mme Alessandra Falchi, Dr-HDR, Université de Corse Pasquale Paoli

M. Rémi Charrel, Professeur – IRD190 UVE, Université Aix-Marseille

Rapporteurs :

Mme Nicole Pavio, DR-HDR, ANSES

Mme Florence Abravanel, Dr-PH, Laboratoire Virologie CHU de Toulouse

Jury de thèse :

Mme Nicole Pavio, DR-HDR, ANSES

Mme Florence Abravanel, Dr-PH, Laboratoire Virologie CHU de Toulouse

Mme Dominique De Rocca Serra, Dr, Université de Corse Pasquale Paoli

M. Xavier de Lamballerie, Professeur-PH, IRD190 UVE, Université Aix-Marseille

Mme Alessandra Falchi, Dr-HDR, Université de Corse Pasquale Paoli

M. Rémi Charrel, Professeur – IRD190 UVE, Université Aix-Marseille

Membre invité : M. François Casabianca, IR, à l'INRA de Corte

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de prendre sur leur temps pour juger mon travail : Nicole Pavio, Florence Abravanel et Dominique De Rocca Serra. Je remercie particulièrement Nicole Pavio, qui en plus d'être la présidente de mon jury de thèse a également été la présidente de mon comité de suivi individuel tout au long de ma thèse. Merci pour ses conseils et sa disponibilité.

Ensuite, mes remerciements vont à mes deux directeurs de thèse, Alessandra Falchi et Rémi Charrel. Merci de m'avoir fait confiance pour mener l'ensemble de ces travaux et merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet passionnant. Alessandra, merci de ton soutien, tes conseils, tes encouragements, ta bonne humeur, ta disponibilité au quotidien durant l'ensemble de ma thèse. Un grand merci également à toi Rémi qui malgré la distance (Marseille et Floride) et le décalage horaire t'es toujours montré disponible, agréable et à l'écoute.

Merci à Xavier de Lamballerie de m'avoir permis de travailler dans son équipe durant nos collaborations, merci pour ses conseils et son expertise qui m'ont beaucoup aidé durant nos différents travaux. Je remercie également l'ensemble de l'équipe de l'Unité des Virus Emergents pour leur accueil et leur sympathie à mon égard durant mes différents passages à l'Université d'Aix Marseille.

Je souhaite également remercier Pierre Gallian de m'avoir permis de travailler avec l'EFS pour l'ensemble de nos études de séroprévalences en population humaine. Merci de votre gentillesse, de votre disponibilité et de vos conseils.

Je remercie François Casabianca, qui a permis la collaboration entre l'INRA et notre équipe et qui m'a beaucoup aidé durant notre étude sur les porcs corses. Merci également pour ses conseils, son expertise et sa gentillesse.

Un grand merci à toi Oscar Maestrini, sans qui je n'aurais pas pu réaliser mes sorties terrain dans les élevages. Merci pour tes conseils techniques, ta bonne humeur, et de m'avoir fait partager tes connaissances sur les pratiques locales à propos de l'élevage en Corse.

Merci à Thierry Blanchon et l'ensemble de l'équipe du réseau Sentinelles pour leur aide et leurs conseils au cours de mes travaux.

Merci aux deux directeurs de l'Ecole doctorale, Jean Costa et Alain Muselli, qui successivement ont toujours été à l'écoute et disponible lors de nos échanges afin de gérer au mieux la thèse, les formations doctorales et autres formalités administratives.

Merci à David Moungar et à Anna Savossiouk de l'école doctorale pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide durant l'ensemble de mon contrat doctoral.

Merci à Frédéric Bosseur, pour sa disponibilité et son aide précieuse pour les différentes cartographies réalisées durant les différentes études.

Je continue mes remerciements avec mes collègues de l'EA7310 et amis, Jirley, Laeti, Laura, Vincentu, Natacha et Radia (pas EA7310 mais bon on s'est compris). Merci pour votre aide, votre soutien, votre bonne humeur au quotidien qui m'ont permis de toujours pouvoir travailler dans une bonne ambiance et m'ont beaucoup aidé durant l'ensemble de ma thèse. Merci également pour tous nos bons moments, les trails, les sorties, les soirées… Merci également à l'ensemble des stagiaires passés par notre équipe ces dernières années pour leur aide au laboratoire et leur implication.

Merci à mes amis et collègues de l'Université de Corse, Sophie et Sébastien pour m'avoir conseillé et soutenu durant la thèse. Merci pour votre aide, votre expérience en tant qu'ancien doctorant et jeune docteur ainsi que pour tous nos bons moments. Je tenais également à remercier tous mes collègues doctorants ou jeunes docteurs, Cécile, Jean-Pierre, Julie, Sophie D et tous les autres, avec qui nous avons partagé les formations doctorales et passé de très bons moments.

Merci à mes amis, Fred, Ro, Karim, Jonh, Jo et toute la Damanta Zquadra, pour tous nos bons moments, nos délires et nos discussions qui m'ont permis de m'évader de mon travail de thèse.

Tenia à ringrazià à Paulu Felice Nasica pè u so aiutu pè fà a traduzzione di u riassuntu vulgarizatu di a me tesa in corsu. Un ringraziu tamantu pè à so bravezza è à so dispunibilità.

Merci à ma famille, ma mère, mon père, mes frères et sœurs, ma belle-mère, ma tante, mes grands-parents et tous les autres pour leur soutien, leur intérêt et leur gentillesse qui m'ont permis d'être dans les meilleurs conditions chaque week-end et qui m'ont toujours soutenu et encouragé. Merci à ma copine, pour son soutien au quotidien, ses encouragements, sa bonne humeur, son oreille attentive et tous nos bons moments qui m'ont permis de pouvoir décompresser et de gérer le mieux possible mon travail de thèse.

Enfin, pour n'oublier personne, je remercie l'ensemble de nos partenaires, des personnes ayant participé de près ou de loin à mes travaux de thèse, aux formations doctorales et à mes enseignements à l'Université de Corse.

Je remercie l'Université de Corse, la Collectivité de Corse et l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale qui ont cofinancé mon projet de thèse.

Merci également à l'ensemble de nos partenaires : l'Université d'Aix Marseille, l'Institut National de Recherche Agronomique, l'Etablissement Français du Sang, l'Agence Régionale de la Santé, le Réseau Sentinelles, l'Observatoire Régional de la Santé, et la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire Du Bétail de Corse.

Table des matières

Remerciements *3*

Introduction *15*

1. Le virus de l'hépatite E **18**

Découverte et histoire 18

Structure et caractéristiques physicochimiques 19

Génome 20

Taxonomie 23

Cycle de réplication putatif du HEV 25

Clinique 30

Marqueurs d'infection et diagnostic 34

Traitement, vaccination et prévention 37

2. Epidémiologie du virus de l'hépatite E de la population humaine et voies de transmission dans les pays industrialisés **40**

Séroprévalence des IgG anti-HEV chez les donneurs de sang et dans la population générale 40

Populations exposées au HEV 44

Les enfants 46

Cas groupés et épidémies 46

Transmission zoonotique 50

Transmission liée à l'eau 51

Transmission liée au risque transfusionnel 53

Transmission sexuelle 55

Autres voies de transmission 55

3. Epidémiologie de la population animale **58**

Le réservoir des suidés 58

Un spectre d'espèces animales infectées très large 67

4. Une situation spécifique en Corse **74**

La Corse 74

Un type d'élevage traditionnel porcin particulier 77

Le marché de la charcuterie et la problématique des matières importées 79

Race Nustrale et appellations d'origine 80

Des pratiques locales à risque 81

Autres voies de contamination possibles 82

Ruralité et qualité de l'eau 83

Hypothèses et objectifs *84*

Méthodologie générale des études *86*

Chapitre 1 : Quantification des IgG anti-HEV chez les donneurs de sang en Corse et modélisation du taux annuel d'infection *93*

Résumé et résultats majeurs de l'article : Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017. 94

Article 96

Chapitre 2 : Caractérisation de l'immunité grégaire vis-à-vis de l'hépatite E de la population adulte corse et détermination des facteurs associés *125*

Résumé et résultats majeurs de l'article : Seroprevalence study of anti-HEV IgG detection among different adult populations in Corsica, France, 2019. 126

Article 128

Chapitre 3 : Etude de prévalence de l'infection au HEV des porcs domestiques corses et identification des souches circulantes *148*

Article : Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France. 149

Article 151

Travaux complémentaires réalisés sur les fèces de porcs domestiques corses *163*

Essais de culture cellulaire du HEV et première identification et caractérisation d'un Sapelovirus porcin en Corse, France, 2017. 164

Autres virus retrouvés dans les fèces de porcs 169

Discussion générale, conclusion et perspectives *175*

Références bibliographiques *193*

Annexes *222*

Abstract *274*

Résumé *275*

Liste des figures

Figure 1 Schéma des deux types de virions HEV (Himmelsbach et al., 2018) 19
Figure 2 Organisation génomique du virus du HEV 23
Figure 3 Arbre phylogénétique représentant la famille des Hepeviridae (Doceul et al., 2016) 25
Figure 4 Schéma d'entrée des HEV nus ou quasi enveloppés dans les cellules cibles (Yin et Feng, 2019) 27
Figure 5 Schéma du cycle de réplication putatif du HEV non enveloppé 29
Figure 6 Les différentes formes cliniques de l'hépatite E 33
Figure 7 Evolution de la concentration des différents marqueurs d'infection au cours du temps (Lhomme et al., 2016) 35
Figure 8 Arbre décisionnel pour le diagnostic (Kamar et al., 2014a) 36
Figure 9 Résultats de la méta-analyse des études de séroprévalences dans les pays industrialisés réalisées avec le kit Wantai. 42
Figure 10 Diagramme récapitulatif des différentes voies de transmissions du HEV dans les pays industrialisés. 57
Figure 11 Schéma représentant le cycle d'infection majoritaire des porcs au sein des élevages 61
Figure 12 Evolution de la prévalence ARN HEV dans les fèces (ratio de positifs) en fonction de l'âge des porcs (en semaine) (Salines et al., 2017). 61
Figure 13 Schéma des voies de transmissions entre suidés, cervidés et l'Homme (Pavio et al., 2017) 66
Figure 14 Localisation de la Corse, île de la Méditerranée (vue satellite) (GoogleMap, 2019) et carte avec altitude (DRAAF., 2017) 75
Figure 15 Carte de séroprévalence IgG et IgM anti-HEV (Mansuy et al., 2016) 76
Figure 16 Porc Nustrale (DRAAF., 2017) 80
Figure 17 Produits charcutiers bénéficiant de l'Appellation d'Origine Contrôlée (Salameria Corsa., 2018) 81
Figure 18 Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour les différentes études 91
Figure 19 Récapitulatif des résultats préliminaires obtenus pour les Kobuvirus, les Astrovirus 1 et les Sapelovirus 174

Liste des tableaux

Tableau 1 Séroprévalences IgG anti-HEV observées lorsque la même population est testée à l'aide de tests différents 41
Tableau 2 Etudes de séroprévalences IgG anti-HEV réalisées avec le kit Wantai dans les pays industrialisés 43
Tableau 3 Séroprévalence IgG anti-HEV au sein de différentes populations exposées 45
Tableau 4 Séroprévalences IgG anti-HEV déterminés chez les enfants 46
Tableau 5 Liste des épidémies HEV rapportées ces dernières années dans les pays industrialisés 48
Tableau 6 Tableau récapitulatif des taux de positivité ARN des produits sanguins dans les pays industrialisés 54
Tableau 7 Prévalence de l'ARN HEV au sein du réservoir porcin dans les pays industrialisés 62
Tableau 8 Séroprévalence à l'échelle de l'animal des IgG anti-HEV chez les porcs et sangliers sauvages 64
Tableau 9 Marqueurs d'infection au HEV au sein d'autres espèces animales 73
Tableau 10 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude SERO-QUANTI 95
Tableau 11 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude SEROMED 127
Tableau 12 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude de la filière porcine corse 150
Tableau 13 Détail des amorces utilisées pour Kobuvirus et Astrovirus 1 171
Tableau 14 Récapitulatif du nombre d'échantillons en fonction des co-infections détectées 172
Tableau 15 Récapitulatif des différentes études de séroprévalences menées en Corse 177

Liste des Annexes

Annexe 1 Revue 1 : Virus de l'hépatite E et voies de transmissions dans les pays industrialisés 223
Annexe 2 Revue 2 : Epidémiologie du virus de l'hépatite E de la population humaine dans les pays industrialisés et méta analyse 247
Annexe 3 Lettre information SEROMED (exemple donneurs de sang) 264
Annexe 4 Consentement et questionnaire SEROMED (donneurs de sang) 266
Annexe 5 Mode opératoire ponction au bout du doigt médecine générale et université 272
Annexe 6 Fiche de collecte étude porcins 273

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMU : Aix-Marseille Université

ALT : Alanine aminotransférase

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AOP : Appellation d'Origine Protégée

AOR : Odds Ratio Ajusté

AREP : Association régionale des éleveurs porcins

ARGRPC : Association régionale de gestion de la race de porc corse

ARN : Acide ribonucléique

ARS : Agence Régionale de la Santé

ASGPR : Asialoglycoproteine receptor

AST : Aspartate aminotransférase

ATP5B : ATP synthase Subunit 5 beta

CNAG : Commission Nationale d'Amélioration Génétique

CNR : Centre National de Référence

EASL : Association Européenne pour l'étude du foie (European Association for the Study of the Liver)

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GFP78 : Protéine Glucose Related 78

HEV : Virus de l'hépatite E ou Hepatitis E Virus

HSPG : Protéoglycanes à Héparane Sulfate

HSC70 : Heat Shock Cognate 70

ICTV : Comité International sur la Taxonomie des Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses)

IF : Impact Factor ou facteur d'impact

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IRES : Internal Ribosome Entry Site ou site d'entrée interne des ribosomes

IGP : Indication Géographique Protégée

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

INSEE : Institut National de la Statistiques et des Etudes Economiques

ITGA3 : Intégrine Alpha 3

OMS : Organisation Mondiale de la Santé ou WHO : World Health Organization

OR : Odds Ratio

ORF : Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture

Nt : Nucléotides

PACA : Provence Alpes Côte d'Azur

Pb : Paire de bases ou Bp : base pair

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne ou Polymerase Chain Reaction

PNH : Primate non humain

RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse ou reverse transcription polymerase chain reaction

SDRP : Syndrome dysgénésique et respiratoire porcin, ou PRRSV : Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

UCPP : Université de Corse Pasquale Paoli

Liste des publications scientifiques

- **Revue publiée en Mai 2018 dans Viruses (IF : 3,811) en premier auteur :** Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps? Auteurs : Lisandru Capai, Rémi Charrel, Alessandra Falchi.
- **Revue publiée en Janvier 2019 dans le journal Viruses (IF: 3,811) en premier auteur:** Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Revue of Literature. Auteurs : Lisandru Capai, Alessandra Falchi et Rémi Charrel.
- **Article accepté le 4 Novembre 2019, en attente d'édition, dans le journal Eurosurveillance (IF = 7,4) en premier auteur :** Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017. Auteurs : Lisandru CAPAI, Nathanaël Hozé, Jacques Chiaroni, Sylvie Gross, Rachid Djoudi, Rémi Charrel, Jacques Izopet, Fréderic Bosseur, Stéphane Priet, Simon Cauchemez, Xavier De Lamballerie, Alessandra Falchi, Pierre Gallian.
- **Article publié le 16 octobre 2019 dans le journal Microorganisms (IF = 4,167) en premier auteur :** Seroprevalence Study of Anti-HEV IgG among Different Adult Populations in Corsica, France, 2019. Auteurs : Lisandru Capai, Shirley Masse, Pierre Gallian, Cécile Souty, Christine Isnard, Brigitte Peres, Thierry Blanchon, Xavier de Lamballerie, Rémi Charrel, Alessandra Falchi.
- **Article publié en juillet 2019 dans le journal Transboundary and Emerging Diseases (IF :3.504) en premier auteur :** Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France. Lisandru Capai, Oscar Maestrini, François Casabianca, Natacha Villechenaud, Shirley Masse, Frédéric Bosseur, Xavier de Lamballerie, Rémi N. Charrel, Alessandra Falchi.
- **Article publié en Septembre 2018 dans le journal Microbiology Ressource Announcement en co premier auteur :** First Identification and Genomic Characterization of a Porcine Sapelovirus from Corsica, France, 2017. Géraldine Piorkowski*, Lisandru Capai*, Alessandra Falchi, François Casabianca, Oscar Maestrini, Pierre Gallian, Karine Barthélémy, Odile Py, Rémi Charrel, Xavier de Lamballerie.

Introduction

Contexte

Le virus de l'hépatite E (HEV) est une cause majeure d'hépatite virale à travers le monde et est responsable de 20 millions d'infections et de 70 000 décès par an (Debing *et al.*, 2016b).

Deux situations bien distinctes existent au niveau mondial. Premièrement, des épidémies d'hépatites de grandes ampleurs sont causées par le HEV dans les pays en développement. Dans ces zones, la transmission est féco-orale et majoritairement due à la consommation d'eaux insuffisamment ou non traitées. Les génotypes responsables de ces épidémies sont principalement les génotypes 1 et 2 (HEV-1 et HEV-2).

Dans les pays industrialisés comme la France la situation est totalement différente, que ce soit au niveau des génotypes en cause, du nombre de cas ou des voies de transmissions. De plus, une forte augmentation des cas d'hépatite E a été rapportée en Europe ces dernières années (étude entre 2005 et 2015) (Aspinall *et al.*, 2017). Dans ces pays, la voie de transmission majeure est liée au réservoir porcin. Les deux génotypes majoritairement retrouvés sont les génotypes 3 et 4 et la transmission est principalement zoonotique (Dalton *et al.*, 2008a ; Kamar *et al.*, 2012b). Le rôle des suidés dans ces transmissions est maintenant avéré dans la littérature, cependant de nombreuses autres voies de transmissions pourraient avoir un impact dans les pays industrialisés (Purcell et Emerson, 2008). En effet, face à des taux d'exposition de la population de plus en plus élevés dans certaines régions, le rôle unique du réservoir porcin dans les origines d'infection est remis en cause et la compréhension de ces voies de transmissions semble essentielle afin de comprendre l'épidémiologie de l'hépatite E. L'aspect environnemental de ce virus est également de plus en plus reconnu et pourrait expliquer la complexité et la multiplicité des sources d'infection pour l'Homme et les animaux dans les pays industrialisés.

En Corse, des taux très élevés de séroprévalences aux IgG anti-HEV ont été observés dans une étude de séroprévalence en 2016 (environ 60% de positivité) (Mansuy *et al.*, 2016). De plus, le nombre de demande de sérologie HEV et le taux d'hospitalisation sont également très élevés sur l'Île en comparaison avec la moyenne nationale (Couturier *et al.*, 2018). Cette région a une situation assez particulière vis-à-vis du HEV par rapport au reste de la métropole, que ce soit au niveau de l'insularité, culturel (alimentation, pratiques de la chasse), du rapport à la faune, de l'importance des zones rurales et des types d'élevages porcins pratiqués. Ces spécificités font de la Corse une région particulièrement intéressante et complexe à étudier concernant le HEV.

Organisation introduction bibliographique

L'introduction bibliographique de ce manuscrit comporte quatre parties majeures.

Dans un premier temps, les généralités concernant le virus de l'hépatite E sont abordées. Cette première partie bibliographique comprend la présentation du virus, sa découverte, son génome, son cycle de réplication, sa taxonomie, ainsi que les symptômes qu'il peut entraîner lorsqu'il infecte l'Homme. Les traitements ainsi que les vaccins y sont également décrits.

Une seconde partie détaille l'épidémiologie de la population humaine dans les pays industrialisés, en prenant en compte la problématique de l'hétérogénéité des tests ELISA pour la détection des anticorps anti-HEV et le grand nombre d'études publiées afin d'éclaircir la situation épidémiologique vis-à-vis du HEV dans ces pays. Les cas groupés et confirmés, les populations à risque et les études sur les enfants y sont également présentés. Les différentes voies de transmission existantes et suspectées dans les pays industrialisés sont également décrites.

Dans une troisième partie, l'épidémiologie des populations animales avec un zoom particulier sur le réservoir porcin est présentée. L'ensemble des marqueurs d'infection au sein des différentes espèces animales sauvages ou domestiques est également recensé. Un état de la littérature concernant la présence du virus au niveau environnemental, dans la faune sauvage et domestique semble indispensable pour la compréhension et la réflexion à propos des voies de transmissions du HEV.

Enfin, la quatrième partie présente la situation particulière de la Corse. La région, les types d'élevages présents sur l'île et les particularités de la filière porcine y sont notamment décrits. Une vue globale de la situation de la Corse a été nécessaire pour comprendre l'exposition très importante de la population humaine et animale au HEV sur l'île et pour la mise en place de nos différentes études.

Une partie du travail bibliographique réalisé durant la première année de thèse a fait l'objet de deux revues publiées dans le journal « Viruses » en mai 2018 (Annexe 1) et Janvier 2019 (Annexe 2). La première revue fait un état de la littérature du HEV comprenant les généralités du HEV, ainsi que les différentes voies de transmission existantes et suspectées dans les pays industrialisés. La seconde revue était axée sur l'épidémiologie en population humaine dans les pays industrialisés. Une méta-analyse a également été réalisée à partir des études de séroprévalences dans les pays industrialisés avec le test ELISA Wantai IgG anti-HEV.

1. Le virus de l'hépatite E

Découverte et histoire

En 1978, la première épidémie de HEV a eu lieu en Inde, dans la région du Kashmir (Khuroo, 1980). Elle a causé 52 000 cas d'hépatites ictériques et fut à l'origine de 1700 décès. Les cas symptomatiques étaient prédominants chez les jeunes adultes, avec une incidence croissante et une sévérité majeure chez les femmes enceintes. Initialement, cette épidémie a été classée comme étant une épidémie d'hépatite « non-A et non-B » (Khuroo, 2011).

Quelques années plus tard, en 1983, une autre épidémie similaire est intervenue dans un camp militaire soviet en Afghanistan (Balayan *et al.*, 1983). Le Docteur Balayan, ne possédant pas de système de réfrigération sur le camp militaire pour le transport des échantillons jusqu'à Moscou, s'est auto-administré un extrait de fèces de patient malade par voie orale mélangé avec un yaourt. Le Docteur Balayan a présenté les mêmes symptômes que ceux observés sur un autre patient (Balayan *et al.*, 1983). Une fois malade, il récolta ses propres échantillons, puis a infecté des animaux de laboratoire afin de pouvoir observer le virus en microscopie électronique. Le Dr Balayan put ainsi démontrer qu'il s'agissait d'un virus ressemblant au virus de l'hépatite A (Khuroo, 2011).

Les docteurs Purcell et Pavri ont démontré en 1980, à partir d'échantillons provenant de l'épidémie Indienne de 1978, qu'il ne s'agissait pas d'une hépatite A ni d'une hépatite B. Le Docteur Khuroo et son équipe ont également fait la même constatation (Khuroo, 2011).

En 1990, des séquences partielles du virus ont été caractérisées (Reyes *et al.*, 1990), puis s'en est suivi le séquençage du génome complet (Tam *et al.*, 1991 ; Huang *et al.*, 1992). Les séquences isolées provenaient d'Asie et du Mexique, pays où le virus se propage de façon épidémique. Cette hépatite a été nommée Hépatite E, le E faisant référence à « enterically transmitted non-A non-B hepatitis » (Reyes *et al.*, 1990 ; Khuroo, 2011).

Une étude rétrospective de différents rapports décrivant des épidémies de jaunisses avec des taux d'infections plus élevés chez les femmes enceintes a permis d'identifier des épidémies « hepatitis E-like » dans les dernières décennies du 18ème siècle (Teo, 2012).

Structure et caractéristiques physicochimiques

Le HEV est un petit virus à ARN monocaténaire à polarité positive d'une longueur de 7,2 kilo bases (kb) entouré d'une capside icosaédrique (Tam *et al.*, 1991). Le virus a une taille d'environ 27 à 33 nanomètres de diamètre.

Durant de nombreuses années ce virus a été décrit comme une virus non enveloppé (Bradley, 1990 ; Emerson et Purcell, 2003 ; Hoofnagle *et al.*, 2012); cependant, récemment, une autre forme a été identifiée. Le virus peut être « masqué » par la membrane de la cellule hôte et ainsi être résistant aux anticorps lorsque cette forme est présente dans le sang (Takahashi *et al.*, 2010b ; Chapuy-Regaud *et al.*, 2017). En effet, quand les particules virales sont relâchées par la voie exosomale dans le sang, elles apparaissent avec une forme similaire à des virus « quasi-enveloppés ». Cette résistance de la forme quasi enveloppée est due à l'absence d'antigènes viraux à sa surface. Ces différentes formes sont également retrouvées pour le virus de l'hépatite A (Feng *et al.*, 2013). Ci-dessous un schéma (Figure 1) des deux types de virus existants, forme non enveloppée à gauche et forme quasi enveloppée (eHEV) à droite avec la membrane exosomale et la protéine ORF3 englobant le virus (Himmelsbach *et al.*, 2018).

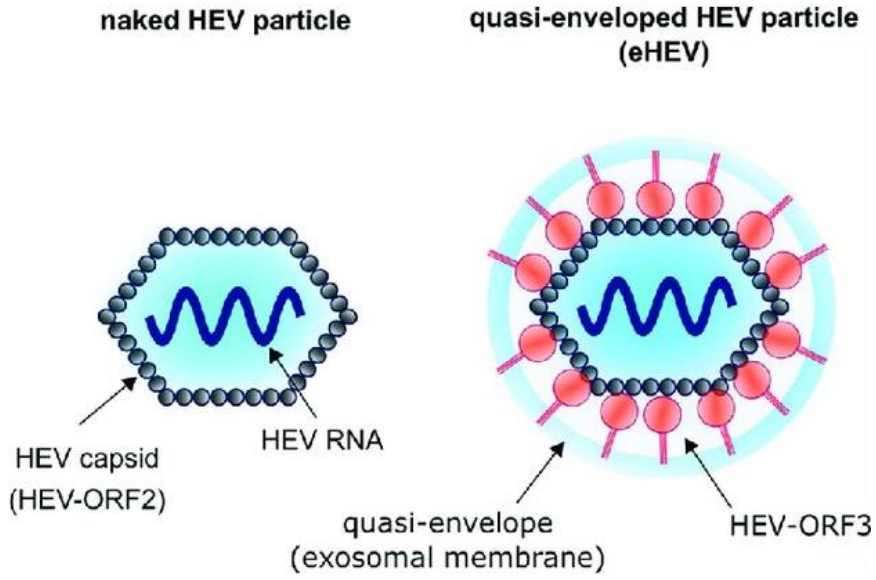


Figure 1 Schéma des deux types de virions HEV (Himmelsbach et al., 2018)

Comme tous les virus entériques non enveloppés, le HEV est relativement résistant dans le milieu extérieur. La transmission majeure du virus étant féco-orale, le HEV a la capacité de résister à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, lui permettant ainsi de survivre dans le milieu intestinal. La température de conservation recommandée pour ce virus, tout comme la majorité des autres virus à ARN est -80°C mais il a pu être détecté par le passé dans des échantillons conservés à -20°C durant plus de 10 ans (Centre National de Référence HEV, 2019). Ce virus

présente une sensibilité *in vitro* à l'autoclavage (120°C) ainsi qu'aux désinfectants fréquemment utilisés pour l'inactivation des virus entériques (hypochlorite de sodium pour le traitement hydrique et glutaraldéhyde pour la désinfection des surfaces). Cependant, l'efficacité des désinfectants baisse de façon significative en présence de matière organique (Ricci *et al.*, 2017). L'impact de la température sur l'inactivation du virus a été rapporté dans la littérature. Une cuisson de 71°C pendant 20 minutes inactive le virus (Emerson *et al.*, 2005b ; Barnaud *et al.*, 2012a). Cependant, le virus peut rester stable après une cuisson à 56°C pendant une heure et reste infectieux au-dessus de 60°c (Emerson *et al.*, 2005b ; Yugo et Meng, 2013). Les virions sont sensibles au stockage à basse température (entre -70°C et + 8°C) et aux désinfectants iodés (Bradley, 1990). Les suspensions hépatiques contenant du HEV aviaire sont restées infectieuses après un traitement au chloroforme et à l'éther, mais ont perdu leur infectiosité après une incubation à 56°C pendant une heure ou à 37°C pendant six heures. L'infectiosité virale dans les suspensions hépatiques a été réduite de 1 000 fois après un traitement avec 0,05% de Tween-20, 0,1% de NP40 et 0,05% de formol (Meng et Halbur, 2006). Les propriétés des membres du genre Piscihepevirus n'ont pas été étudiées.

Génome

Le HEV possède un ARN simple brin à polarité positive d'environ 7,2 kb (Tam *et al.*, 1991). Les extrémités 5' (coiffe) et 3' (queue poly-Adénylée) sont des régions non traduites (UTRs). La coiffe 5' contient une 7-méthyle-guanine. L'ARN génomique contient trois cadres ouverts de lecture (ORFs) : ORF1 , ORF2, et l'ORF3 (Panda *et al.*, 2007 ; Purcell et Emerson, 2008).

L'ORF1 code pour un lot de protéines non structurales (environ 1700 acides aminés) avec huit domaines putatifs : une méthyl-transférase (Met), un domaine Y (Y), une cystéine protéase (PCP), une région hypervariable (HVR), et une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Koonin *et al.*, 1992 ; Debing *et al.*, 2016a). Les enzymes produites à partir de l'ORF1 sont impliquées dans la réplication virale, la transcription et le clivage de la polyprotéine (Reyes *et al.*, 1990 ; Kaur *et al.*, 1992 ; Koonin *et al.*, 1992 ; Holla *et al.*, 2013). Il n'est pas encore bien établi si la polyprotéine est scindée en domaines fonctionnels individuels ou si elle fonctionne comme une protéine unique (Sehgal *et al.*, 2006 ; Suppiah *et al.*, 2011).

L'ORF2 est situé vers la partie 3' et a une taille d'environ 2000 paires de base (pb) et code pour la protéine structurale de la capside. La protéine 2 traduite par l'ORF2 (pORF2) possède trois sites de glycosylation au niveau des acides aminés 137, 310 et 562. Cette protéine

possède également un peptide signal amino-terminal qui entraîne sa translocation dans le réticulum endoplasmique (Zafrullah *et al.*, 1999). L'ORF2 code pour la protéine structurale de la capside icosaédrique (660 acides aminés) (Jameel *et al.*, 1996), dont la séquence est située à l'extrémité 3' du brin d'ARN. Elle est impliquée dans l'assemblage du virus, l'encapsidation, la liaison et la réponse immunitaire de l'hôte au virus (Surjit *et al.*, 2004 ; Debing *et al.*, 2016a). Des études immunologiques de la région de la capside ont contribué à la mise au point d'un vaccin contre le HEV (Xing *et al.*, 2011). Des localisations et des formes différentes de la protéine ORF2 ont été démontrés. La pORF2 en plus de sa forte présence au niveau cytoplasmique dans les cellules infectées, a également été retrouvée dans le noyau (Lenggenhager *et al.*, 2017). Dans les cellules en culture et des échantillons de patients infectés, le HEV a produit trois formes de protéines ORF2 : une pORF2 infectieuse/intracellulaire (ORF2i), une pORF2 glycosylée (ORF2g) et une pORF2 clivée (ORF2c) (Montpellier *et al.*, 2018). La protéine ORF2i est associée aux particules infectieuses, alors que les protéines ORF2g et ORF2c étaient des glycoprotéines sécrétées de manière massive non associées à des particules infectieuses. Dans cette étude les pORF2g et pORF2c étaient les antigènes les plus abondamment détectés. La mutation des sites de N-glycosylation a pu démontrer que la protéine ORF2g/c est N-glycosylée sur les sites N1 et N3 mais pas sur le site N2. La N-glycosylation de la protéine ORF2 ne joue aucun rôle dans la réplication et l'assemblage des particules infectieuses du HEV. Les formes ORF2g/c glycosylées sont des protéines très stables qui sont ciblées par les anticorps et la protéine ORF2i est transférée dans le noyau des cellules infectées (Montpellier *et al.*, 2018).

L'ORF3 se situe entre l'ORF1 et l'ORF2 et chevauche partiellement l'ORF2 (nucléotide 5145–5475) (Debing *et al.*, 2016a). Il code pour une petite phosphoprotéine (VP13) de 113 acides aminés et de 13 kDa (Graff *et al.*, 2006). Le rôle complet de la protéine VP13 n'est pas encore bien déterminé, mais des études ont démontrées que cette protéine avait des fonctions multiples. La protéine VP13 est capable de se lier au cytosquelette de mammifère (microtubules) (Tang *et al.*, 2011). Il est suggéré que la protéine ORF3 joue le rôle d'adaptateur pour lier les voies de transduction intracellulaires, réduire la réponse inflammatoire de l'hôte et protéger les cellules infectées par le virus (Kamar *et al.*, 2014a). La protéine VP13 joue un rôle essentiel dans l'infectivité *in vivo* chez les modèles animaux infectés expérimentalement (Graff *et al.*, 2005 ; Emerson *et al.*, 2006). Cependant, cette protéine ne s'est pas montrée indispensable à la réplication du HEV dans des cellules en culture (Emerson *et al.*, 2006). La VP13 est en interaction avec différentes protéines dans les cellules (Osterman *et al.*, 2015); joue un rôle dans

l'induction et la signalisation de l'interféron (Dong *et al.*, 2012 ; Nan *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2014), et est également impliquée dans la libération de virions (Takahashi *et al.*, 2008 ; Ding *et al.*, 2017).

Un nouvel ORF a été découvert sur l'ORF1 mais uniquement sur des HEV de génotype 1. Pour ce génotype, il existe un ORF supplémentaire : l'ORF4 (Nair *et al.*, 2016). La protéine codée par l'ORF4 est exprimée lorsqu'un stress du réticulum endoplasmique se produit et peut stimuler l'activité de la polymérase en interaction avec un facteur d'élongation eucaryote (Nair *et al.*, 2016). La traduction de l'ORF4 est pilotée par une séquence de type IRES (Internal ribosome entry site*)* du site d'entrée du ribosome interne située entre les nucléotides 2701–2787 du génome du HEV (Nair *et al.*, 2016). Le produit de l'ORF4 formera un complexe avec d'autres protéines pour stimuler l'activité de la RdRp et augmenter ainsi la réplication virale.

L'organisation génomique du HEV est présentée dans la Figure 2 (Capai *et al.*, 2018).

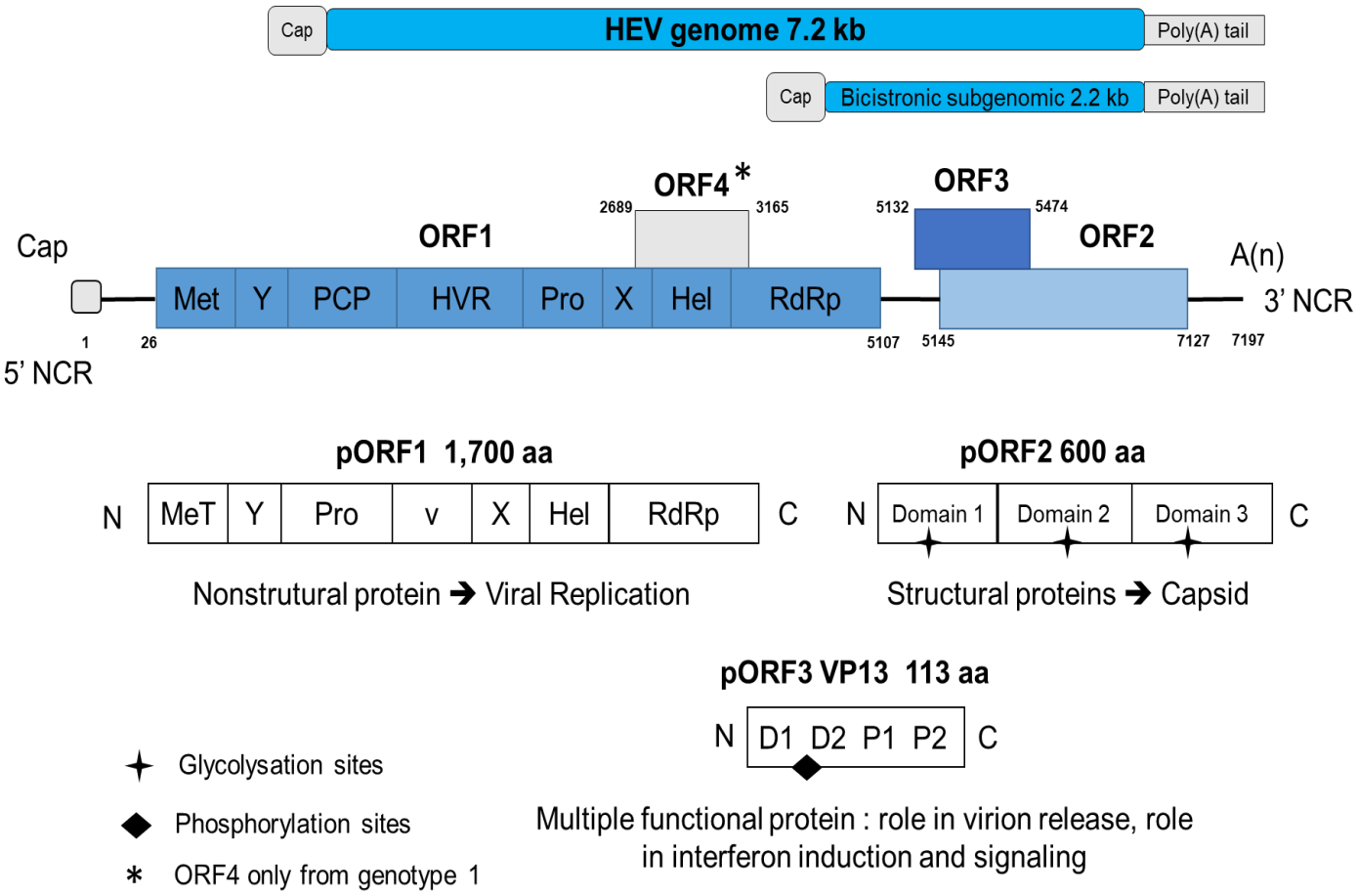


Figure 2 Organisation génomique du virus du HEV

Taxonomie

La taxonomie actuelle classifie le HEV dans la famille des *Hepeviridae* (Kamar *et al.*, 2012b). Depuis 2015, cette famille a été scindée en deux genres : le genre *Orthohepevirus* qui intègre les *Orthohepevirus* A à D et le genre *Piscihepevirus* (Piscihepevirus A) (Smith DB, 2014 ; Smith *et al.*, 2016a).

Le genre *Orthohepevirus* A inclus au moins huit génotypes distincts (HEV-1 à HEV-8) mais un seul sérotype. Les génotypes 1 et 2 ont été détectés uniquement chez l'Homme, alors que le génotype 3 et 4 ont été détectés chez l'Homme et de nombreux autres mammifères (*Suidae, Cervidae,* etc.). Les génotypes 5 et 6 ont été détectés uniquement chez les sangliers (Takahashi *et al.*, 2010a ; Takahashi *et al.*, 2011 ; Takahashi *et al.*, 2014). Le génotype 7 a été détecté chez l'Homme et les *Camelidae* (Woo *et al.*, 2014). Enfin, le nouveau génotype 8 pourrait infecter l'Homme comme le génotype 7, mais a actuellement été détecté sur des chameaux de Bactriane (Woo *et al.*, 2016). Le HEV provenant des lapins appartient également aux Orthohepevirus A, et correspond au génotype 3ra (Lhomme *et al.*, 2013 ; Smith *et al.*,

2016b). Ces souches ont également été à l'origine d'infections humaines (Abravanel *et al.*, 2017).

Les *Orthohepevirus* B correspondent aux virus aviaires et sont divisés en quatre sous-types (I-IV), qui sont principalement détectés sur les poulets domestiques. Les *Orthohepevirus* C possèdent deux génotypes, les C1 qui sont principalement retrouvés chez les rats, et le C2 chez les furets. Bien que le HEV du rat diffère assez significativement des génotypes classiquement retrouvés chez l'Homme, des cas humains infectés par ce génotype C1 ont été récemment détectés notamment en Asie (HKU Li Ka Shing Faculty of Medicine, 2018 ; Sridhar *et al.*, 2018 ; Andonov *et al.*, 2019). Les souches *Orthohepevirus* D ont été détectés au sein de différentes espèces de chauve-souris (Drexler *et al.*, 2012).

Enfin, le genre *Piscihepevirus* n'inclus qu'une seule espèce (A), le virus de la truite fardée, qui infecte la truite, bien que son pouvoir pathogène et son éventail d'hôtes ne soient pas connus (Purdy *et al.*, 2017).

Les membres de la famille des *Hepeviridae* sont illustrés au niveau de la Figure 3 (Doceul *et al.*, 2016). Le génotype HEV 8 qui n'était pas encore découvert au moment de la revue n'est pas présent sur cette arbre phylogénétique ainsi que les cas humains causés par le génotype HEV C1 du rat.

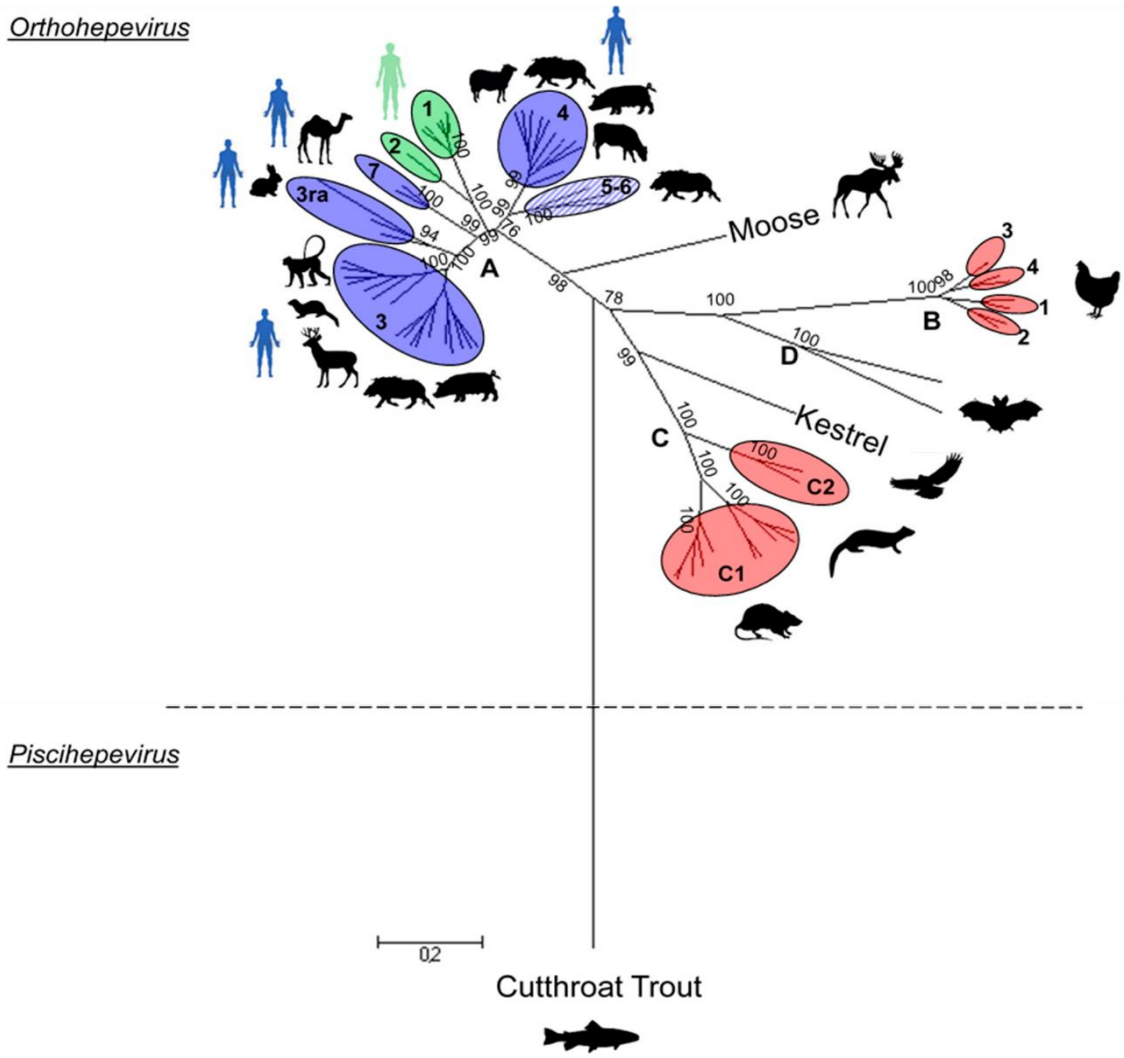


Figure 3 Arbre phylogénétique représentant la famille des Hepeviridae (Doceul et al., 2016)

Cycle de réplication putatif du HEV

Les systèmes pour la culture du HEV in vitro n'ont été développés que très récemment, et certains mécanismes de la réplication virale restent donc hypothétiques.

Les études analysant le génome et les analogies avec d'autres virus à ARN ont permis d'en apprendre davantage sur la réplication du HEV. De façon évidente, le HEV se multiplie principalement dans les hépatocytes mais une réplication intermédiaire a également été détecté dans le colon, l'intestin et les ganglions lymphatiques de porcs (Williams *et al.*, 2001), ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien et le cœur d'humains infectés (Kamar *et al.*, 2010c).

Le HEV n'est pas cytolytique (Tanaka *et al.*, 2007), de plus des études ont prouvé la nécessité de la voie exosomale pour la libération du virus en dehors de la cellule hôte (Nagashima *et al.*, 2014 ; Nagashima *et al.*, 2017). Les virus sécrétés dans le sang sont associés

à la protéine ORF3 et à des lipides, mais ceux sécrétés dans la bile sont sous forme non enveloppés (Nagashima *et al.*, 2011 ; Nagashima *et al.*, 2014). Ces différentes formes virales auront donc des spécificités par la suite, notamment au niveau de l'attachement à la future cellule hôte et à l'entrée du virus dans la cellule. Une fois la libération du génome dans le cytoplasme, la suite du cycle de réplication est identique pour les deux formes.

Attachement

Le récepteur cellulaire du HEV n'est pas encore déterminé, cependant différents acteurs ayant un rôle dans l'attachement et l'entrée du HEV non enveloppé ont été déterminés dans la littérature. Les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) semblent nécessaires à l'attachement du HEV sur ses cellules cibles (Kalia *et al.*, 2009). En revanche ces HSPG ne sont pas nécessaires pour les virus quasi-enveloppés (Yin *et al.*, 2016a). De plus, des expériences sur le peptide de l'ORF2 suggèrent que la région C-terminal de l'ORF2 permettrait l'entrée du virus par liaison à la protéine heat shock cognate 70 (Hsc70) à la surface de la cellule (Zhou et Emerson, 2006). D'autres études ont également montré que les protéines Glucose-Regulated 78 (GRP78) (Yu *et al.*, 2011a), l'Asialoglycoproteine receptor (ASGPR) (Zhang *et al.*, 2016), l'ATP synthase Subunit 5 beta (ATP5B) (Ahmed *et al.*, 2016) et l'intégrine alpha 3 (ITGA3) (Shiota *et al.*, 2019) avaient un rôle dans l'attachement et l'entrée du eHEV dans ses cellules cibles.

Les particules virales quasi enveloppées n'ayant pas de protéines virales à leur surface, elles doivent utiliser des facteurs d'attachement et/ou des récepteurs cellulaires différents pour initier l'entrée dans la cellule. A l'instar des exosomes, la membrane des eHEV contient de la phosphatidylsérine, qui peut se lier à son récepteur TIM-1 à la surface des cellules cibles (Jemielity *et al.*, 2013 ; Das *et al.*, 2019). Les molécules jouant un rôle dans l'attachement du eHEV semblent avoir une cinétique plus lente, en effet l'attachement des eHEV apparait moins efficace que les virus nus (Yin *et al.*, 2016a). Cette liaison moins spécifique pourrait expliquer la détection du HEV dans d'autres tissus que le foie (Pischke *et al.*, 2017) et également les manifestations cliniques extra-hépatiques par la présence d'une structure exosomale autour du virus (Yin *et al.*, 2016b).

Entrée du virus et libération du génome viral

Une fois attaché à la cellule, le HEV entre dans la cellule par une endocytose clathrine, dynamin-2 et cholestérol membranaire dépendante (Kapur *et al.*, 2012 ; Holla *et al.*, 2015). L'étude d'Holla *et al.* 2015 a également montré que le HEV se propageaient initialement dans

les compartiments positifs pour Rab5, puis dans les compartiments lysosomaux acides où elles sont dégradées. Cependant, l'inhibition de Rab5 et Rab7 et d'agents lysosomotropes ne diminue pas l'infectiosité du virus. Ces résultats suggèrent que le décollement des particules HEV se produit avant d'atteindre le compartiment Rab5+ (Yin *et al.*, 2016a). La voie PI3K et l'actine ont également été identifiées comme facteurs importants d'internalisation (Holla *et al.*, 2015). Une fois internalisé le HEV va pouvoir libérer son génome dans le cytoplasme à travers la membrane endosomale.

De façon similaire au HEV nu, le eHEV est internalisé dans les hépatocytes par la voie clathrine et dynamine dépendante (Kapur *et al.*, 2012 ; Yin *et al.*, 2016b). Une fois internalisé, le eHEV est transporté successivement dans le compartiment endosomale Rab 5+ et Rab 7+ et atteint finalement le lysosome, où la dégradation de la quasi-enveloppe aurait lieu (Holla *et al.*, 2015 ; Yin *et al.*, 2016a). Une fois libéré de sa quasi-enveloppe le HEV peut libérer son génome dans le cytoplasme.

Le schéma d'entrée du HEV sous ses deux formes est présenté dans la Figure 4 (Yin et Feng, 2019).

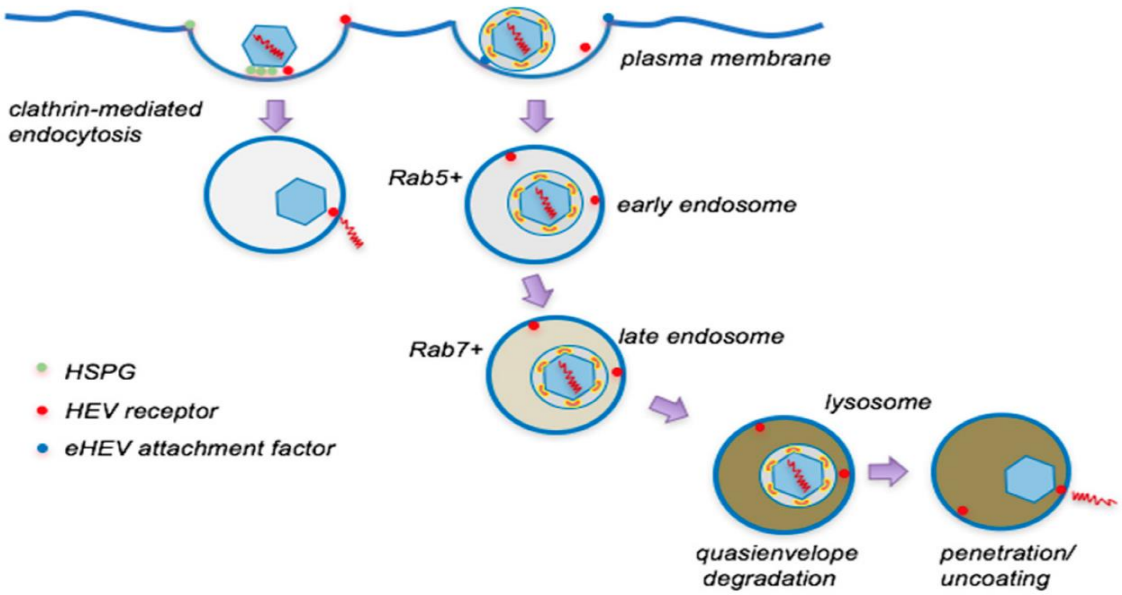


Figure 4 Schéma d'entrée des HEV nus ou quasi enveloppés dans les cellules cibles (Yin et Feng, 2019)

Les chemins utilisés par le virus dans la cellule demeurent inconnus, cependant la protéine Hsp90 et la tubuline pourraient jouer un rôle dans le transport intracellulaire (Zheng *et al.*, 2010). Une fois l'ARN viral dans le cytosol, la traduction en la polyprotéine pORF1 va avoir lieu grâce à sa coiffe 5'. Suite à la traduction et à l'action de la méthyl transférase, de la

protéase, de l'hélicase et de l'ARN polymérase l'ARN génomique est copié en brin ARN négatif qui permettra la synthèse des ARN génomiques et sous génomiques (Purdy, 1993).

L'extrémité 3' du génome se lierait spécifiquement à la réplicase à la surface du réticulum endoplasmique (Rehman *et al.*, 2008). L'ORF2 et l'ORF3 sont traduits successivement pour produire les protéines structurales de la capside et les phosphoprotéines. Elles permettront ainsi l'encapsidation des ARN viraux néosynthétisés et permettront d'obtenir ainsi les nouvelles particules virales (Graff *et al.*, 2006 ; Yamada *et al.*, 2009); la protéine Grp78 régulée par le glucose appartenant à la famille Hsp70 pourrait jouer un rôle dans le repliement et l'assemblage des protéines de capside (Yu *et al.*, 2011a). Les protéines codées par l'ORF2 et 3 interagissent ce qui suggèrent un rôle de l'ORF3 dans l'assemblage des particules virales (Tyagi *et al.*, 2002).

Récemment, un nouveau système de culture cellulaire a été développé et a permis la détection de la réplication virale et de l'expression des protéines très tôt après la transfection (Montpellier *et al.*, 2018). Des expériences au cours du temps ont montré que la protéine ORF2 était produite tôt et que de grandes quantités étaient sécrétées dans le surnageant des cellules transfectées. Fait intéressant, les protéines ORF2 et ORF3 du lysat cellulaire et du surnageant cellulaire ont migré différemment, ce qui indique que ces protéines subissent probablement des modifications post-traductionnelles au cours de la sécrétion.

Un exemple de cycle de réplication putatif du virus est présenté dans la Figure 5.

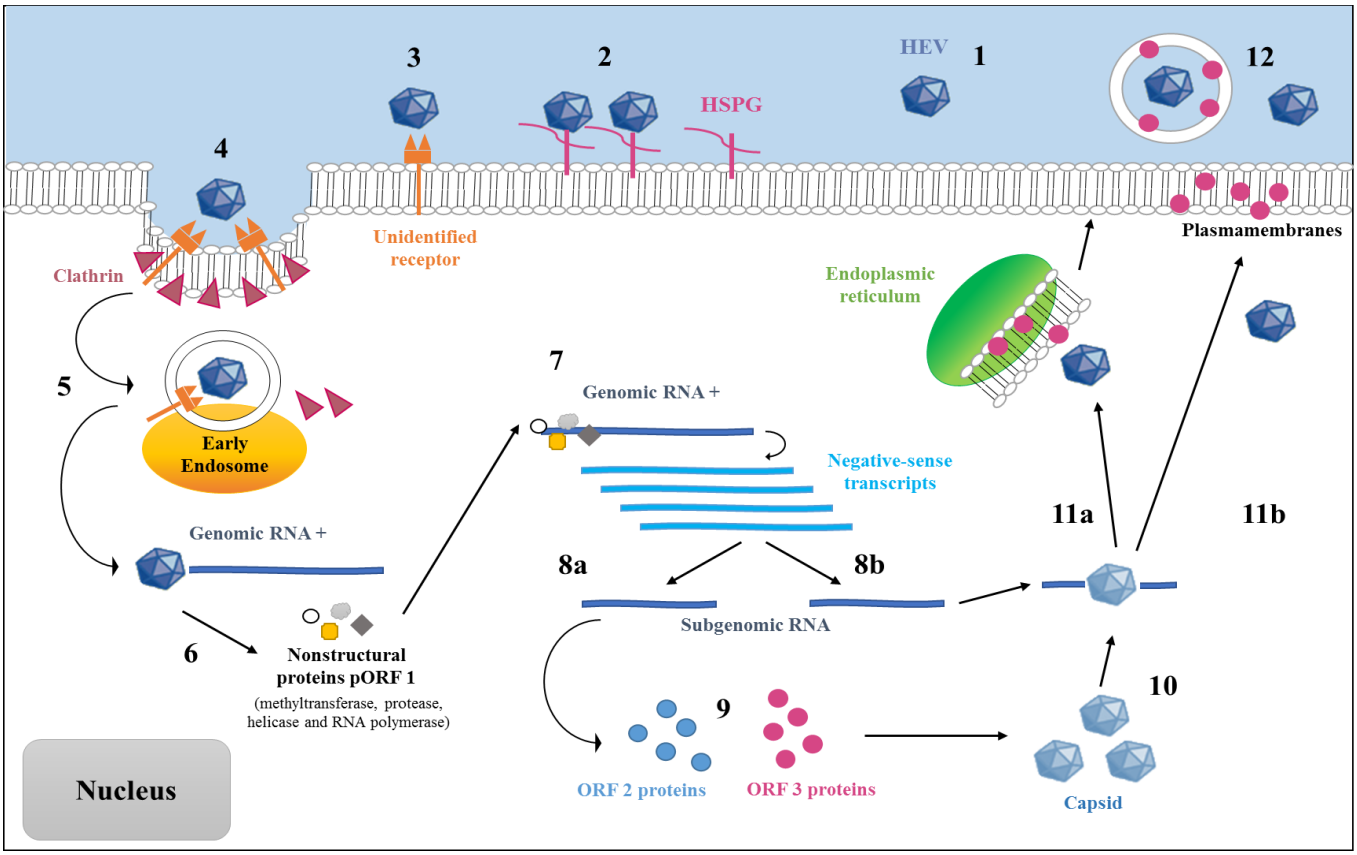


Figure 5 Schéma du cycle de réplication putatif du HEV non enveloppé

Légende du de la figure 5 :

- Étape 1 : HEV dans l'environnement extracellulaire
- Étape 2 : Fixation du HEV à la cellule cible impliquant la protéine Hsc70
- Étape 3 : Liaison au récepteur et actions de diverses protéines
- Étape 4 : Endocytose clathrine dépendante
- Étape 5 : Décapsidation et libération de l'ARN génomique
- Étape 6 : ARN traduit en protéine pORF1 non structurale (à partir de cette étape le cycle est commun pour les deux formes de virus HEV et eHEV)
- Étape 7 : Réplication de l'ARN + en transcrits ARN -
- Étape 8a : Synthèse d'ARN sous-génomique
- Étape 8b : Synthèse des ARN + complets
- Étape 9 : Traduction de l'ARN sous-génomique en protéines pORF2 et pORF3
- Étape 10 : Formation de la capside et assemblage de nouveaux virions.
- Etapes 11a et 11b : Sortie du virus via les protéines ORF3 fixées sur les membranes endoplasmiques ou la paroi cellulaire
- Étape 12 : Virions matures liés à la protéine ORF3 et aux lipides (sous forme quasi enveloppée dans le sang) ou libres (dans la bile).

Clinique

La répartition des cas entre les formes symptomatiques et asymptomatiques n'est pas encore réellement bien connue. Mais face à la très forte séroprévalence observée dans certaines régions « hyper endémiques » en opposition avec le nombre de cas cliniques enregistrés, l'infection par le HEV apparaitrait bien dans la grande majorité des cas sous une forme asymptomatique (Said *et al.*, 2009 ; Aggarwal, 2011 ; Echevarria, 2014). Ces formes pourraient représenter jusqu'à 95% dans les pays industrialisés selon l'European Association for the Study of the Liver (EASL) (Dalton *et al.*, 2018).

Cependant une certaine proportion de personnes infectées peut avoir des symptômes. Les mécanismes menant aux différentes formes cliniques ne sont que partiellement compris (Said *et al.*, 2009 ; Aggarwal, 2011 ; Echevarria, 2014 ; Ahmed *et al.*, 2015) et peuvent être très variés (Figure 6). Dans cette partie les différentes formes cliniques de l'hépatite E sont décrites.

Hépatite aigüe

Chez l'Homme, la forme aigüe peut être causée par l'ensemble des génotypes majeurs (1 à 4). Les symptômes sont proches de ceux observés pour l'Hépatite A. Les formes cliniques sont similaires entre les pays développés et industrialisés (Aggarwal, 2011). La période d'incubation peut varier entre 15 jours et 9 semaines, avec une moyenne à 40 jours. La phase prodromique est très variable et peut se manifester sous forme d'asthénie, de fièvre et de troubles digestifs pendant plusieurs jours, suivis d'une phase ictérique de deux semaines ; par conséquent, il n'est pas surprenant que la plupart des cas restent non détectés au stade aigu. L'hépatite est causée par une réaction immunitaire dirigée contre les hépatocytes infectés. L'hépatite cytolytique aiguë est le symptôme le plus courant. Dans la plupart des cas, l'évolution de la maladie est favorable et les paramètres biologiques se normalisent dans les trois mois (Nicand *et al.*, 2009). Les formes cholestatiques apparaissent dans environ 20% des cas (défaut d'élimination biliaire) (Irshad, 1999).

Dans les pays industrialisés, les cas symptomatiques affectent principalement les hommes âgés de plus de 55 ans (Mansuy *et al.*, 2009b) avec un âge médian de 63 ans (Dalton *et al.*, 2008b). Le taux de mortalité est d'environ 1 à 4% et est supérieur à celui de l'hépatite A (0,1–2,5%) (Purcell et Emerson, 2008). Cependant, ce taux est surestimé car il est calculé parmi les formes symptomatiques en milieu hospitalier. Au sein de la population générale, le taux de mortalité est d'environ 0,06–0,7% (Naik *et al.*, 1992). Les cas menant au décès du patient correspondent à des hépatites fulminantes.

Hépatite fulminante

Dans des cas très rare, des hépatites aigües peuvent évoluer en hépatite fulminante (Dalton *et al.*, 2007b). Ces formes graves sont fréquentes chez les personnes ayant des problèmes de foie dans les pays industrialisés après une infection due au HEV (Xin et Xiao, 2016). Différents cas ont d'ailleurs été rapportés, par exemple en Italie (Festa *et al.*, 2014), mais également en Espagne (Mateos *et al.*, 2005 ; Mateos Lindemann *et al.*, 2010 ; Mateos-Lindemann *et al.*, 2013), en France (Doudier *et al.*, 2014 ; Doudier *et al.*, 2015), et au Japon (Suzuki *et al.*, 2002 ; Sainokami *et al.*, 2004). Malgré des spécificités cliniques, il n'y avait pas de corrélation entre la sévérité de la pathologie et le génotype (Kumar *et al.*, 2011). Cependant, une étude cas- témoins en France a montré que l'infection au génotype 4 pourrait donner des formes plus sévères d'infection (Jeblaoui *et al.*, 2013). Cette spécificité clinique ou non liée au génotype n'est donc pas encore établie. Il faut cependant retenir qu'au sein de ces études le nombre de cas étudiés était assez limité, des études supplémentaires mériteraient donc d'être menées.

Chronicité

La chronicité est définie comme une virémie persistante de trois à six mois après le diagnostic (Kamar *et al.*, 2008b ; Kamar *et al.*, 2011). Les aspartates aminotransférases (AST) et les alanines aminotransférases (ALT) sont moins élevées chez les patients qui ont une forme chronique, la moyenne des ALT est de 300 UI/L chez les chroniques, contre 1000 IU/L pour une hépatite aigüe (Murali *et al.*, 2015). Il n'y a pas de corrélation entre la charge virale dans le sang et le risque d'évolution vers une fibrose du foie (Legrand-Abravanel *et al.*, 2010 ; Murali *et al.*, 2015).

La majorité des infections chroniques est causée par le génotype 3, probablement parce qu'il s'agit du génotype le plus couramment retrouvé en circulation dans les pays industrialisés (Gerolami *et al.*, 2008 ; Renou *et al.*, 2010 ; Tavitian *et al.*, 2010 ; de Niet *et al.*, 2012 ; Gauss *et al.*, 2012 ; Hoofnagle *et al.*, 2012 ; Te *et al.*, 2013). Cependant, des infections chroniques causées par des souches appartenant au génotype 4 ont été récemment décrites (Geng *et al.*, 2014 ; Debing *et al.*, 2016b). Une évolution rapide vers la cirrhose et le rejet de greffe ont été observés. Des cas ont été signalés dans plusieurs pays industrialisés (Péron *et al.*, 2006 ; Tamura *et al.*, 2007 ; Kamar *et al.*, 2008a ; Dalton *et al.*, 2009 ; Behrendt *et al.*, 2014).

Manifestations extra hépatiques

De nombreux types de manifestations extra hépatiques ont été rapportés que ce soit durant des infections aiguës et chroniques (Aggarwal et Jameel, 2011).

Des cas présentant des troubles hématologiques (thrombocytopénies, anémies hémolytiques, etc.), des problèmes rénaux , des pancréatites ou des myocardites par exemple, ont déjà été décrits que ce soit chez les patients immunocompétents ou immunodéprimés (Abid et Khan, 2002 ; Colson *et al.*, 2008 ; Fourquet *et al.*, 2010 ; Taton *et al.*, 2013 ; Guinault *et al.*, 2016 ; Kamar *et al.*, 2016).

Des signes neurologiques sont observés dans 5% des cas (Deroux *et al.*, 2014 ; Kamar *et al.*, 2015a) : le syndrome de Guillain-Barré (SGB), l'amyotrophie névralgique et l'encéphalite / méningo-encéphalite / myosite étaient associées à des formes aiguës (Kamar *et al.*, 2016). Une étude récente a montré une fréquence d'apparition de signes neurologiques plus importante, de 16,5% (Abravanel *et al.*, 2018) et de nombreux cas européens de formes neurologiques ont été rapportés avec le génotype 3 (Dalton *et al.*, 2016).

Infection au HEV pendant la grossesse

La majorité des études cliniques et des cas chez les femmes enceintes proviennent de pays en développement (principalement d'Afrique centrale et d'Asie du Sud-Est) de génotypes 1 et 2. Dans ces zones de forte endémie, le taux de mortalité et de transmission verticale sont élevés et des formes graves se sont manifestées (Jaiswal *et al.*, 2001 ; Kumar *et al.*, 2004 ; Dahiya *et al.*, 2005 ; Jilani *et al.*, 2007 ; Purcell et Emerson, 2008 ; Shrestha *et al.*, 2009 ; Prasad *et al.*, 2016).

Cependant, peu de cas ont été rapportés pendant la grossesse dans les pays industrialisés (Shaikh et Nelson-Piercy, 2006 ; Lindemann *et al.*, 2010 ; Anty *et al.*, 2012 ; Tabatabai *et al.*, 2014 ; Lachish *et al.*, 2015). Le premier cas signalé d'une femme enceinte infectée par le HEV-3 en Europe concernait une femme de 41 ans vivant en France (Anty *et al.*, 2012). Cette femme et son bébé n'ont eu aucune complication. Les génotypes HEV-3 et HEV-4 ne semblent pas causer d'infections fatales dues à l'hépatite fulminante chez la femme enceinte (Lachish *et al.*, 2015 ; Horvatits *et al.*, 2019).

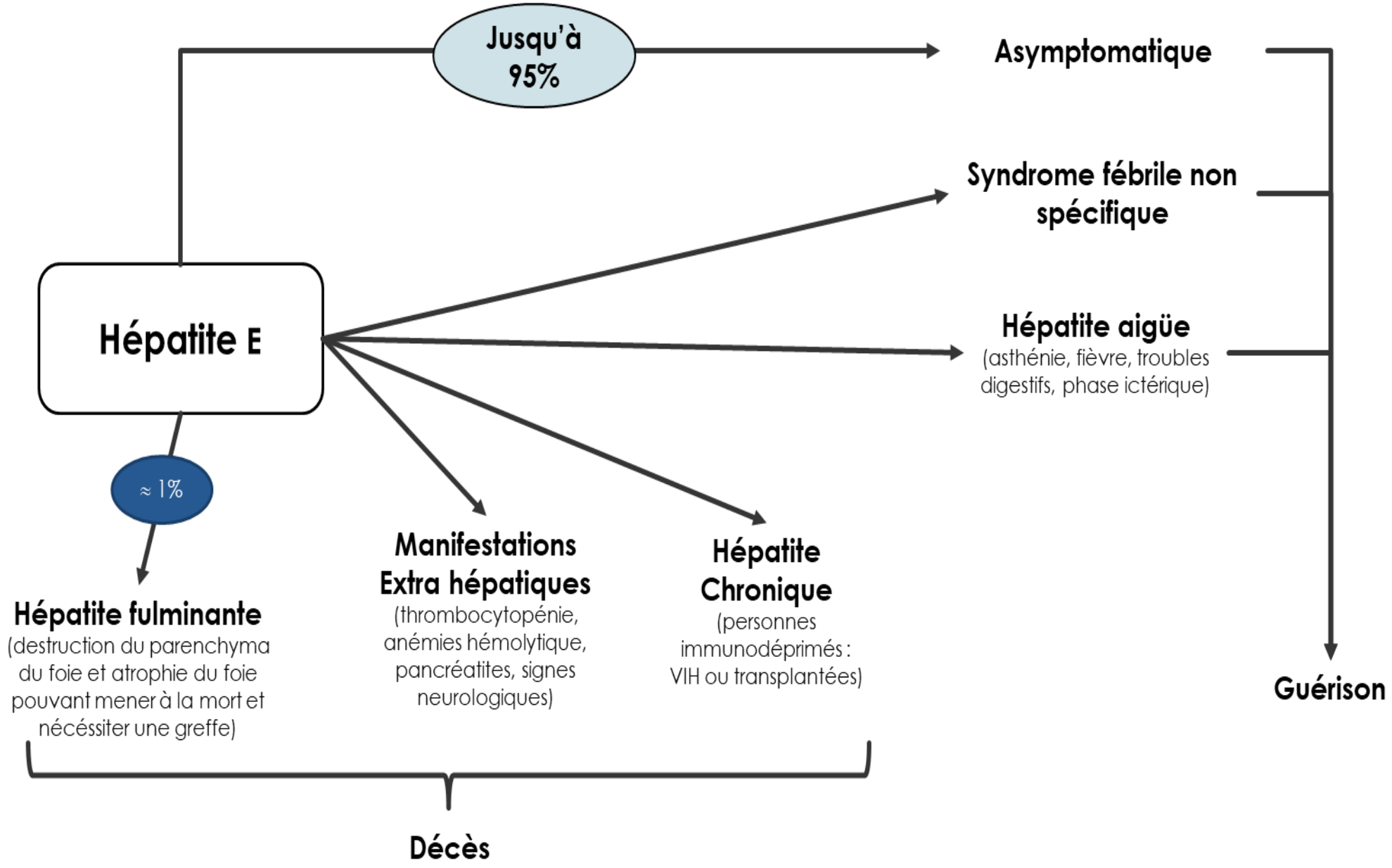


Figure 6 Les différentes formes cliniques de l'hépatite E

Marqueurs d'infection et diagnostic

Le diagnostic de l'Hépatite E par l'étude des signes cliniques est très compliqué. En effet, comme vu dans la partie précédente la majorité des cas sont asymptomatiques et les différentes formes cliniques ne sont pas spécifiques de cette pathologie. Le diagnostic passe donc par la détection des marqueurs d'infection : les anticorps IgM et IgG anti-HEV, la détection du génome viral dans le sang ou les fèces mais également l'activité des alanine aminotransférases (ALT). La cinétique des marqueurs d'infection est présentée dans la Figure 7 (Lhomme *et al.*, 2016).

Les anticorps IgM anti-HEV apparaissent en premier dans la cinétique des marqueurs suite à l'infection. Le pic du titre anticorps IgM intervient après 4 à 8 semaines et les IgM restent détectables jusqu'à 32 semaines après l'infection (Huang *et al.*, 2010). Tout comme la détection du génome viral dans les fèces et le sang, ce marqueur est synonyme d'infection récente ou en cours.

Les anticorps IgG apparaissent juste après les IgM et peuvent être détectés des années après l'infection, ils correspondent à la mémoire immunitaire (Khuroo *et al.*, 1993). Les IgG sont des marqueurs d'une infection plus ancienne. De nombreuses études ont montré une très grande hétérogénéité entre les tests commerciaux de détection des anticorps IgG du HEV (Bendall *et al.*, 2010 ; Wenzel *et al.*, 2013 ; Avellon *et al.*, 2015 ; Vollmer *et al.*, 2016).

Une virémie est observée quelques jours avant l'apparition des manifestations cliniques et disparaît une à deux semaines après celle-ci (Aggarwal *et al.*, 2000). La quantité de virus trouvée varie selon les individus, mais selon une étude menée en 2007 sur 11 personnes, la charge virale variait de 2×10^3 à $1{,}7\times10^7$ copies du génome par millilitre (Takahashi *et al.*, 2007). La présence de HEV dans les selles est plus longue, car l'excrétion commence une semaine avant l'apparition des symptômes et peut durer jusqu'à six semaines. Cependant, chez les patients immunodéprimés, cette sécrétion peut être considérablement plus longue (Péron *et al.*, 2006). La charge virale dans les selles se situe dans la plage de $5{,}7\times10^4$ copies du génome par millilitre (Takahashi *et al.*, 2007). La détection du génome du HEV est extrêmement sensible et spécifique au diagnostic de l'hépatite E. La technique la plus couramment utilisée est la PCR par transcription inverse en temps réel (qRT-PCR). Elle est donc effectuée à partir d'échantillons de sang ou de selles, et les séquences ciblées pour la détection du génome de HEV sont l'ORF2 et l'ORF3. En plus du sang et des selles, le HEV a également été retrouvé au niveau des urines chez des patients infectés (Marion *et al.*, 2019).

D'autres marqueurs de l'hépatite E existent, il s'agit de la détection des ALT dans le sang. Les ALT apparaissent deux à trois semaines après l'infection, avec un pic à la sixième semaine, en même temps que le début de la phase ictérique (Kamar *et al.*, 2017). Cette activité enzymatique n'est pas spécifique à l'hépatite E, mais témoigne de symptômes au niveau du foie. Les ALT sont modérément élevées chez les patients immunodéprimés. Les tests de laboratoire de routine détectent généralement une augmentation des taux d'alanine et d'aspartate aminotransférase (ALT, AST), accompagnées d'une augmentation des taux de phosphatase alcaline (PA), de gamma-glutamyl transférase (γGT) et de bilirubine. Le niveau d'ALT augmente généralement entre 1000 et 3000 UI / L, mais des valeurs extrêmes peuvent être observées. L'élévation des ALT est généralement plus élevée que l'élévation de l'AST. Dans certains cas, le niveau d'ALT peut se maintenir à une valeur normale malgré la détection d'ARN du HEV (Wedemeyer *et al.*, 2012).

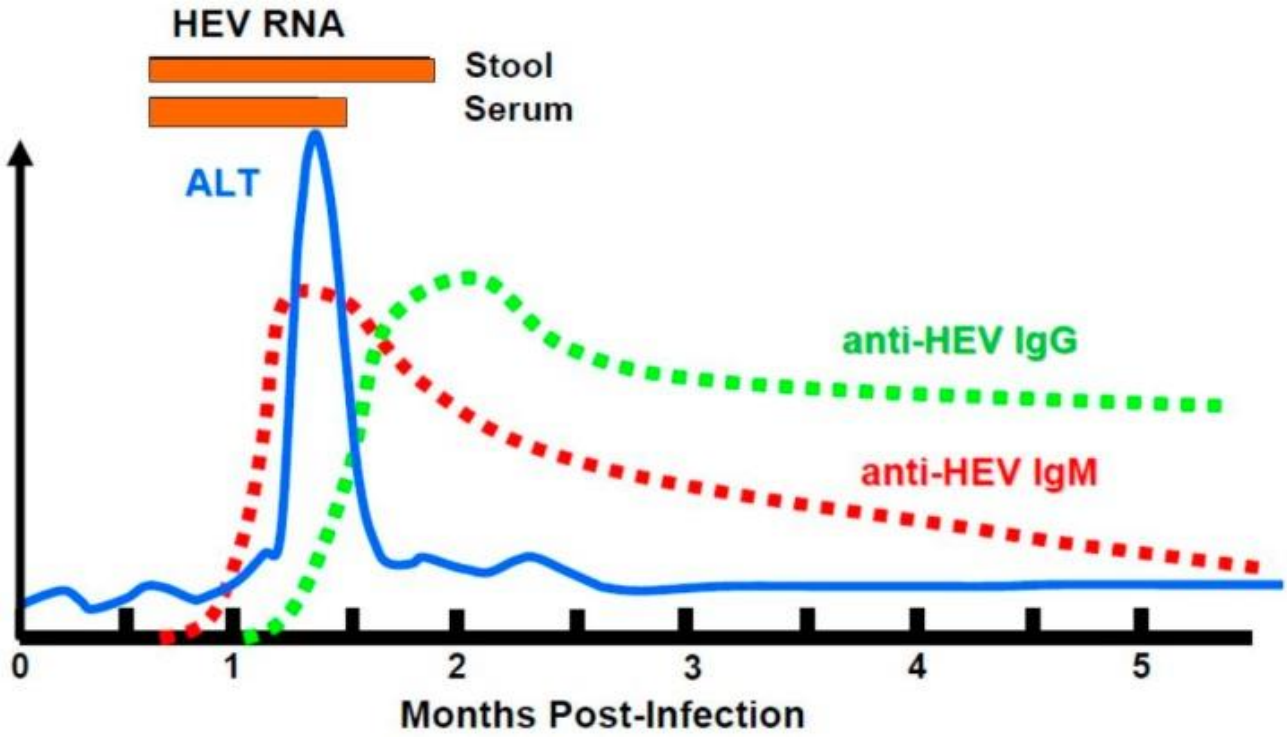


Figure 7 Evolution de la concentration des différents marqueurs d'infection au cours du temps (Lhomme et al., 2016)

Une revue a établi un arbre décisionnel pour le diagnostic d'une hépatite E (Figure 8) (Kamar *et al.*, 2014a). Au vue des très bonnes performances des tests ELISA IgM, cette revue suggère de tester ce marqueur d'infection en premier lieu que ce soit pour les patients immunocompétents ou immunodéprimés. Chez ces derniers, la recherche complémentaire de l'ARN viral est nécessaire car leur immunité altérée peut diminuer l'efficacité du test IgM. De

plus la détection de l'ARN du HEV est utile pour la caractérisation moléculaire et l'éventuelle persistance du HEV sous forme chronique. Si une forme chronique est avérée, la détection de l'ARN peut également aider pour la gestion de cette chronicité après la réduction de l'immunosuppression ou après l'initiation d'un traitement antiviral. Les test IgG sont eux utilisés pour la détermination d'une immunité acquise suite à une infection antérieure.

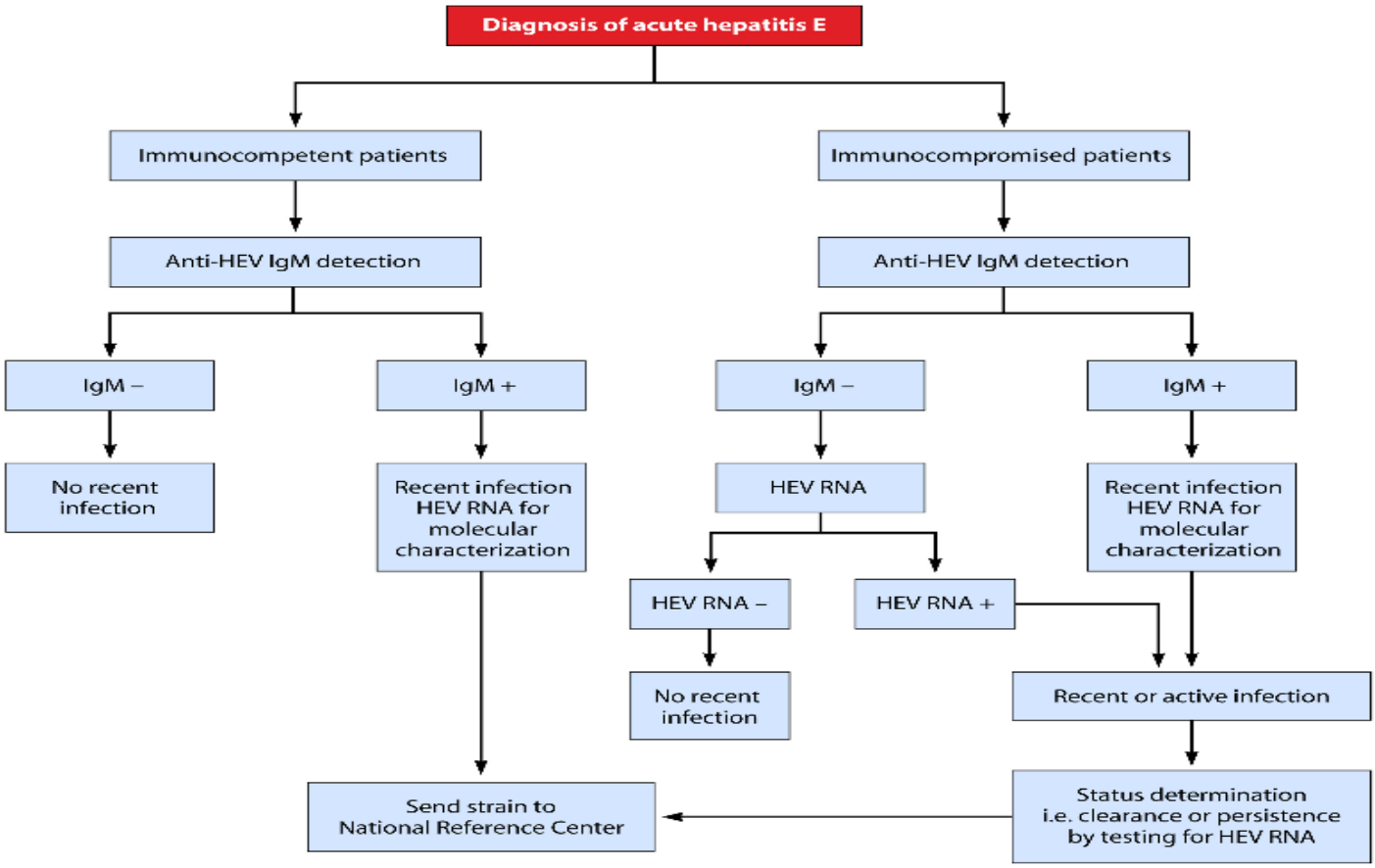


Figure 8 Arbre décisionnel pour le diagnostic (Kamar et al., 2014a)

En plus de ces marqueurs d'infection classiques utilisés pour le diagnostic depuis des années (Vollmer *et al.*, 2014), un nouvel indicateur de l'infection a récemment été mis en avant : il s'agit de l'antigène ORF2 (Ag) (Zhao *et al.*, 2015 ; Tremeaux *et al.*, 2016 ; Sayed *et al.*, 2019). La recherche de la présence de l'ORF2 Ag pourrait être intéressante notamment pour les laboratoires n'ayant pas accès aux techniques de biologie moléculaire (qRT-PCR). La détection de cette protéine peut également être utilisée pour vérifier l'efficacité d'un traitement antiviral dans le cas où les prélèvements de fèces et la détection virale ne seraient pas disponibles (Sayed *et al.*, 2019).

Traitement, vaccination et prévention

Traitement

Il n'existe pas de médicament spécifique contre l'hépatite E. Cependant, un traitement peut parfois être administré et celui-ci dépend du statut immunologique du patient, de ses antécédents et de la forme clinique présentée.

Pour les hépatites aigües, une prescription d'antiviraux n'est généralement pas effectuée. Dans la majorité des cas, l'élimination du virus et la guérison se font de façon spontanée (Dalton *et al.*, 2018). Ainsi, dans la grande majorité des infections aiguës HEV dans les pays industrialisés, il n'y a pas lieu d'envisager un traitement par la ribavirine. Cependant, le génotype 3 peut entraîner une insuffisance hépatique (chronique ou non) chez les patients présentant une maladie hépatique sous-jacente ou une hépatite fulminante. Dans ces cas bien précis, la ribavirine a été efficace (Gerolami *et al.*, 2011 ; Peron *et al.*, 2011). Dans une étude sur des cas d'infections HEV aiguës traités à la ribavirine, tous les patients ont éliminé le virus et aucun décès n'a été observé (Peron *et al.*, 2016). Il faudrait compléter ces études par des études supplémentaires prenant en compte l'effet placebo.

Chez les patients chroniques suivant un traitement immunorépresseur, la première étape est d'essayer de diminuer les doses, surtout celles concernant les médicaments ciblant les cellules T (Kamar *et al.*, 2010b). Suite à cette diminution, l'élimination du virus est observée dans 32% des cas. Dans le cas contraire, une prescription de ribavirine peut être effectuée. Une étude multicentrique a montré que la ribavirine pouvait être efficace dans le traitement de l'infection chronique par le HEV ; en effet, un traitement de trois mois semblait être une bonne durée de traitement pour la plupart des patients. A la fin du traitement, 95% des patients éliminent le virus (Kamar *et al.*, 2014b). Cette molécule représente donc le traitement de choix en cas d'infection chronique ou de manifestations extra-hépatiques (neurologiques, rénales, hématologiques) liées au HEV (Kamar *et al.*, 2015b). Le mécanisme réel d'action de la ribavirine sur le HEV demeure cependant encore inconnu, même si des hypothèses existent par homologie avec d'autres virus à ARN.

L'interféron pégylé alpha peut également être utilisé en cas d'infection au HEV. Il a été prescrit et s'est montré efficace soit en monothérapie soit conjoint à la ribavirine dans les cas suivant : chez des transplantés hépatiques restant virémiques malgré la baisse de l'immunosuppression et chez un patient hémodialysé chronique infecté (Haagsma *et al.*, 2010 ; Kamar *et al.*, 2010a ; Kamar *et al.*, 2010d). L'interféron pégylé a également été utilisé contre

le HEV chez des patients infectées par le VIH et chez des patients ayant une maladie hématologique (Alric *et al.*, 2010 ; Dalton *et al.*, 2011 ; Jagjit Singh *et al.*, 2013). En revanche, l'interféron n'est pas utilisé chez les patients greffés en raison du risque de rejet aigu de la greffe (Dalton *et al.*, 2018).

Prévention

Différents moyens de prévention non spécifiques peuvent être mis en place afin de limiter l'infection au HEV. La voie d'infection majeure étant féco-orale, il s'agit donc principalement de mesures d'hygiènes classiques et de cuisson des aliments.

Un lavage efficace des mains lors du contact avec certains animaux ou aliments à risque et une préparation correcte de ces aliments (chauffés à plus de 70 ° C à cœur) constituent un moyen de prévention (Emerson *et al.*, 2005a ; Colson *et al.*, 2010 ; Barnaud *et al.*, 2012b). Pour les femmes enceintes à haut risque d'hépatite fulminante, la consommation d'aliments « à risque » est fortement déconseillée.

Les professions à risques exposées aux animaux sauvages et domestiques devraient également prendre des mesures de prévention (masque, gants, tenues de protections) lors des activités liées au réservoir porcin notamment.

Le traitement des eaux usées et la qualité de l'eau dans les pays en développement demeurent un problème majeur de santé publique. L'eau non traitée est clairement une source d'infection dans les pays en développement et mais peut également l'être dans les pays industrialisés (voir partie sur les voies de transmissions ci-dessous).

Enfin, d'après l'Association Européenne de l'Etude du Foie (EASL), les personnes à risque comme les patients immunodéprimés, les femmes enceintes, et les personnes âgées doivent particulièrement être prudentes vis-à-vis du HEV car ce sont eux les personnes les plus touchées par les formes sévères (Dalton *et al.*, 2018).

Vaccin

Malgré le risque évident de transmission du HEV, les stratégies de prévention sont actuellement insuffisantes et rarement appliquées. Plusieurs études ont été entreprises pour développer un vaccin humain contre le HEV et un vaccin recombinant a été obtenu avec une efficacité de 95,5% avec trois doses (Shrestha *et al.*, 2007). Une autre étude menée auprès de plus de 50 000 participants (Zhang *et al.*, 2013) a montré une efficacité vaccinale de 100% après 12 mois et de 86,8% (intervalle de confiance à 95% de 715 à 945) après un suivi prolongé de

4,5 ans (Zhang *et al.*, 2015). Les personnes ayant reçu trois doses (0, un et six mois) ont conservé leurs anticorps anti-HEV pendant au moins 4,5 ans. À l'heure actuelle, ce vaccin contre le HEV a obtenu l'approbation du gouvernement chinois (Zhang *et al.*, 2015). Aucun vaccin n'est actuellement disponible dans les pays industrialisés où la transmission du HEV est principalement zoonotique. Par conséquent, il pourrait être possible de réduire le risque d'infection en éliminant la circulation du virus dans le réservoir le plus touché : les porcs. Dans une étude de modélisation, l'effet sur la dynamique de l'infection virale d'un vaccin fictif contre le HEV porcin zoonotique tardif ou précoce a été évalué. Une vaccination ultérieure à 10 semaines a réduit la proportion de porcs infectés à l'âge de l'abattage (Backer *et al.*, 2012). Par conséquent, la vaccination du réservoir principal pourrait être le choix optimal. En raison du grand nombre d'animaux à vacciner et de l'âge auquel ils ont été abattus, l'utilisation de vaccins inertes n'est pas applicable. Les vaccins inactivés sont coûteux à produire et nécessitent au moins deux injections pour une protection efficace. Dans ce contexte, il serait préférable de développer une souche vaccinale vivante atténuée; non seulement cela coûte moins cher à produire, mais une seule injection assure également une protection similaire à celle observée après une infection naturelle (Barrett, 2001).

Cependant, la production de vaccins vivants atténués est toujours basée sur des techniques empiriques qui ne permettent pas un contrôle précis ou une stabilisation du phénotype d’atténuation. Les déterminants moléculaires de l'atténuation sont le plus souvent liés à un petit nombre de modifications des protéines. Cela signifie qu'il existe un risque de réversion phénotypique ou que, en revanche, les modifications protéiques peuvent introduire de nouveaux caractères pathogènes différents de ceux de la souche de type sauvage. De plus, les méthodes utilisées pour produire ces vaccins ne permettent pas de contrôler complètement la composition des sous-populations virales entre différents lots de vaccins.

2. Epidémiologie du virus de l'hépatite E de la population humaine et voies de transmission dans les pays industrialisés

Epidémiologie de la population humaine

Le HEV est la principale cause d'hépatite transmissible par voie entérique dans le monde (Debing *et al.*, 2016b). L'hépatite E présente deux situations distinctes au niveau mondial. D'une part, des épidémies de grande ampleur dans les pays en développement, avec comme voie de transmission majeure la consommation d'eau insuffisamment traitée (génotype 1 et 2 majoritaires). Et d'autre part, dans les pays industrialisés, des cas plus sporadiques et une transmission zoonotique sont majoritaires (Dalton *et al.*, 2008a ; Kamar *et al.*, 2012b), bien que toutes les voies de transmission ne soient pas bien connues (Purcell et Emerson, 2008). Dans ces pays les génotypes majoritaires sont les génotypes 3 et 4.

La compréhension de l'épidémiologie du HEV en populations humaines dans les pays industrialisés est compliquée compte tenu du grand nombre d'études, de l'hétérogénéité des tests de laboratoire utilisés et des différents types de population inclus. Dans cette partie, un état de l'art est réalisé sur la situation épidémiologique des pays industrialisés.

Séroprévalence des IgG anti-HEV chez les donneurs de sang et dans la population générale

Les anticorps IgG anti-HEV représentent un marqueur d'infection passée au HEV. Cependant, une très grande hétérogénéité existe entre les différents tests ELISA et ce point rend la comparaison des séroprévalences dans les pays industrialisés assez complexe (Park *et al.*, 2012 ; Wenzel *et al.*, 2013 ; Shrestha *et al.*, 2016b).

Actuellement le kit Wantai est l'un des plus utilisés dans les pays industrialisés et possède une spécificité et une sensibilité de 93,2% et 97,8% respectivement (Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co. *;* Yan *et al.*, 2008 ; Abravanel *et al.*, 2013). De plus, certaines études ont montré un meilleur taux de détection d'anticorps avec ce kit en comparaison avec d'autres kits, et cette différence n'était pas due à de faux positifs (Rossi-Tamisier *et al.*, 2013 ; Hartl *et al.*, 2016). En effet, le kit Wantai a montré des séroprévalences très faibles chez les enfants et des valeurs croissantes avec l'âge (Christensen *et al.*, 2008 ; Mansuy *et al.*, 2011). La grande majorité des positifs par ELISA avec le kit Wantai a d'ailleurs été confirmée avec un immunoblot (Rossi-Tamisier *et al.*, 2013). Ce kit est également celui qui a été choisi par le Centre National de référence de l'hépatite E au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse (http://www.cnrvha-HEV.org/).

Le Tableau 1 ci-dessous présente les études ayant comparé différents kits au kit Wantai. Sur les cinq études qui ont testé les mêmes sérums en utilisant au moins deux méthodes différentes, le kit Wantai IgG a été utilisé à quatre reprises: dans ces quatre cas, la prévalence d'IgG observée avec le kit Wantai IgG était supérieure à celle obtenue avec les autres kits (Holm *et al.*, 2015 ; Sauleda *et al.*, 2015 ; Nemecek *et al.*, 2017 ; Hewitt *et al.*, 2018 ; Zafrullah *et al.*, 2018).

Tableau 1 Séroprévalences IgG anti-HEV observées lorsque la même population est testée à l'aide de tests différents

Pays	Population	Kit	Nombre d'échantillons	Séroprévalence IgG anti-HEV (%)	Références
Danemark	DS	Wantai	504	19,80	(Holm *et al.*, 2015)
		NIH		10,70	
Espagne	DS	Wantai	9 998	19,96	(Sauleda *et al.*, 2015)
		Mikrogen		10,72	
République Tchèque	PG	Mikrogen	1 715	6,70	(Nemecek *et al.*, 2017)
		Diagnostic Bioprobes	230	5,70	(Strakova *et al.*, 2014)
France	DS	Wantai	10 569	22,4	(Mansuy *et al.*, 2016)
		Genelabs Diagnostics	1 998	3,20	(Boutrouille *et al.*, 2007)
Nouvelle-Zélande	DS	Wantai	1 013	9,70	(Hewitt *et al.*, 2018)
		MP		8,10	
Etats-Unis	DS	Wantai	5 040	12,28	(Zafrullah *et al.*, 2018)
		DSI		11,29	
		MP		10,65	

DS : donneurs de sang ; PG : population générale. Liste des kits : Wantai: HEV-IgG ELISA; NIH, in-house assay developed at the National Institutes of Health, Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Diagnostic Bioprobes: ELISA kit HEV; Genelabs diagnostics: HEV ELISA; MP Diagnostic: HEV ELISA; DSI, Diagnostic Systems Incorporated.: DS-EIA-

Suite à ces différents résultats nous avons décidé de réaliser une méta-analyse des études de séroprévalences avec le kit Wantai dans les pays industrialisés (Capai *et al.*, 2019b). Au total, 26 études de 15 pays ont été inclues dans la méta-analyse. La séroprévalence globale d'IgG anti-HEV calculée était de 19% (IC 95% 14% - 25%) (Figure 9). Compte tenu de l'hétérogénéité entre les études, le modèle à effets aléatoires a été choisi. Les séroprévalences signalées allaient de 4,2% à 52,5% (Dalton *et al.*, 2007a ; Mansuy *et al.*, 2011). Une autre méta-analyse, sur les pays européens cette fois, avait estimé une séroprévalence proche de la nôtre avec le kit Wantai

de 17% (IC 95% 12,2% - 21,2%) (Hartl *et al.*, 2016). La liste des références associées aux études de la méta-analyse est présentée dans le Tableau 2. Nous avons également fait figurer les études de séroprévalences plus récentes qui ont été publiées après la publication de la revue.

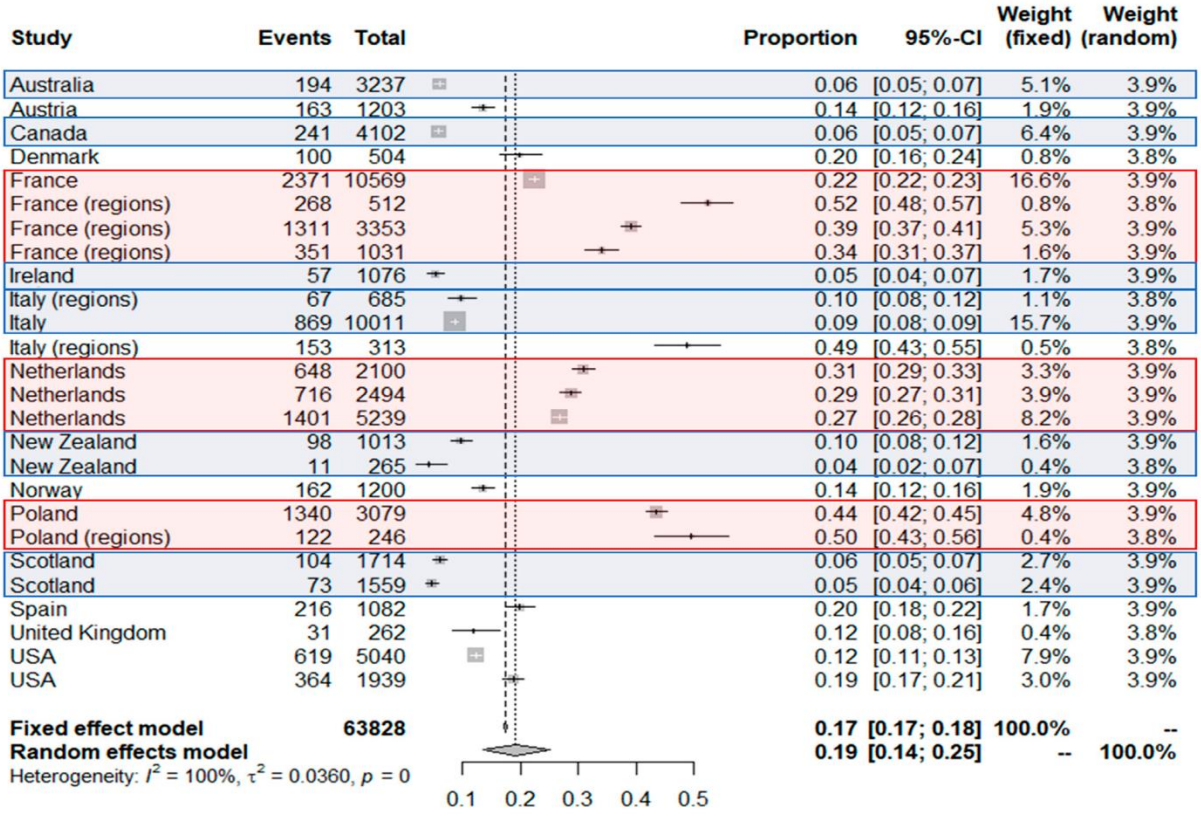


Figure 9 Résultats de la méta-analyse des études de séroprévalences dans les pays industrialisés réalisées avec le kit Wantai.

La France, la Pologne et les Pays-Bas apparaissent comme les pays présentant les plus fortes séroprévalences. La séroprévalence nationale est assez moyenne en France, mais des régions d'hyper endémies existent (Corse, PACA et Occitanie). Pour les Pays-Bas et la Pologne, les données des différentes études sont homogènes autour de 30 et 50% respectivement. La Nouvelle-Zélande, l'Ecosse, l'Australie, le Canada et l'Irlande ont des séroprévalences inférieures à 10%. Dans les six pays où au moins deux études ont été effectuées, le même ordre de grandeur de séroprévalence a été observé, notamment aux Pays-Bas (0,27 ; 0,29 ; 0,31), en Pologne (0,44 ; 0,50), en Écosse (0,05 ; 0,06) et en Nouvelle-Zélande (0,04 ; 0,1). En France, des taux de 0,22% (national), 0,34% (sud-ouest de la France), 0,39% et 0,52% (sud de la France) ont été observés. En Italie, trois études fournissaient des taux très différents autour de 0,09 (national et nord de l'Italie) et 0,49 (Italie centrale) : ces fortes différences dans certaines régions peuvent s'expliquer par les habitudes alimentaires locales ou la contamination environnementale du HEV.

Tableau 2 Etudes de séroprévalences IgG anti-HEV réalisées avec le kit Wantai dans les pays industrialisés

Pays	Population	Nombre d'échantillons	Positifs	Séroprévalence anti-HEV IgG (%)	Références
France (régions)	DS	512	268	52,5	(Mansuy *et al.*, 2011)
Pologne (régions)	DS	246	122	49,6	(Bura *et al.*, 2017)
Italie (régions)	DS	313	153	49	(Lucarelli *et al.*, 2016)
Pologne	DS	3079	1 340	43,52	(Grabarczyk *et al.*, 2018)
France (régions)	DS	3353	1 311	39 ,1	(Mansuy *et al.*, 2015b)
France (régions)	DS	1031	351	34	(Izopet *et al.*, 2015)
Pays-Bas	DS	2100	648	31	(Mooij *et al.*, 2018)
	GP	2494	716	28,7	(van Gageldonk-Lafeber *et al.*, 2017)
	DS	5239	1 401	27 / 24	(Slot *et al.*, 2013 ; Alberts *et al.*, 2018)
France	DS	10569	2 371	22,4	(Mansuy *et al.*, 2016)
Espagne	DS	1082	216	19,96	(Sauleda *et al.*, 2015)
Danemark	DS	504	100	19,8	(Holm *et al.*, 2015)
Etats-Unis	DS	1939	364	18,8	(Xu *et al.*, 2013)
Norvège	DS	1200	162	14	(Lange *et al.*, 2017)
Autriche	DS	1203	163	13,55	(Fischer *et al.*, 2015)
Etats-Unis	DS	5040	619	12,28	(Zafrullah *et al.*, 2018)
Royaume-Unis	DS	262	31	12	(Beale *et al.*, 2011)
Italie (régions)	DS	685	67	9,8	(Galli *et al.*, 2017)
Nouvelle-Zélande	DS	1013	98	9,7	(Hewitt *et al.*, 2018)
Italie	DS	10011	869	8,7	(Spada *et al.*, 2018)
Ecosse	DS	1714	104	6,1	(Thom *et al.*, 2018)
Australie	DS	3237	194	5,99	(Shrestha *et al.*, 2014)
Canada	DS	4102	241	5,9	(Fearon *et al.*, 2017)
Irlande	DS	1076	57	5,3	(O'Riordan *et al.*, 2016)
Ecosse	DS	1559	73	4,7	(Cleland *et al.*, 2013)
Nouvelle-Zélande	DS	265	11	4,2	(Dalton *et al.*, 2007a)

L’ensemble des résultats retrouvé dans la bibliographie au sein des pays industrialisés confirme l’endémicité du HEV dans la majorité des pays et la présence de nombreuses zones d’hyper endémies dans certaines régions.

Populations exposées au HEV

Les personnes travaillant en contact avec des animaux (travailleurs forestiers, chasseurs, éleveurs porcins et autres ouvriers de la ferme) sont apparues comme des catégories à risque avec des séroprévalences plus élevées (Tableau 3). Il est impossible de comparer des études qui n'ont pas utilisé les mêmes tests. Cependant, certaines études ont comparé, dans les mêmes conditions, une population « générale » à une « population exposée » (13,4%- 31,2%) (Carpentier *et al.*, 2012 ; Ivanova *et al.*, 2015). Bien que ces études n'aient pas été menées avec le test ELISA Wantai HEV-IgG, la plupart d'entre elles a été réalisée par rapport à une population de référence. Par conséquent, on peut en déduire que les populations suivantes présentent un risque plus élevé d’infection par le HEV : les éleveurs porcins ou exposés aux porcs domestiques (Meng *et al.*, 2002 ; Chaussade *et al.*, 2013 ; Krumbholz *et al.*, 2014 ; Ivanova *et al.*, 2015 ; Teixeira *et al.*, 2017), les travailleurs forestiers (Carpentier *et al.*, 2012 ; Dremsek *et al.*, 2012 ; Chaussade *et al.*, 2013), et les éleveurs (Lange *et al.*, 2017). Fait intéressant, les vétérinaires ne semblent pas toujours présenter un risque d'infection plus élevé (De Sabato *et al.*, 2017 ; Kantala *et al.*, 2017 ; Lange *et al.*, 2017). Toutefois, le type d’activité vétérinaire (rural ou urbain) peut influer considérablement sur le risque d’exposition au HEV, comme le montre une étude norvégienne où la séroprévalence chez les vétérinaires travaillant avec des porcs était deux fois plus élevée que chez ceux qui n’étaient pas en contact avec les porcs (Lange *et al.*, 2017).

Tableau 3 Séroprévalence IgG anti-HEV au sein de différentes populations exposées

Pays	Population	Kit	Nombre échantillons	Séroprévalence IgG anti-HEV (%)	p-value	OR [IC95]	Références
Estonie	C	Mikrogen	144	4,2	0,02	3,54 [1,07 ; 12,69]	(Ivanova et al., 2015)
	EP		67	13,4			
Allemagne	DS	Mikrogen	301	11	0,0076	1,77 [1,15 ; 2,794]	(Dremsek et al., 2012)
	EP		563	18			
	PG		106	28,3	0,02	2,14 [1,06 ; 4,41]	(Krumbholz et al., 2012)
	EP		116	15,5			
Norvège	DS	Wantai	1 200	14	*NS*, p > 0,05	/	(Lange et al., 2017)
	V		163	13			
	EF		79	30	0,00028	2,68 [1,54 ; 4,53]	
Portugal	PG	Mikrogen	804	19,9	0,01	1,78 [1,12 ; 2,79]	(Teixeira et al., 2017)
	EP		114	30,4			
Espagne	PG	ND	325	7,3	0,002	2,89 [1,42 ; 5,82]	(Riveiro-Barciela et al., 2012)
	EP		101	19			
Finlande	PG	Axiom	52	5,8	*NS*, p > 0,05	/	(Kantala et al., 2017)
	V		333	10,2			
Etats-Unis	DS	In-house assay	400	18	0,005	1,60 [1,14 ; 2,26]	(Meng et al., 2002)
	EP		468	26			
France	EF	MP Diagnostics	593	31,2	/	/	(Carpentier et al., 2012)
	PG		322	26	0,007	1,61 [1,13; 2,30]	(Chaussade et al., 2013)
	F		306	36,4			
	EP		231	43,8	0,0000017	2,19 [1,51 ; 3,21]	
Italie	DS	BioChain Institute	170	8,82	0,0007	3,30 [1,53 ; 8,15]	(De Sabato et al., 2017)
	V		83	9,64			
Pologne	C	ND	210	3,81	/	/	(Weiner et al., 2017)

C : Chasseurs, EP : éleveurs porcins ou contact avec des porcs, DS : donneurs de sang, F : Forestiers, EF : Eleveurs ferme, V: Vétérinaires, PG: Population générale. Liste des kits : Mikrogen: RecomLine IgG Anti-HEV; Axiom : HEV IgG EIA; MP Diagnostic : HEV ELISA; Biochain: ELISA Kit IgG Anticorps Virus Hepatitis E; ND: kit non déterminé

Les enfants

Les quelques études menées sur des enfants ont systématiquement montré des taux de séroprévalence assez faibles : <5% aux États-Unis, 4,2% en Turquie, 4,6% en Espagne, 1,4% en Russie et 1,1% au Portugal (Buti *et al.*, 2008 ; Kuniholm *et al.*, 2009 ; Potemkin *et al.*, 2015 ; Bayhan *et al.*, 2016 ; Oliveira *et al.*, 2017) (Tableau 4).

Tableau 4 Séroprévalences IgG anti-HEV déterminés chez les enfants

Pays	Population	Kit	Nombre d'échantillons	Séroprévalence IgG anti-HEV (%)	Références
Etats-Unis	E	ND	18 695	<5	(Kuniholm *et al.*, 2009)
Espagne	E	Biokit	1 249	4,6	(Buti *et al.*, 2008)
Turquie	E	Diagnostic Bioprobes	408	4,2	(Bayhan *et al.*, 2016)
Russie	E	ND	3 122	1,4	(Potemkin *et al.*, 2015)
Portugal	E	Mikrogen	352	1,1	(Oliveira *et al.*, 2017)

E : Enfants. Liste des kits utilisés : Biokit: bioelisa HEV IgM 3.0; Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Euroimmun: Anti IgG HEV ELISA; Diagnostic Bioprobes: HEV IgG. ND: not determined assay.

Cas groupés et épidémies

Cas confirmés

L'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) a rapporté que le nombre de cas HEV confirmés est passé de 514 en 2005 à 5617 en 2015, avec un nombre total de cas de 21 018 durant la période (Aspinall *et al.*, 2016). Trois pays étaient à l'origine de 80% des cas rapportés (France, le Royaume-Unis et l'Allemagne). Le nombre de cas sévères a également augmenté entre 2005 et 2015 (n=85 vs. 1115). Le sex-ratio (masculin) variait de 61% à 69%. La proportion de cas chez les personnes de plus de 50 ans est passée d'environ 40% au cours de la période 2005-2008 à plus de 60% au cours de la période 2013-2015. Au cours de la période 2005-2015, 28 décès imputables au HEV ont été déclarés, ce qui représente une nette augmentation depuis 2009.

Bien que les épidémies de HEV soient principalement dues aux génotypes 1 et 2 dans les pays en développement, de petites épidémies ont été décrites dans les pays industrialisés. L'ECDC a signalé 37 foyers entre 2005 et 2015, avec une tendance à la hausse après 2009

(ECDC, 2017). La taille des épidémies était comprise entre 2 et 47 cas par an. Les données sur les foyers de HEV de cette étude ont été fournies par 18 pays et parmi eux, 11 n'ont signalé aucun foyer.

Description des foyers

Le Tableau 5 récapitule les sept foyers épidémiques HEV des pays industrialisés rapportés ces dernières années. Deux d'entre eux était causés par le génotype 3 avec une source commune de contamination liée à la consommation de viande de porc ou de sanglier pas assez cuite.

En Espagne, en octobre 2015, une patiente infectée par le VIH s'est présentée à l'unité des maladies infectieuses de l'hôpital universitaire Reina Sofia de Córdoba avec malaise, diarrhée, jaunisse, vomissements et fièvre. La patiente était virémique ARN HEV. L'enquête épidémiologique a conclu que (i) les huit membres de la famille étaient également infectés et virémiques, (ii) la famille a été infectée via la consommation de viande de sanglier et cela a été confirmé par la détection d'ARN HEV dans la viande congelée restant recueillie dans le foyer de la famille, (iii) une analyse génétique a montré que les huit membres de la famille et la viande correspondaient à la même souche virale (identité à 100%) appartenant au génotype 3 (Rivero-Juarez *et al.*, 2017). Cette séquence a déjà été décrite chez des sangliers du centre-sud de l'Espagne et des porcs (numéro d'accès GenBank : EU723512).

En France, en 2013, un groupe de 17 cas était associé à la consommation d'un porcelet rôti à la broche lors d'un mariage (Guillois *et al.*, 2016). Douze cas (70%) étaient non symptomatiques, cinq étaient symptomatiques et parmi eux deux avaient été hospitalisés (11,7%). Tous les individus ont guéri par la suite. L'enquête a attribué cette épidémie HEV à la consommation d'une farce à base de foie de porc mal cuite.

Au Royaume-Uni, en 2008, quatre passagers d'un navire de croisière ont présenté une infection par le HEV (Said *et al.*, 2009). En raison de la période d'incubation, la source de l'infection n'a pas été identifiée.

En Italie, en 2011, cinq personnes vivant dans la région du Latium ont été infectées par le HEV (Garbuglia *et al.*, 2013). Bien que la source d'infection n'ait pas été identifiée, la souche responsable appartenait au génotype 4 et était génétiquement proche de souches chinoises ; aucune de ces personnes n'avait d'antécédents de contact ou de consommation de produits chinois. Ces résultats sont conformes à ceux fournis par d'autres études indiquant que le génotype 4 est maintenant présent en Europe.

La République tchèque a également été touchée par deux foyers (Trmal *et al.*, 2012). La première épidémie concernait 13 cas et la source n'a pas été identifiée. Lors du deuxième foyer, un lien entre les cas humains et l'infection chez les porcs de ferme a été révélé pour la première fois.

En Australie, 55 cas d'infection à HEV ont été confirmés, dont 24 personnes qui n'avaient pas voyagé pendant la période d'incubation (Yapa *et al.*, 2016). Parmi eux, 17 avaient mangé dans le même restaurant. L'ARN du HEV détecté appartenait au génotype 3.

En 2016, après la notification des cas d'hépatite E au Centre de santé publique de la ville d'Asahikawa dans une maison de retraite pour personnes âgées à Hokkaido, au Japon, 125 personnes ont été testées pour des marqueurs de l'infection par le HEV et 29 étaient positives. Seuls quatre ont présenté des symptômes. Tous les cas étaient dus à des souches appartenant au génotype 3 (Ishida *et al.*, 2018) et les séquences amplifiées présentaient 99,8 à 100% d'homologie.

Tableau 5 Liste des épidémies HEV rapportées ces dernières années dans les pays industrialisés

Pays	Nombre de personnes	Année	Cause	Virus	Référence
Espagne	8	2015	Consommation viande de sanglier	Génotype 3	(Rivero-Juarez *et al.*, 2017)
Australie	17	2014	Produits à base de porc (restaurant)	Génotype 3	(Yapa *et al.*, 2016)
France	17	2013	Porcelet rôti Mariage	ND	(Guillois *et al.*, 2016)
Italie	5	2011	ND	Génotype 4	(Garbuglia *et al.*, 2013)
République Tchèque	13	ND	ND	ND	(Trmal *et al.*, 2012)
	8		Infection dans un élevage porcin	ND	
Royaume-Unis	4	2008	Alimentation bateau croisière	ND	(Said *et al.*, 2009)
Japon	29	2016	ND	Génotype 3	(Ishida *et al.*, 2018)

ND : Non déterminé

Les marqueurs d'infection au HEV sont détectés de plus en plus fréquemment en population humaine dans les pays industrialisés. De plus, la nature uniquement sporadique ou importée des cas humains dans ces pays n'est plus pertinente ; l'endémicité est maintenant avérée dans ces pays et des régions hyper endémiques existent au moins en France, en Italie et en Pologne. Le nombre de cas confirmés et de cas groupés ont également considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cependant, la vraie raison de cette augmentation n'est pas réellement connue. En effet cela pourrait être dû à une véritable tendance épidémiologique mais également à une sensibilisation accrue au HEV. En outre, il existe clairement un risque professionnel pour les ouvriers forestiers, les agriculteurs et les éleveurs porcins. Outre la voie d'infection liée à la viande de porc, la forte exposition de la population adulte dans les pays industrialisés nécessite des investigations futures pour mieux comprendre comment les personnes s'infectent. Enfin, la grande hétérogénéité observée entre les tests de détection des IgG anti-HEV rend difficile la comparaison des différentes études et la compréhension de l'épidémiologie des HEV. L'établissement d'une méthode de référence dans les études de séroprévalence pourrait remédier à ce problème.

Les différentes voies de transmission du HEV

En raison de la forte séroprévalence du HEV dans les pays industrialisés, de nombreuses questions se posent quant à savoir si la consommation de viande de porc contaminée est la seule source d'infection. Il existe un intérêt croissant autour des voies d'infection alternatives liées à l'environnement et à d'autres animaux. La figure 10 résume les principales voies de transmission décrites ou suspectées dans la littérature.

Transmission zoonotique

La transmission zoonotique est maintenant avérée dans la littérature et apparait comme la voie de transmission la plus fréquemment mise en cause dans les cas d'hépatite E diagnostiqués. La majorité des infections d'origine zoonotique sont d'ailleurs liées au réservoir porcin, que ce soit par contact ou par la voie alimentaire. Cependant, il existe d'autres espèces animales à l'origine d'infections humaines. Ce chapitre se concentre uniquement sur l'association entre cas humains et transmissions zoonotique ainsi que les études prouvant cette voie de transmission zoonotique. L'épidémiologie animale à proprement parlé est abordée dans le chapitre suivant.

En France, une association entre l'infection au HEV et la consommation de la saucisse à base de foie de porc, le *ficatellu*, a été rapportée (Colson *et al.*, 2010 ; Berto *et al.*, 2013 ; Renou *et al.*, 2014). Le *ficatellu* est un produit à base de foie contenant au moins 30% de foie de porc et qui ne subit aucune étape de chauffage pendant la production. Une étude ayant analysé des produits alimentaires en France a montré que 30% des échantillons de *ficatelli* étaient positifs pour la présence d'ARN HEV (Pavio *et al.*, 2014). Aux Pays-Bas, le taux de détection d'ARN était inférieur à celui de la France, avec un taux de détection de 6,4% dans le foie de porc provenant du commerce (Bouwknegt *et al.*, 2007). Les séquences HEV présentaient une homologie de 93% avec celles détectées chez l'Homme aux Pays-Bas et une homologie de 97% avec des séquences précédemment isolées chez le porc. En Allemagne, les saucisses crues et de foie ont également été analysées ; 14 des 70 saucisses crues (20%) et 11 des 50 saucisses au foie (22%) ont été positives. Les souches de HEV détectées appartenaient au génotype 3 (Szabo *et al.*, 2015).

Une étude américaine (Cossaboom *et al.*, 2016) a démontré que la consommation de viande insuffisamment cuite était associée avec des séroprévalences plus élevées concernant les anticorps anti-HEV chez des étudiants. De plus, trois des 128 lots d'échantillons testés en Virginie se sont avérés être positifs à la détection du génome viral (2,3%). En Suisse, le taux

de détection de l'ARN HEV parmi des foies de porc était de 1,3% (Muller *et al.*, 2017). Une autre étude a analysé des produits alimentaires et la détection virale était de 18,9% des saucisses à base de foie et de 5,7% des saucisses crues (Moor *et al.*, 2018).

Comme cité précédemment dans la partie concernant les cas groupés, plusieurs études ont rapporté des sources communes liées à la consommation de viande contaminée, que ce soit en Australie (Yapa *et al.*, 2016), en Espagne (Rivero-Juarez *et al.*, 2017) au Japon (Li *et al.*, 2005) ou bien en France (Guillois *et al.*, 2016). De plus l'analyse phylogénétique des souches retrouvées confirmait la proximité avec des souches d'origine porcine.

D'autres espèces sont également à l'origine de cas humain, avec par exemple le sanglier, les cervidés (Tei *et al.*, 2003), les camélidés (Woo *et al.*, 2014), le lapin (Abravanel *et al.*, 2017) et le rat (HKU Li Ka Shing Faculty of Medicine, 2018 ; Sridhar *et al.*, 2018 ; Andonov *et al.*, 2019). La transmission zoonotique peut également être due à la profession par le contact fréquent avec les animaux, comme décrit dans la partie précédente.

Transmission liée à l'eau

La transmission du HEV par l'eau se produit principalement dans les pays en développement où le traitement des eaux usées pose problème (HEV-1 et HEV-2). Le virus est donc bien résistant dans l'eau et bien que la qualité de l'eau soit généralement bonne dans les pays industrialisés les voies de contamination liées à l'eau ne peuvent pas être totalement exclues.

Eau de consommation

La consommation d'eau en bouteille ou du robinet dans les pays industrialisés n'a quasiment jamais été rapportée comme étant à l'origine de cas d'infections humaines. Cependant, dans la région Auvergne, l'eau du réseau public a causé sept cas d'infections humaines au HEV (Spaccaferri, 2015). De plus, une étude récente en Suède a détecté pour la première fois l'ARN du HEV dans de l'eau de robinet dans un pays industrialisé (Wang *et al.*, 2019). Les souches de HEV présentes dans les eaux de Göteborg appartenaient aux sous-types HEV-3a et HEV 3c/i. Enfin, l'étude de séroprévalence de Mansuy *et al.* 2016 a montré que la consommation d'eau en bouteille était un facteur protecteur vis-à-vis de la détection des IgG.

Malgré les résultats de ces trois études, il semble peu probable que l'eau de consommation apparaisse comme une voie majeure d'infection dans les pays industrialisés. Cependant, la qualité de l'eau reste un point à surveiller notamment dans les zones d'hyper endémie.

Eau d'irrigation

La qualité de l'eau d'irrigation utilisée pour les production de fruits et légumes dans plusieurs pays a été étudiée (Kokkinos *et al.*, 2017b). Les échantillons analysés provenaient de Finlande, de Pologne, de Serbie, de Grèce et de République Tchèque. Deux types d'échantillons ont été analysés, de l'eau d'irrigation mais également des légumes issus des vergers étudiés. De nombreux virus ont été retrouvés et les origines de contaminations étaient soit d'origine humaine soit d'origine porcine. Concernant le HEV, 5% des échantillons testés étaient positifs.

Le HEV a également été retrouvé dans des framboises surgelées (Maunula *et al.*, 2013) et sur des fraises des bois (Brassard *et al.*, 2012). Le génotype retrouvé était le HEV-3 d'origine porcine. L'eau d'irrigation était la source la plus probable de contamination de ces fruits.

Une étude métagénomique de la contamination virale des plants de persil frais en Espagne a démontré la présence de HEV-3f (Fernandez-Cassi *et al.*, 2017). Parmi les échantillons provenant de points de vente de laitue fraîche, la prévalence du HEV était de 3,2% (4/125) (Kokkinos *et al.*, 2012).

En Turquie, une étude a comparé des exploitations utilisant de l'eau traitée (groupe témoin) à celles utilisant de l'eau non traitée (groupe d'essai) pour l'irrigation (Ceylan *et al.*, 2003). La séroprévalence IgG anti-HEV observée chez les personnes travaillant dans les exploitations du groupe test (et leurs familles) était plus élevée (34,8%) que chez les personnes travaillant dans les exploitations du groupe de contrôle (4,4%).

Ces rapports indiquent une voie de contamination possible par les légumes et les fruits irrigués avec de l'eau contaminée ou des aliments contaminés au cours de la chaîne de production alimentaire. En effet, certains fruits et légumes sont consommés crus, ce qui signifie que même s'ils sont bien lavés, le virus pourrait toujours être ingéré par les consommateurs.

Eaux environnementales contaminées et animaux filtreurs

En Italie, une étude a analysé différents types d'échantillons pour le HAV et le HEV (Iaconelli *et al.*, 2015b). L'ARN HEV a été trouvé dans un échantillon d'eaux usées et dans un échantillon d'eau de rivière ; les deux souches étaient du génotype HEV-3 et étaient proches de souches porcines et humaines précédemment isolées. En Slovénie, sur la base des données de séroprévalence obtenues dans une exploitation porcine, 60 échantillons d'eau de surface ont été testés pour déterminer si ils contenaient le virus, parmi eux deux étaient positifs (3,3%); un échantillon positif avait été recueilli à proximité d'une exploitation porcine (Steyer *et al.*, 2011). Au Pays-Bas, 17% des eaux de surface analysées étaient positives à la détection du génome

viral, et cette contamination provenait surement d'eaux usées (Rutjes *et al.*, 2009). Enfin, suite à l'infection d'une personne, l'ARN viral a été détecté dans le sérum du patient mais également dans l'eau de surface recueillie à proximité de la maison du patient (Borgen *et al.*, 2008).

Les eaux de surface sont donc susceptibles d'être contaminées par les animaux et les Hommes infectés par l'excrétion du virus au niveaux des excréments. Elles peuvent donc être considérées comme une voie de transmission supplémentaire pour l'Homme que ce soit de façon directe ou indirecte.

Au Japon, des souches de génotype 3 ont été détectées sur des bivalves collectés dans la rivière (Li *et al.*, 2007). Le taux de détection de l'ARN du HEV dans les organismes filtreurs tels que les mollusques varie de 15% en Espagne (Mesquita *et al.*, 2016) jusqu'à 85% au Royaume-Unis (Crossan *et al.*, 2012). En Espagne, le HEV détecté dans les mollusques était génétiquement étroitement lié aux virus en circulation chez l'homme et le porc. L'infection de l'homme par la consommation de fruits de mer n'a pas été démontrée, mais plusieurs études ont montré que la consommation de mollusques était associée à la détection d'anticorps anti-HEV (Mansuy *et al.*, 2016). Ces animaux filtreurs apparaissent comme une éventuelle voie de transmission alimentaire supplémentaire, mais également comme une sentinelle de la contamination de l'eau de surface.

Bien que la présence du HEV soit incontestable dans l'environnement, les faibles charges virales présentes dans l'eau nécessitent également la réalisation d'études « d'infectiosité » afin de valider ou d'infirmer le rôle de l'eau en tant que vecteur épidémiologique réel.

Transmission liée au risque transfusionnel

Le taux de produits sanguins contaminés par l'ARN HEV s'étend de 1/726 au Pays-Bas (Hogema *et al.*, 2016) à 1/74,131 en Australie (Hoad *et al.*, 2017b). Le Tableau 6 montre les différents taux de contamination des dons sanguins pour le HEV dans les pays industrialisés. La moyenne calculée est de 0,0002 (range, 0,0001–0,0003), i.e., ce qui correspond à un don positif tous les 5 000 dons.

Une étude cas-témoin a rapporté une transmission du HEV par le sang chez des patients transfusés (Khuroo *et al.*, 2004). Des marqueurs d'infection étaient significativement plus présents chez les patients ayant reçu des produits sanguins que sur les témoins. Trois patients transfusés sensibles (séronégatifs pour les IgG anti-HEV) ont été infectés par le HEV, mais aucun chez les contrôles. De plus, des cas d'infections associées au HEV ont été documentés

dans la littérature (Arankalle et Chobe, 2000 ; Mitsui *et al.*, 2004 ; Tamura *et al.*, 2007 ; Matsubayashi *et al.*, 2008 ; Bajpai et Gupta, 2011 ; Hoad *et al.*, 2017a).

Une étude récente a montré que le risque de transmission du HEV aux receveurs de produits sanguins était corrélé aux taux de dons de sang positifs, à la charge virale et au volume de plasma contenu dans le composant sanguin final transfusé (Izopet *et al.*, 2017).

Tableau 6 Tableau récapitulatif des taux de positivité ARN des produits sanguins dans les pays industrialisés

Pays	Taux de positivité ARN sur les produits sanguins	Références
Allemagne	1/1240; 1/4525	(Baylis *et al.*, 2012 ; Vollmer *et al.*, 2012)
Angleterre	1/7040; 1/2848	(Ijaz *et al.*, 2012 ; Hewitt *et al.*, 2014)
Australie	1/14,799; 1/74,131	(Shrestha *et al.*, 2016a)
Autriche	1/8416	(Fischer *et al.*, 2015)
Danemark	1/2231	(Harritshoj *et al.*, 2016)
Ecosse	1/14520	(Cleland *et al.*, 2013)
Espagne	1/3333	(Sauleda *et al.*, 2015)
Etats-Unis	1/9500; 0/51,075; 1/42,674	(Stramer *et al.*, 2016)
France	1/2218; 1/744	(Gallian *et al.*, 2014 ; Gallian *et al.*, 2017)
Irlande	1/4997	(O'Riordan *et al.*, 2016)
Japon	1/8173	(Minagi *et al.*, 2016)
Pays-Bas	1/2700; 1/726	(Slot *et al.*, 2013)
Pologne	1/1266	(Grabarczyk *et al.*, 2018)
Suède	1/7986	(Baylis *et al.*, 2012 ; Kamar *et al.*, 2015a)

Transmission sexuelle

Globalement, il y a très peu de données publiées concernant la transmission sexuelle du HEV, au contraire de l'Hépatite A. Les hommes homosexuels et les personnes étant infectées par le VIH présentent des séroprévalences IgG anti-HEV plus élevées que celles des donneurs de sang ou de la population générale pour une zone donnée (Montella *et al.*, 1994 ; Balayan *et al.*, 1997 ; Christensen *et al.*, 2002 ; Keane *et al.*, 2012 ; Payne *et al.*, 2013 ; Politou *et al.*, 2015). Une étude récente au Pays-Bas a comparé la séroprévalence au sein des personnes à risque au niveau sexuel avec la population générale (Heil *et al.*, 2018). Cette étude n'a pas détecté de différence significative entre ces deux populations, en revanche une séroprévalence plus élevée a été observée dans le groupe des personnes ayant une infection sexuellement transmissible diagnostiquée. Cependant à l'heure actuelle aucune preuve réelle de transmission sexuelle n'a pour l'instant été répertoriée dans la littérature.

Au vu de la transmission sexuelle possible pour certaines hépatites, des études mériteraient d'être menées concernant le HEV afin d'élucider ce point.

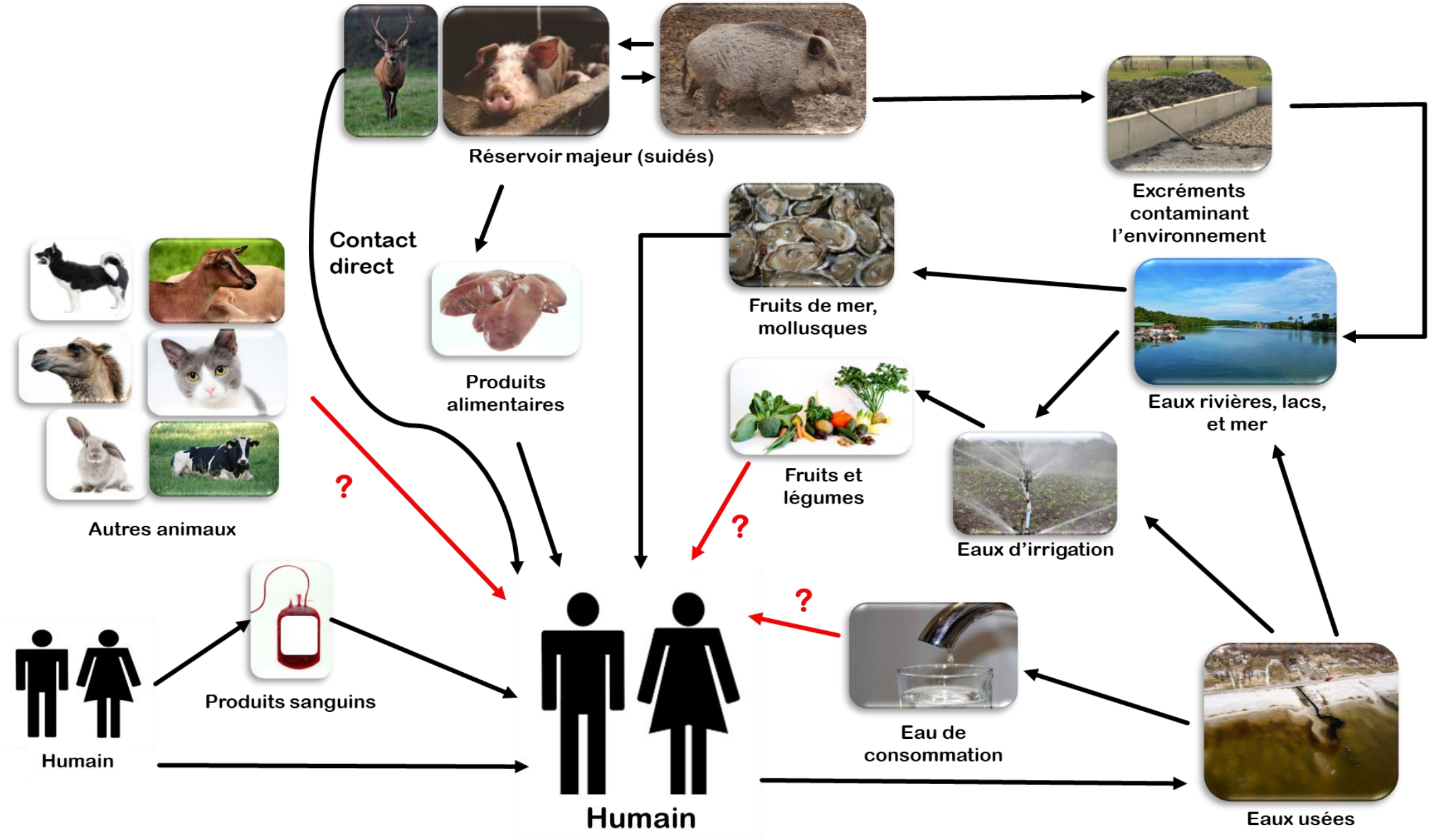
Autres voies de transmission

Très peu d'études ont été réalisées sur la transmission verticale du virus de la mère à l'enfant. Des taux de transmissions élevés ont été rapportés mais ces études ne provenaient uniquement que de l'Inde et causées par le génotype 1 : 33,3% (n=6/18) (Kumar *et al.*, 2004), 46,09% (n=59/128) (Sharma *et al.*, 2017), et 78,9% (n=15/18) (Khuroo *et al.*, 2009). Bien que minoritaire, la voie de transmission verticale ne doit pas être négligée et des recommandations pour la prévention de la femme enceinte doivent être appliquées afin de limiter les risques de transmission et de complications.

Une autre voie de transmission possible pourrait être l'allaitement. En effet, le HEV a été détecté à partir de lait provenant d'une femme de 34 ans infectée par le HEV (Rivero-Juarez *et al.*, 2016). Dans les pays industrialisés, les rares cas d'infections rapportées chez les femmes enceintes (génotype 3) n'ont pas mené à une infection chez le nouveau-né (Shaikh et Nelson-Piercy, 2006 ; Anty *et al.*, 2012 ; Tabatabai *et al.*, 2014 ; Lachish *et al.*, 2015). Cette éventuelle spécificité génotypique mériterait d'être étudiée.

La transmission nosocomiale du HEV semble très rare dans les pays industrialisés. En effet, très peu de cas ont été rapportés par cette voie. Cependant, en France, une transmission d'hépatite E d'un patient à l'autre a été décrite dans un service d'hématologie (Mansuy *et al.*, 2009a). Le cas signalé a été infecté après un contact avec un patient infecté de façon chronique

et non diagnostiqué qui résidait dans la même unité. Le HEV étant très résistant, des mesures d'hygiène importantes doivent être mises en place lorsqu'un cas d'hépatite E se produit dans un service médical et en particulier lorsqu'un patient à risque y réside.



Les flèches noires correspondent aux voies de transmissions confirmées alors que les rouges avec un « ? » correspondent à des voies suspectées

Figure 10 Diagramme récapitulatif des différentes voies de transmissions du HEV dans les pays industrialisés.

3. Epidémiologie de la population animale

Initialement reconnu comme étant un virus infectant spécifiquement l'Homme dans les pays en développement, le HEV est retrouvé depuis la fin du 20ème siècle au sein de nombreuses espèces animales. Les animaux de compagnie, domestiques, sauvages, incluant de nombreuses espèces différentes ont montré des marqueurs d'infection en cours ou passée (ARN et/ou anticorps). La compréhension et la connaissance de l'ensemble des hôtes possibles du HEV est un point majeur pour la détermination des menaces potentielles en santé humaine.

Dans cette partie, une vue globale de l'épidémiologie animale dans les pays industrialisés et la détection des différents marqueurs d'infection au HEV est réalisée. L'hétérogénéité des résultats en fonction des kits utilisés fait que, comme pour les humains, les séroprévalences calculées sont très compliquées à comparer les unes aux autres. Cependant, même sans comparaison possible, la détection « qualitative » du virus ou des anticorps anti-HEV chez d'autres animaux font que ces derniers peuvent être considérés comme de nouveaux réservoirs possibles et/ou d'éventuelles sources de contaminations pour l'Homme.

Le réservoir des suidés

Depuis sa découverte en 1997 (Meng *et al.*, 1997), le HEV porcin est détecté avec des taux de prévalence très élevés à travers le monde et particulièrement dans les pays industrialisés. Le réservoir porcin étant le réservoir majeur (génotype 3 et 4), il est primordial de connaître la situation épidémiologique de ces animaux dans les pays industrialisés. Le réservoir porcin est exclusivement concerné par le genre *Orthohepevirus* A, les génotypes 3 et 4 pour les porcs domestiques et les génotypes 5 et 6 pour les sangliers (Doceul *et al.*, 2016).

Infection des porcs domestiques

L'infection par le HEV est majoritairement asymptomatique chez les porcs (Pavio *et al.*, 2017) et passe donc inaperçue pour les éleveurs ce qui complique sa détection. Il faut donc, soit analyser les anticorps IgG anti-HEV de l'animal dans le sérum pour déterminer son exposition passée au virus, soit détecter l'ARN viral dans le foie, le sang ou les fèces. Le premier marqueur est le témoin d'une infection passée durant la vie du porc alors que l'ARN est un marqueur « d'infection en cours ».

La voie de transmission majeure dans les élevages est féco-orale. De fortes charges virales peuvent être retrouvées dans les fèces et l'urine (Banks *et al.*, 2004 ; Fernandez-Barredo *et al.*, 2006 ; Bouwknegt *et al.*, 2009 ; Salines *et al.*, 2017). Les porcs non immunisés se contaminent dans leur environnement d'élevage et deviennent excréteur du virus par la suite, dans le cas où

ils ne sont pas encore immunisés. Cela forme un cycle d'infection entre porc post-sevrage sensibles, porcs infectés excréteurs et porcs immunisés (Figure 11). La possibilité d'une réinfection lors d'une baisse du système immunitaire n'est pas à exclure (co-infection ou période de gestation ou mise bas). Une perte de protection immunitaire peut également avoir lieu chez les animaux très vieux, en particulier sur les truies (Casas *et al.*, 2011).

Bien que la transmission à l'Homme soit majoritairement liée à la consommation de produits à base de foie, une étude récente a montré qu'en cas de co-infection expérimentale avec le SDRP (syndrome dysgénésique respiratoire porcin), une virémie très longue a été observée et le virus a été détecté dans différents muscles (Salines *et al.*, 2019). Cette présence dans d'autres tissus du porc, bien qu'expérimentale, pourrait donc augmenter la liste des produits à risque. Cependant, si cette voie de transmission existe, elle devrait être minoritaire, comme le montre une étude française ayant analysé un grand nombre de produits carnés et qui n'a détecté aucune présence virale parmi 1034 échantillons de viande (muscles) (Feurer *et al.*, 2018).

Facteurs influençant les taux de détections du virus ou des anticorps

De plus en plus d'études au sein des élevages de porcs domestiques sont réalisées, cependant différents paramètres doivent être pris en compte afin de bien interpréter ces résultats. En outre, la prise en compte de ces facteurs pourraient permettre de diminuer la présence de porcs infectés à l'abattoir et donc de réduire la transmission à l'Homme. Pour cela, les éleveurs pourraient modifier ou adapter leurs pratiques au niveau de l'élevage.

L'âge des porcs et le type d'élevage peuvent influencer fortement les taux de positivité calculés. Une revue de 2017 se basant sur de nombreuses études (n = 69) a établi une cinétique d'infection (Figure 12) et a montré un pic de détection aux alentours de 12 semaines (Salines *et al.*, 2017). Cette cinétique est en adéquation avec des articles ayant montré que le porc était infecté de façon très précoce après la perte des anticorps maternels (Feng *et al.*, 2011). Des séroprévalences plus élevées ont également été observées selon le type d'élevage pratiqué au Pays-Bas (Rutjes *et al.*, 2014). De plus, le type d'élevage fermé semble être moins à risque concernant l'infection des porcs au HEV selon des études française et espagnole (Jori *et al.*, 2016 ; Lopez-Lopez *et al.*, 2018).

Pour les études de séroprévalence, l'hétérogénéité observée entre les kits de détection est également un facteur à prendre en compte (voir paragraphe sur les études de séroprévalences en population humaine Revue 2).

Selon une étude rétrospective, au sein de 90 élevages de l'Ouest de la France, différents facteurs sont apparus comme associés avec la détection du virus dans le foie et la séroprévalence des porcs en âge d'être abattus (Walachowski *et al.*, 2014). Le risque d'avoir des foies positifs au HEV était augmenté par l'abattage précoce, la race du porc, le manque de mesures d'hygiène et l'origine de l'eau d'abreuvement donnée au porc. Concernant la séroprévalence, les taux de détection d'anticorps élevés étaient associés à des pratiques de mélange sur les jeunes porcelets et aux conditions d'hygiène.

Les coinfections avec d'autres virus fréquemment retrouvés chez les porcs (SDRP ou les porcine Circovirus-2) par exemple, pourrait également influencer l'infection des porcs par le HEV (Pavio *et al.*, 2017).

Prévalence ARN HEV et séroprévalence des IgG anti-HEV des porcs domestiques dans les pays industrialisés

Le tableau 7 ci-dessous fait le point sur les principales études de prévalence ARN HEV effectuées sur le réservoir porcin (au niveau d'échantillons de fèces, de sang et de foie). Les taux observés au niveau des fèces vont de 2,50 % en Allemagne (Machnowska *et al.*, 2014) à 87,55% en Finlande (Kantala *et al.*, 2015). Ces taux de détection sont très élevés et montrent que le virus est bien implanté au sein de ces différents pays et sur différents continents. La détection du virus dans le sang (virémie) est effectuée de façon minoritaire dans la littérature au contraire de celle réalisée dans les fèces et le foie (Grierson *et al.*, 2015). La virémie étant plus courte lors d'une infection naturelle, le choix d'autres types d'échantillons peut donc paraître plus judicieux pour l'étude de l'infection des porcs (Pavio *et al.*, 2017).

Le HEV touche la grande majorité des élevages dans les pays industrialisés. Différentes études ont montré cette forte présence du virus avec des prévalences allant de 65% (Rose *et al.*, 2011) à 100% (Ivanova *et al.*, 2015) des élevages ayant au moins un porc séropositif aux IgG anti-HEV. Concernant les séroprévalences à l'échelle de l'animal, de très haut taux de positifs IgG ont également été déterminés. Le tableau 8 fait un récapitulatif des études de séroprévalences récentes dans les pays industrialisés afin de voir l'exposition globale des élevages dans ces pays.

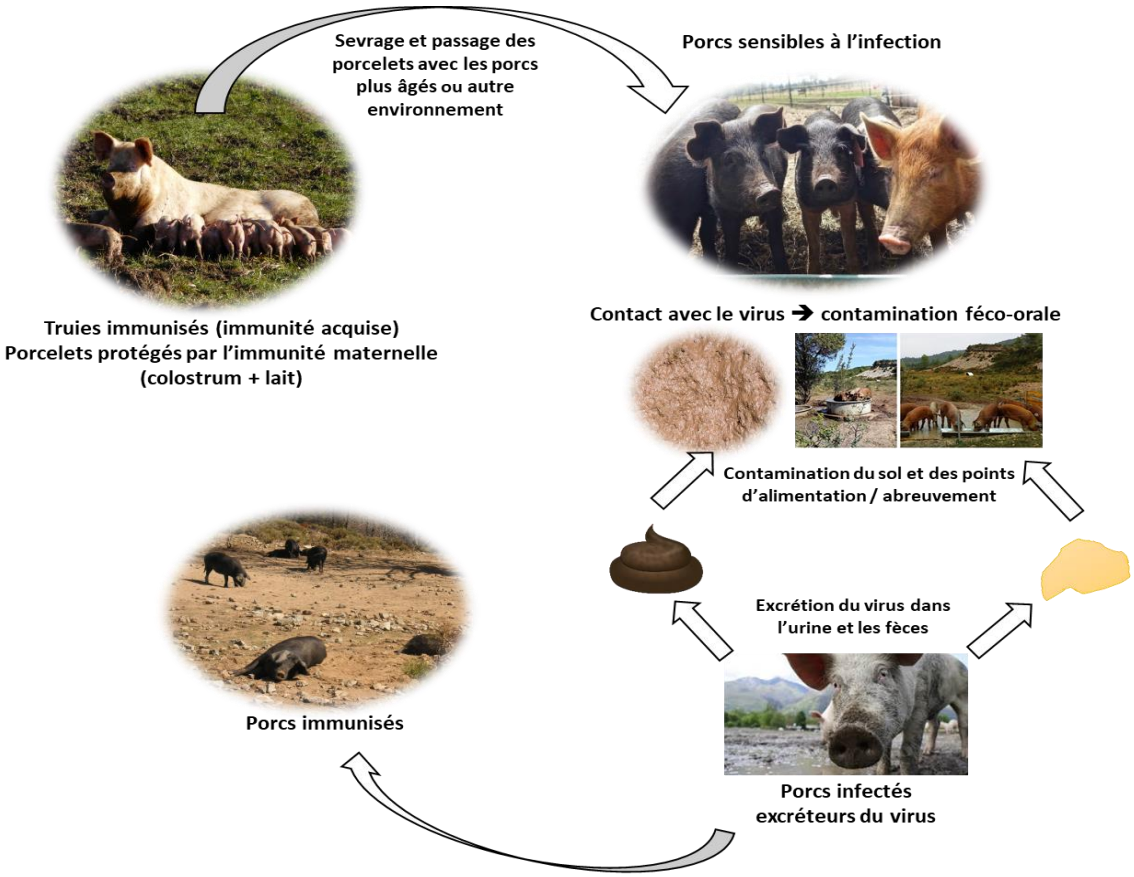


Figure 11 Schéma représentant le cycle d'infection majoritaire des porcs au sein des élevages

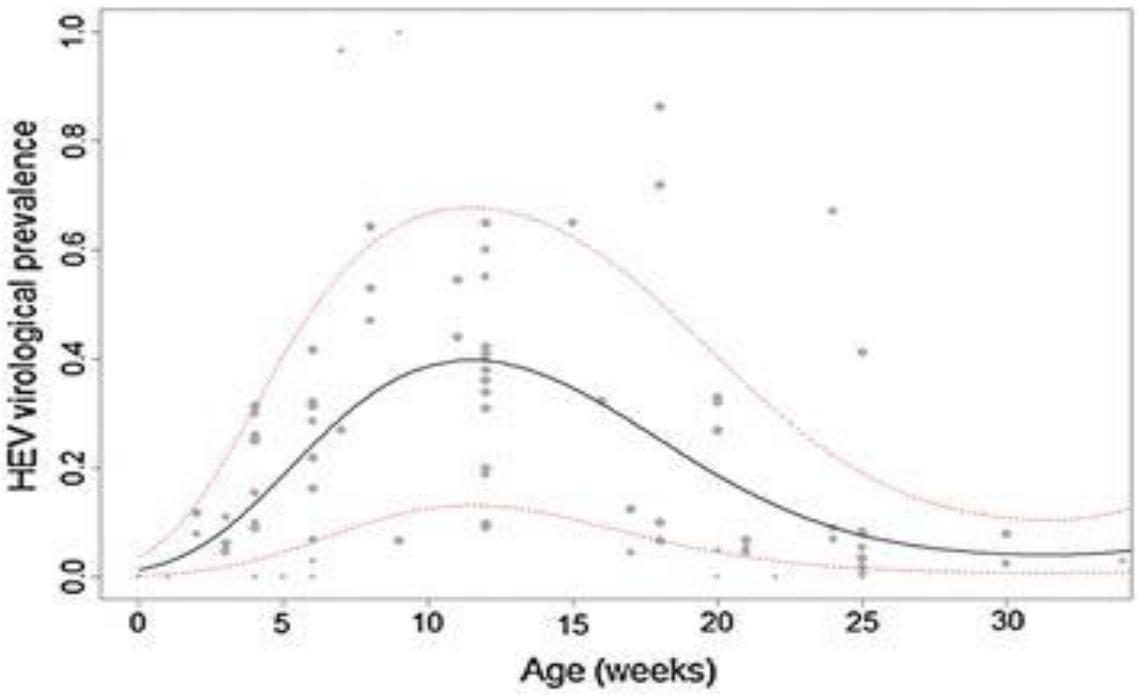


Figure 12 Evolution de la prévalence ARN HEV dans les fèces (ratio de positifs) en fonction de l'âge des porcs (en semaine) (Salines et al., 2017).

Tableau 7 Prévalence de l'ARN HEV au sein du réservoir porcin dans les pays industrialisés

Pays	Type d'échantillon	Positifs	N	Prévalence (%)	Références
Allemagne	Fèces	3	120	2,50	(Machnowska *et al.*, 2014)
Belgique	Fèces	8	115	6,96	(Hakze-van der Honing *et al.*, 2011)
	Sang	4	420	0,95	(Thiry *et al.*, 2014)
Croatie	Sang	8	60	13,33	(Lipej *et al.*, 2013)
	Sang et fèces	216	1419	15,2	(Jemersic *et al.*, 2019)
Danemark	Fèces	48	97	49,48	(Breum *et al.*, 2010)
Ecosse	Sang	72	162	44,44	(Crossan *et al.*, 2015)
Espagne	Sang	64	341	18,77	(Jimenez de Oya *et al.*, 2011)
	Fèces	21	131	16,03	(Fernandez-Barredo *et al.*, 2007)
Estonie	Fèces	103	449	22,94	(Ivanova *et al.*, 2015)
Etats-Unis	Sang	34	96	35,42	(Huang *et al.*, 2002a)
Finlande	Fèces	239	273	87,55	(Kantala *et al.*, 2015)
	Fèces	26	40	65,00	(Kantala *et al.*, 2013)
France	Foies	2	24	8,33	(Jori *et al.*, 2016)
	Livers	128	3715	3,45	(Rose *et al.*, 2011)
Hongrie	Fèces	42	171	24,56	(Reuter *et al.*, 2009b)
	Fèces	52	248	20,97	(Forgach *et al.*, 2010)
Italie	Bile, foie ou fèces	31	48	64,58	(Di Bartolo *et al.*, 2011)
	Fèces	115	274	41,97	(Di Bartolo *et al.*, 2008)
	Fèces	45	242	18,60	(Monini *et al.*, 2015)
	Fèces	40	246	16,26	(Caruso *et al.*, 2017)
	Fèces	16	216	7,41	(Costanzo *et al.*, 2015)
	Fèces	11	150	7,33	(Di Martino *et al.*, 2010)
	Bile	6	95	6,32	(Masia *et al.*, 2009)
	Foie	12	320	3,75	(Caruso *et al.*, 2015)
Israël	Sang	3	141	2,1	(Shirazi *et al.*, 2018)
	Fèces	18	79	22,8	

Japon	Fèces	78	480	16,25	(Sasaki *et al.*, 2018)
	Sang	3	169	1,78	(Sakano *et al.*, 2009)
Lituanie	Sang ou foie	106	470	22,55	(Spancerniene *et al.*, 2018)
Nouvelle-Zélande	Sang	112	183	61,20	(Garkavenko *et al.*, 2001)
Pays-Bas	Fèces	15	101	14,85	(Hakze-van der Honing *et al.*, 2011)
Portugal	Fèces	44	200	22,00	(Berto *et al.*, 2012)
Slovénie	Sang	15	85	17,65	(Steyer *et al.*, 2011)
Suède	Fèces	71	240	29,58	(Widen *et al.*, 2011)
Royaume-Unis	Fèces	43	200	21,50	(McCreary *et al.*, 2008)
	Fèces	93	629	14,79	(Grierson *et al.*, 2015)

Tableau 8 Séroprévalence à l'échelle de l'animal des IgG anti-HEV chez les porcs et sangliers sauvages

Pays	Séroprévalence IgG anti-HEV	Références
Allemagne	42,7–68,6% (porcs) 33% (sangliers)	(Wacheck *et al.*, 2012 ; Denzin et Borgwardt, 2013 ; Dremsek *et al.*, 2013 ; Krumbholz *et al.*, 2013 ; Sommerkorn *et al.*, 2017)
Belgique	34–73% (porcs)	(Thiry *et al.*, 2014 ; Thiry *et al.*, 2017a)
Bulgarie	60,3 % (porcs)	(Tsachev *et al.*, 2019)
Canada	59,4% (porcs)	(Yoo *et al.*, 2001)
Croatie	91,7% (porcs)	(Lipej *et al.*, 2013)
Ecosse	29% (porcs)	(Crossan *et al.*, 2015)
Espagne	98% (porcs)	(Rivero-Juarez *et al.*, 2018)
Estonie	61,6% (porcs)	(Ivanova *et al.*, 2015)
France	32,7% (porcs)	(Rose *et al.*, 2011)
France (Corsica)	26% (sangliers), 43,5% (sangliers croisés) 88% (porcs)	(Pavio *et al.*, 2010 ; Pavio *et al.*, 2014 ; Jori *et al.*, 2016)
Irlande	27% (porcs)	(O'Connor *et al.*, 2015)
Italie	50–93% (porcs) 4.9–10,2% (sangliers)	(Ponterio *et al.*, 2014 ; Caruso *et al.*, 2015 ; Costanzo *et al.*, 2015 ; Martinelli *et al.*, 2015 ; Caruso *et al.*, 2016)
Norvège	90% (porcs)	(Lange *et al.*, 2017)
Pays-Bas	12% (sangliers) 72–89% (porcs)	(Rutjes *et al.*, 2010 ; Rutjes *et al.*, 2014)
Royaume-Unis	92,8% (porcs)	(Grierson *et al.*, 2015)
Suisse	58,1% (porcs) 12,5% (porcs)	(Burri *et al.*, 2014)

Sangliers et cervidés

En comparaison avec les porcs domestiques, les séroprévalences observées chez les sangliers sont plus faibles (études sur des zones géographiques identiques et avec le même kit de détection) (Ivanova *et al.*, 2015 ; Jori *et al.*, 2016 ; Thiry *et al.*, 2017a). En Europe, les séroprévalences observées vont de 4,9% en Italie (Caruso *et al.*, 2015) à 57,4% en Espagne (Kukielka *et al.*, 2016). Comme pour les porcs domestiques une forte hétérogénéité peut exister au sein d'un même pays avec des zones d'hyper endémie. Par exemple, en Italie les séroprévalences varient de moins de 5% dans le Nord-Ouest (Caruso *et al.*, 2015) à 56% dans le centre (Mazzei *et al.*, 2015).

Des sangliers séropositifs ont été retrouvés dans toutes les classes d'âge, même chez des animaux de plus de deux ans (Sonoda *et al.*, 2004 ; Michitaka *et al.*, 2007 ; Martelli *et al.*, 2008 ; Caruso *et al.*, 2015), contrairement aux infections précoces des porcs domestiques. Ces données suggèrent que les sangliers sont moins exposés que les porcs domestiques. Cela semble cohérent car les porcs vivent dans des endroits plus restreints où la concentration du virus devrait être plus élevée que dans les larges espaces de vie des sangliers.

De nombreuses études ont montré la circulation du virus au sein de différentes espèces de cervidés. Les valeurs de séroprévalences rapportées vont de 1% en Belgique (Thiry *et al.*, 2017a) à 62,7% en Espagne (Medrano *et al.*, 2012). Les taux de détection d'ARN HEV dans les prélèvements de cervidés sont compris entre 2% en Allemagne (Neumann *et al.*, 2016) et 21,9% en Hongrie (Forgach *et al.*, 2010). Cependant, les charges virales mesurées au niveau du foie de cervidés infectés étaient inférieures à celles mesurées chez les sangliers (Anheyer-Behmenburg *et al.*, 2017). De plus, la majorité des séroprévalences déterminées sont largement inférieures à celles observées chez les porcs et cela même lorsqu'on compare les espèces au niveau de la même zone géographique (Sonoda *et al.*, 2004 ; Kubankova *et al.*, 2015 ; Kukielka *et al.*, 2016 ; Thiry *et al.*, 2017a).

L'étude des souches retrouvées entre les différentes espèces (sanglier, porcs domestiques et cervidés) ont montré 90 à 98% d'identité. En Corse et Hongrie, des souches provenant de porc domestiques présentaient 97,5% d'identité avec des souches retrouvées chez des sangliers (ORF2) (Reuter *et al.*, 2009b ; Pavio *et al.*, 2016). En Allemagne, une étude de deux génomes complets a montré un pourcentage d'identité de 97-98% entre porcs et sangliers (Schielke *et al.*, 2009). De plus, une étude expérimentale sur des porcelets a prouvé que les porcs étaient sensibles à des souches provenant de sangliers (Thiry *et al.*, 2017b). Cependant Toutes ces données suggèrent l'existence d'échanges entre porcs domestiques et sangliers, la transmission

directe du HEV entre les porcs domestiques et les sangliers en milieu naturel ne sera prouvée que par l'identification de souches identiques (supérieures à 99%) chez les deux espèces (Pavio *et al.*, 2017).

Concernant la connaissance réelle des transmissions entre cervidés et porcs, très peu d'études ont été réalisées et cela repose principalement par l'identification de souches très proches génétiquement (Takahashi *et al.*, 2004 ; Anheyer-Behmenburg *et al.*, 2017).

Un schéma récapitulatif des voies de transmissions entre suidés, cervidés, l'environnement et l'Homme est présenté Figure 13 (Pavio *et al.*, 2017).

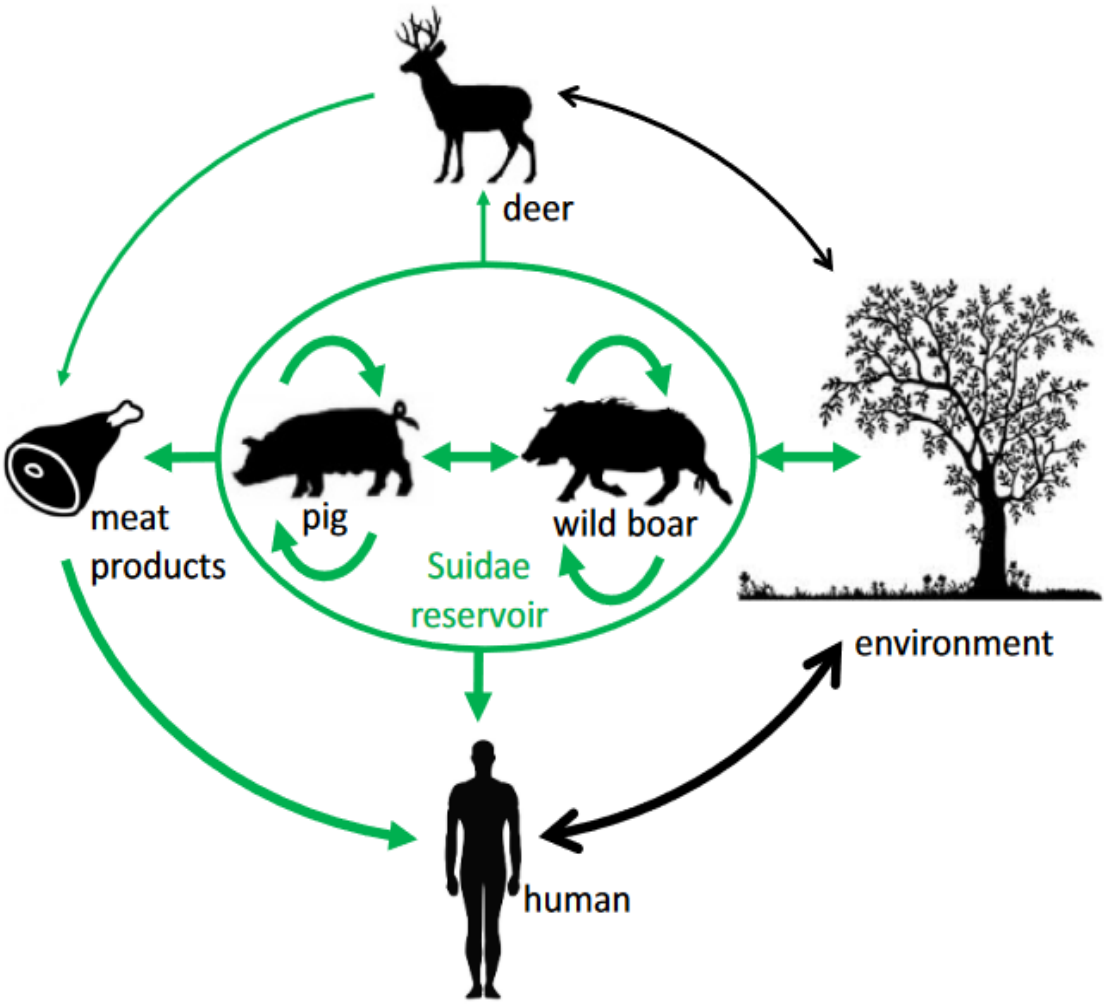


Figure 13 Schéma des voies de transmissions entre suidés, cervidés et l'Homme (Pavio et al., 2017)

Flèche verte : voie de transmission ou d'exposition prouvée ; flèche noire : transmission présumée.

Un spectre d'espèces animales infectées très large

Le tableau 9 ci-dessous présente un récapitulatif des études sur les infections naturelles chez les lapins, les ruminants, les rongeurs, les animaux marins, les oiseaux ainsi que d'autres animaux.

Primates non humain

La première étude expérimentale ayant rapporté une infection sur des primates non humains (PNH), concernait une infection de singes cynomolgus par un HEV de génotype 1 (Bradley *et al.*, 1987). D'autres études expérimentales ont montré que l'infection par le HEV était possible sur différentes espèces de primates : tamarins, macaque rhésus, singe Northern et chimpanzé (Gupta *et al.*, 1990 ; Ticehurst *et al.*, 1992 ; McCaustland *et al.*, 2000). Différentes études ont pu démontrer que les NPH étaient susceptibles d'être infectés par les génotypes 1, 2, 3 et 4 (Tsarev *et al.*, 1994 ; Krawczynski *et al.*, 2011 ; de Carvalho *et al.*, 2013 ; Purcell *et al.*, 2013).

Récemment, plusieurs études ont rapporté des marqueurs d'infections naturels sur des PNH. Une étude a détecté des ARN HEV de génotype 4 sur des singes en captivité provenant du Vietnam (Dogadov *et al.*, 2019). Une étude espagnole a détecté au moins un singe séropositif aux anticorps anti-HEV dans six des huit zoos étudiés (Caballero-Gomez *et al.*, 2019). Cette étude a également calculé une séroprévalence de 4.4% au niveau individuel (8 primates sur 181). Au Cameroun, 15 espèces de PNH ont été étudiées pour la détection des IgG anti-HEV et les séroprévalences allant de 8,7 à 14,3% ont été observées selon les espèces. Concernant les IgM anti-HEV les séroprévalences étaient de 28,6% et 1,5% (Modiyinji *et al.*, 2019).

Des études supplémentaires mériteraient d'être menées afin d'élucider l'impact réel de ces espèces dans l'épidémiologie de l'hépatite E.

Lapins

Les lapins sont également touchés par le HEV, mais ces animaux sont majoritairement concernés par un génotype à part parmi les *Orthohepevirus* A, le génotype 3ra (rabbit). Des études de séroprévalences sur ces animaux ont montré un taux de séropositivité IgG allant de 3,40% en Italie (Di Bartolo *et al.*, 2016) jusqu'à 37,3% en Allemagne (Hammerschmidt *et al.*, 2017). De plus, aux Etats Unis, 16,5% des échantillons de fèces analysés dans les élevages de lapins étaient positifs à la détection de l'ARN HEV (Cossaboom *et al.*, 2011). En France, 7% des échantillons de bile et 23% des échantillons de foies ont été positifs pour la détection du génome viral (Izopet *et al.*, 2012). Dernièrement une étude allemande a également détecté le virus dans 25% des échantillons de sang de lapins (18/72) (Ryll *et al.*, 2018).

Des séquences HEV de 919 échantillons provenant de patients infectés entre 2015 et 2016 ont été analysées par le CNR en France. Parmi eux, cinq l'ont été avec une souche du HEV provenant de lapins (Abravanel *et al.*, 2017). Cependant ces patients n'ont pas eu de contact direct avec ces animaux, ce qui suggère donc une infection par la consommation de viande ou d'eau contaminée (Abravanel *et al.*, 2017). Les séquences du HEV provenant de cas humains sont très proches de celles du HEV du lapin (Izopet *et al.*, 2012) et le HEV des lapins peut se répliquer efficacement dans les cellules humaines.

Le contact avec des lapins infectés, la consommation de viande de lapin insuffisamment cuite ou l'ingestion d'eau contaminée par le HEV du lapin peuvent donc représenter une réelle voie d'infection chez l'Homme.

Animaux marins

Les eaux côtières peuvent être contaminées par les eaux usées humaines, les eaux de fleuves contaminées se jetant dans la mer et ainsi infecter indirectement les animaux marins. Comme les mollusques sont des animaux filtreurs, il est possible de détecter le HEV en quantité importante parmi ces animaux lorsqu'ils sont dans un milieu contaminé. Des études ont analysé des échantillons de fruits de mer et des taux de positivité ARN de 2,9% (Ecosse) (O'Hara *et al.*, 2018) à 85% en Ecosse (Crossan *et al.*, 2012) ont été détectés. De plus, le génotype HEV-3 a été détecté dans 2 des 32 pools d'échantillons de bivalves achetés dans le commerce et provenant de rivières japonaises (Li *et al.*, 2007).

Des études menées en Espagne et en Ecosse ont effectué l'analyse phylogénétique de séquences retrouvées dans les fruits de mer et elles appartenaient au génotype 3 et étaient similaires aux souches humaines et porcines (Mesquita *et al.*, 2016 ; O'Hara *et al.*, 2018). Bien que l'infection humaine par la consommation de fruits de mer n'ait pas été démontrée directement, ces études indiquent que les mollusques peuvent constituer une voie potentielle pour la transmission du HEV aux humains. En effet, l'étude écossaise a été réalisée avec des échantillons de mollusques et de crustacés (n = 310) achetés auprès de supermarchés locaux (O'Hara *et al.*, 2018). En outre, une analyse de questionnaire chez les donneurs de sang français a montré que la consommation d'huîtres était liée à la détection d'IgG anti-HEV (Mansuy *et al.*, 2016).

Dans une étude menée à Cuba, les sérums et le foie de dauphins ont été testés pour détecter la présence d'ARN du HEV par RT-PCR (Montalvo Villalba *et al.*, 2017). La séroprévalence IgG anti-HEV globale était de 32,2% (10 sur 31), et 16,1% (5 sur 31) de ces dauphins ont été positifs à la fois lors des tests sérologiques et pour la détection de l'ARN HEV.

Ces différentes études confirment ainsi que le virus peut infecter un spectre d'animaux très large à partir de sa présence et de sa viabilité dans l'eau.

Rongeurs

Les rongeurs sont connus pour être des vecteurs de maladies, responsables des transferts de pathogènes entre les espèces animales et des animaux aux humains. L'hépatite E ne semble pas être une exception. En effet, la séroprévalence aux anticorps spécifiques du HEV varie de 2,1% en Inde (Arankalle *et al.*, 2001) à 81% aux États-Unis (Purcell *et al.*, 2011). Bien que le HEV chez les rats ait été détecté dans le monde entier, la détection du génotype 3 chez les rongeurs n'a pas souvent été signalée, aux États-Unis (Lack *et al.*, 2012) et au Japon (Kanai *et al.*, 2012). De plus, une souche du génotype 3 de lapins a été détectée chez un rat (*Rattus Norvegicus*) en Belgique (Ryll *et al.*, 2017). Récemment, aux Royaume-Uni une étude sur des rats (*Rattus Norvegicus*) piégés dans des élevages porcins a montré une positivité de 13% pour la détection de l'ARN HEV au niveau des foies (Murphy *et al.*, 2019). L'analyse de séquence a montré que tous les amplicons PCR appartenaient au genre *Orthohepevirus C*, génotype C1 (HEV rat). Auparavant, l'ARN du HEV Génotype 3 a été détecté dans le contenu intestinal de souris provenant d'un élevage porcin. Cette présence au niveau intestinal uniquement a été interprétée comme une ingestion du virus et non comme une infection (car non présent dans leur foie) (Grierson *et al.*, 2018).

Ruminants

Différentes études ont également été menées chez d'autres animaux domestiques fréquemment élevés par l'Homme, les ruminants.

Une étude italienne menée en 2016 (Di Martino *et al.*, 2016) a mis en évidence le génome viral du HEV dans cinq des six fermes d'élevage de chèvres (83,3%) et 9,2% des chèvres étaient séropositives. Des chèvres de Virginie (USA) avaient un taux de positivité aux IgG anti-HEV de 16% (n = 13/80) (Sanford *et al.*, 2013) contre 9,4% en Egypte (El-Tras *et al.*, 2013). Une autre étude réalisée en Chine (Long *et al.*, 2017b) a révélé une forte prévalence de l'infection par le HEV chez les chèvres, la séquence du virus isolé appartenait au génotype 4 (sous-type 4h), très similaire aux séquences humaines et porcines détectées dans la même zone.

Les moutons ont également été étudiés concernant la détection de marqueurs d'infection, Récemment, une étude italienne a montré une forte présence du HEV dans différents élevages de moutons (6/7) et une séroprévalence de 21,3% sur les 192 animaux prélevés (Sarchese *et al.*, 2019). En Egypte ces animaux présentaient une séroprévalence de 4,4% (El-Tras *et al.*, 2013).

Les vaches et les chameaux ont également montré des marqueurs d'infections avec des taux de séroprévalence allant de 1,42% en Amérique Latine (Vitral *et al.*, 2005) à 22% en Egypte et en Ethiopie (El-Tras *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2017) et jusqu'à 68% des chameaux étudiés en Israël (Bassal *et al.*, 2019). Comme dit précédemment, les génotypes concernant les chameaux sont les génotypes 7 et 8.

Différentes études récentes ont détecté de l'ARN viral dans le lait provenant de ces différents animaux (vaches, moutons, chèvres, chameaux, etc.) (Huang *et al.*, 2016 ; Rivero-Juarez *et al.*, 2016 ; Long *et al.*, 2017a ; Demirci *et al.*, 2019). Parmi ces études, certaines ont prouvé que le virus retrouvé dans le lait était infectieux et que l'excrétion du virus dans le lait était confirmé durant la phase d'infection aigue.

Bien que certaines de ces études aient été menées en dehors des pays industrialisés, les marqueurs d'infection au HEV ont été retrouvés chez les ruminants et témoignent d'une circulation du virus chez ces animaux. Les ruminants pourraient donc constituer une nouvelle voie possible de contamination pour l'Homme.

Poulets et oiseaux

Le HEV aviaire a été découvert pour la première fois aux États-Unis, sur des poulets atteints du syndrome d'hépatite-splénomégalie (Haqshenas *et al.*, 2001). Ce virus appartient au genre des *Orthohepevirus B*. Le HEV aviaire présente trois génotypes différents : le génotype 1 (Australie), le génotype 2 (États-Unis) et le génotype 3 (Europe) (Bilic *et al.*, 2009). La première détection génétiquement caractérisée du virus en Europe a eu lieu en Espagne (Peralta *et al.*, 2009).

Aux États-Unis, 17% des jeunes poulets et 36% des adultes testés étaient séropositifs pour le HEV anti-aviaire et 81% des échantillons de bile étaient positifs pour l'ARN du HEV aviaire (Huang *et al.*, 2002b). En outre, sept fermes américaines ont été étudiées (Gerber *et al.*, 2015), la prévalence globale du HEV anti-aviaire dans le sérum de poulet était de 44,8%. Les échantillons de fèces ont été testés pour l'ARN du HEV aviaire et le taux de détection positive était de 62,9%. Une étude récente a décrit deux génotypes de HEV aviaire différents (1 et 2) chez des oiseaux sauvages autrichiens (Zhang et al., 2017). La présence du génotype 2 du HEV aviaire en Corée et du génotype 4 du HEV aviaire en Hongrie indique que des génotypes de HEV aviaire sont présents dans des zones non suspectées jusqu'à présent (Moon *et al.*, 2016). Cette tendance a été également observée en Pologne, où 27.2% des échantillons testés étaient positifs à la détection du HEV aviaire (Matczuk *et al.*, 2019). L'intégralité de ces échantillons

appartenait au génotype 2. De plus cette étude a estimé une séroprévalence IgG de 56,1% sur les poulets.

Les équidés

Très peu d'études ont été réalisées chez les équidés concernant la détection des marqueurs d'infection au HEV. Cependant les animaux d'élevage équins semblent également exposés au virus. En effet, une étude récente en Espagne a montré des taux de virémie de 0,4% chez les chevaux (3/692), de 1,2% chez les ânes (1/86) et de 3,6% chez les mulets (3/83) (Garcia-Bocanegra *et al.*, 2019). La souche séquencée appartient au génotype 3 et est proche des souches porcines et humaines retrouvées en France et en Espagne. De plus, des études sérologiques et moléculaires plus anciennes ont démontré la présence du virus chez les équidés en Asie et en Afrique (Saad *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008). Une transmission à la population humaine n'a pas été démontrée mais une étude de séroprévalence danoise a déterminé que le contact avec les chevaux était un facteur de risque (Christensen *et al.*, 2008).

Animaux de compagnie et autres animaux

Des études ont également trouvé des marqueurs d'infection au HEV chez les animaux domestiques tels que les chats et les chiens. Les taux de séropositivité aux anticorps anti-HEV chez les chiens étaient compris entre 0,8% au Royaume-Uni (McElroy *et al.*, 2015) et 56,6% en Allemagne (Dahnert *et al.*, 2018), incluant des détections en Chine, au Brésil et en Inde. Concernant les chats, les séroprévalences aux anticorps observées étaient de 33% au Japon et 32,3% en Allemagne (Okamoto *et al.*, 2004 ; Dahnert *et al.*, 2018).

Les furets (*Orthohepevirus* C2) (Raj *et al.*, 2012), les chauves-souris (*Orthohepevirus* D) (Drexler *et al.*, 2012), les ratons laveurs (Dahnert *et al.*, 2018) et les mangoustes (Nakamura *et al.*, 2006) (*Orthohepevirus* C2) ont également présentés des marqueurs d'infection pour le HEV.

Bien que certaines études aient été menées dans des pays non industrialisés, il est possible que des espèces pouvant être en contact avec l'homme soient des réservoirs et donc une source potentielle d'infection par le HEV. Le risque peut être plus élevé dans les zones rurales où les animaux peuvent être en contact avec les principaux réservoirs tels que les porcs.

La transmission du HEV par le lait pourrait être présente dans les pays industrialisés, notamment avec la consommation de produits artisanaux non traités à haute température. La plupart des produits laitiers commerciaux sont traités par pasteurisation ou à très haute température. Cependant, les produits artisanaux, au lait cru ou consommés directement par les familles des agriculteurs peuvent ne pas subir de traitement thermique et donc représenter une source possible d'infection. Cette voie de transmission ne semble pas plausible à grande échelle dans les pays industrialisés mais reste quand même à prendre en compte. Les élevages mixtes où des porcs et des animaux laitiers sont élevés ensemble pourraient notamment être à risque.

De nombreuses questions se posent quant aux transmissions possibles entre les réservoirs animaux et la population humaine. En outre, le HEV est de plus en plus considéré comme un virus environnemental et a été retrouvé dans les eaux d'environnement, les organismes filtreurs et l'eau d'irrigation (voir partie introduction épidémiologie animale). Bien que la transmission du virus par la consommation de viande de porc infectée soit prouvée et majoritaire, d'autres voies de transmission secondaires doivent être explorées afin de mieux comprendre l'épidémiologie du virus de l'hépatite E.

Tableau 9 Marqueurs d'infection au HEV au sein d'autres espèces animales

Animaux	Taux de séroprévalence des anticorps (IgG)	Taux de détection ARN HEV	Pays affectés	Références
PNH	4,4-14,3%	9%	Espagne, Vietnam, Russie, Cameroun	(Caballero-Gomez *et al.*, 2019 ; Dogadov *et al.*, 2019 ; Modiyinji *et al.*, 2019)
Cervidés	1–62,7%	2–21,9%	Allemagne, Belgique, Canada, Espagne, Hongrie, Italie, Japon, Lituanie, Pays-Bas	(Sonoda *et al.*, 2004 ; Boadella *et al.*, 2010 ; Forgach *et al.*, 2010 ; Rutjes *et al.*, 2010 ; Medrano *et al.*, 2012 ; Neumann *et al.*, 2016 ; Anheyer-Behmenburg *et al.*, 2017 ; Di Bartolo *et al.*, 2017 ; Thiry *et al.*, 2017a ; Weger *et al.*, 2017 ; Spancerniene *et al.*, 2018)
Lapins	3,40–37,3%	7–25%	France, Allemagne, Italie, Etats-Unis	(Cossaboom *et al.*, 2011 ; Izopet *et al.*, 2012 ; Di Bartolo *et al.*, 2016 ; Eiden *et al.*, 2016 ; Abravanel *et al.*, 2017 ; Hammerschmidt *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2017 ; Ryll *et al.*, 2018)
Animaux marins	32,2%	14–85%	Royaume-Unis, Espagne, Japon, Cuba, Ecosse	(Li *et al.*, 2007 ; Crossan *et al.*, 2012 ; Mesquita *et al.*, 2016 ; Montalvo Villalba *et al.*, 2017 ; O'Hara *et al.*, 2018)
Rongeurs	2,1–80%	7,8%	Belgique, Etats-Unis, Japon et Royaume-Unis	(Favorov *et al.*, 2000 ; Arankalle *et al.*, 2001 ; Hirano *et al.*, 2003 ; Purcell *et al.*, 2011 ; Lack *et al.*, 2012 ; Murphy *et al.*, 2019)
Ruminants	83,3-100% (élevage) 9,2-68,6% (animaux)	0–22%	Brésil, Chine, Italie, Israël, Egypte et Ethiopie	(El-Tras *et al.*, 2013 ; Sanford *et al.*, 2013 ; Di Martino *et al.*, 2016 ; Huang *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2017 ; Long *et al.*, 2017b ; Bassal *et al.*, 2019 ; Sarchese *et al.*, 2019)
Poulets et autres oiseaux	17–56,1%	1,2–80%	Autriche, Espagne, Hongrie, Pologne et Etats-Unis	(Huang *et al.*, 2002b ; Peralta *et al.*, 2009 ; Gerber *et al.*, 2015 ; Reuter *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Matczuk *et al.*, 2019)
Equidés	13-16,3%	0,4-4%	Espagne, Egypte et Chine	(Saad *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Garcia-Bocanegra *et al.*, 2019)
Autres animaux	0,8–56,6%	–	Brésil, Chine, Inde, Allemagne, Japon, Pays-Bas et Royaume-Unis	(Arankalle *et al.*, 2001 ; Okamoto *et al.*, 2004 ; Vitral *et al.*, 2005 ; Liang *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2016 ; Zeng *et al.*, 2017 ; Dahnert *et al.*, 2018)

4. Une situation spécifique en Corse

La connaissance du contexte local est un point majeur dans la compréhension de l'épidémiologie du HEV. En effet, de nombreuses études de séroprévalences ont pu montrer une très forte hétérogénéité au sein d'un même pays, montrant ainsi l'importance des spécificités régionales ou micro-régionales sur l'exposition au HEV. Il a donc été nécessaire, dans le cadre de ce travail de thèse, de déterminer quels étaient les particularités, les facteurs culturels, culinaires, environnementaux de la Corse pouvant expliquer les séroprévalences élevées de l'île.

La Corse

La Corse est une région française métropolitaine située en Méditerranée à proximité de la France continentale (180 km de la Côte d'Azur) et de l'Italie (80 km de la Toscane et 15km de la Sardaigne) (Figure 14). La région compte environ 337 000 habitants (INSEE, 2019), et possède une superficie de 8 679,8 km2 et une densité de population d'environ 39 habitants par kilomètre carré. Cette faible densité en fait la région la moins dense de France. Plus de la moitié de la population régionale vit dans et autour des agglomérations de Bastia et Ajaccio qui sont les deux villes majeures de l'île. Et à l'inverse l'intérieur des terres (souvent en zone de montagne) est particulièrement peu dense. La Corse est extrêmement montagneuse, avec plus de 100 sommets de plus de 2000 mètres. Le point culminant est le Monte Cinto (2706 mètres) et l'altitude moyenne est de 539 mètres. Le relief, le type de végétation, la faune, la densité de population ainsi que le climat varient énormément d'une microrégion à l'autre. Deux climats bien distincts sont présents sur l'île avec d'une part le climat Méditerranéen et d'autre part le climat montagnard.

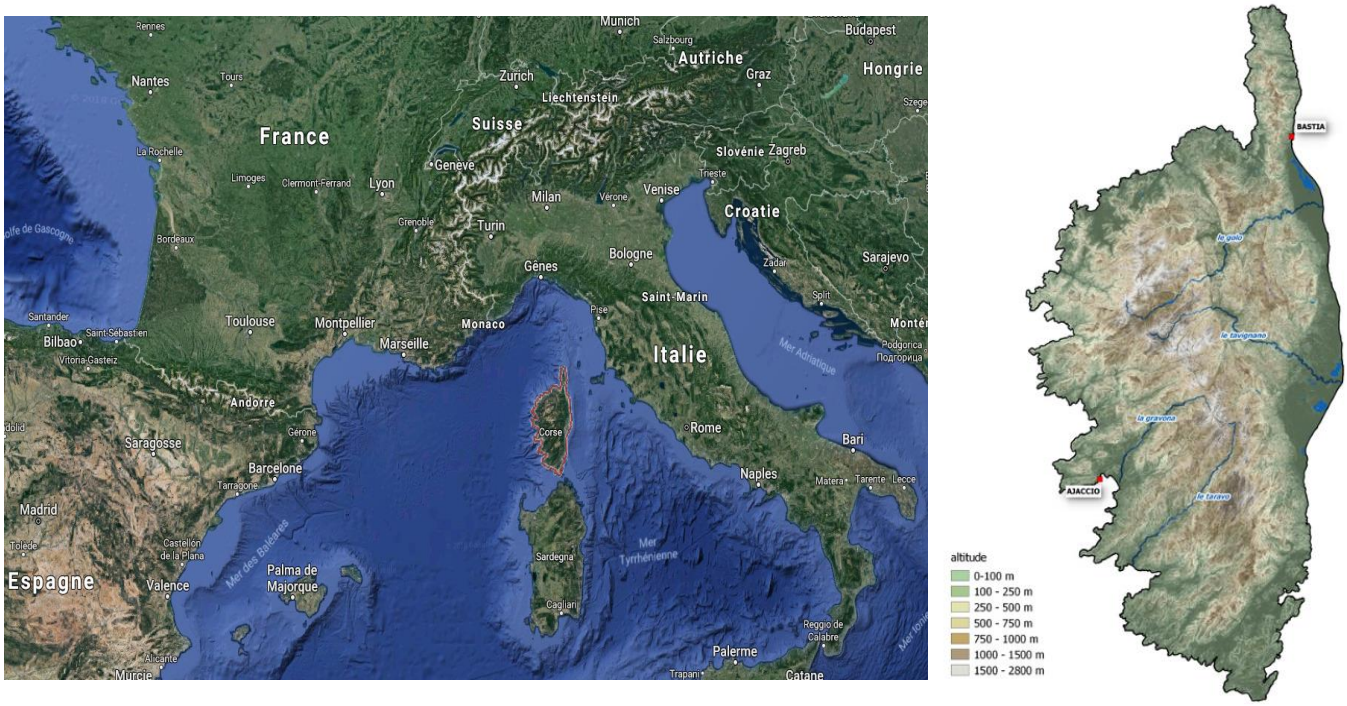


Figure 14 Localisation de la Corse, île de la Méditerranée (vue satellite) (GoogleMap, 2019) et carte avec altitude (DRAAF., 2017)

L'insularité et la position de cette région au milieu de la Méditerranée en font une zone particulièrement intéressante à étudier d'un point de vue épidémiologique et des maladies infectieuses. De plus, le tourisme estival fait passer la population Corse de 337 000 à plus de 700 000 habitants durant le pic estival. La Corse a accueilli au total plus de 8 millions de touristes sur l'année 2017 (INSEE, 2018). Ce flux de voyageurs peut avoir des impacts majeurs concernant l'importation de pathogènes. Le climat peut également être propice à la survie de différents vecteurs hématophages comme les tiques et les moustiques par exemple.

Concernant le virus de l'hépatite E, tout comme le Sud de la France, la Corse apparait comme une zone hyper-endémique au niveau européen. Cette forte exposition de la population humaine et animale au virus peut s'expliquer par différents points que ce soit par son type d'élevage porcin particulier, son environnement et ses pratiques de consommation et culturelles à risque. Cette hyper endémicité a été déterminée grâce à une étude de séroprévalence nationale de 2016 faite sur plus de 10 000 dons de sang (détection des IgG anti-HEV) (Mansuy *et al.*, 2016) (Figure 15). D'autres indicateurs de la forte présence du virus en Corse ont également été mis en avant au niveau clinique. En effet, le taux d'hospitalisation annuel pour 100 000 habitants en Corse était de 0,6 et le nombre de tests anticorps anti-HEV remboursés a augmenté

particulièrement en Corse entre 2010 et 2014 (passant de moins de 50 à plus de 200) (Couturier *et al.*, 2018). Bien qu'une augmentation globale au niveau national soit observée que ce soit au niveau du nombre de personne testées, du nombre de cas diagnostiqués, des taux d'hospitalisations, etc. la Corse figure pour chacun de ses indicateurs dans les régions les plus touchées avec la région PACA et Occitanie.

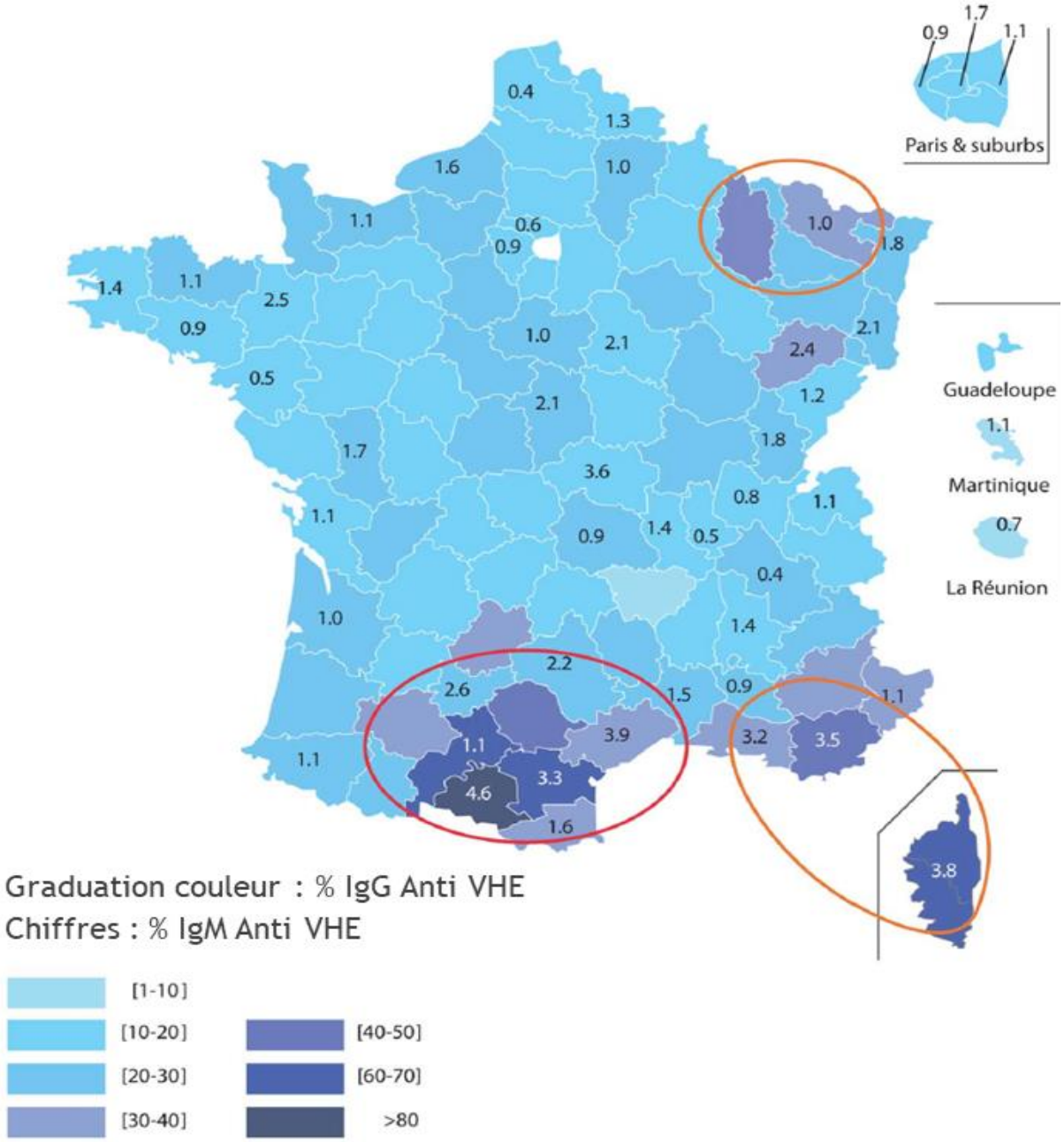


Figure 15 Carte de séroprévalence IgG et IgM anti-HEV (Mansuy et al., 2016)

L'élevage en Corse

L'élevage des principaux animaux domestiques en Corse (ovins, caprins, bovins et porcins) est majoritairement de type extensif et se distingue fortement des élevages intensifs de France

continentale et d'Europe. Ce type d'élevage est en plein-air et repose sur l'utilisation d'un territoire montagnard par des espèces domestiques locales particulièrement bien adaptées au milieu méditerranéen et montagnard. En 2017, dans un bilan de campagne 2016, la chambre d'agriculture de Corse a publié différents chiffres clés sur l'élevage en Corse (Direction régionale de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt de Corse., 2017). Plus de 66 000 bovins, 44 000 caprins, 113 000 ovins et 54 000 porcins étaient élevés en Corse. L'élevage porcin est en augmentation depuis 2013 que ce soit pour le nombre de détenteurs de porcs (368 en 2013 vs 442 en 2016) ou du cheptel (49 000 en 2013 vs 54 000 en 2016). Les parcours libres, quels que soient les animaux élevés, représente une particularité importante en Corse mais qui induit une interaction avec l'environnement et donc avec les animaux sauvages potentiellement élevée. C'est d'ailleurs le cas du porc et du sanglier qui peuvent échanger de nombreuses pathogènes entre eux (HEV, virus Aujesky's, Trichinellose, etc.) (Charrier *et al.*, 2018). Cette interaction est également illustrée par des accouplements donnant naissance à des hybrides pouvant être retrouvés dans la nature ou même dans les élevages (Jori *et al.*, 2016).

Un type d'élevage traditionnel porcin particulier

Le porc est un animal ancré dans la culture Corse. En effet, historiquement durant les périodes rurales traditionnelles la majorité des familles de l'île possédait un porc de basse-cour appelé « *u mannarinnu* ». Ce terme désigne le porc récupérateur des déchets familiaux, comme les déchets de cuisine ou autres aliments assimilables. U mannarinnu est inclus dans l'économie quotidienne jusqu'à un abattage en Décembre (traditionnellement pour la Santa Lucia 13 décembre). Une fois abattu, le porc est transformé en produit de salaison pour être consommé durant les mois qui suivent ou même l'année suivante selon les temps d'affinage. Cet apport de protéines et de graisse animale représente une ressource majeure pour ces populations rurales de moyenne montagne. Bien que cette pratique fut très répandue à l'époque cela ne faisait pas de ces familles des éleveurs de porcs. Les familles achetaient un porc sevré aux éleveurs, « *i purcaghji* », aux alentours du mois de mars (*u marzulinu*) (Casabianca. F, 2004).

Ces pratiques rurales familiales ont disparu de nos jours et seuls les éleveurs porcins ont subsisté. Le *purcaghju* élève traditionnellement les porcs corses selon des pratiques bien spécifiques. C'est un éleveur-transformateur fermier. Les troupeaux comptent en général une centaine de bêtes comprenant des truies, des porcelets et des porcs en croissance d'âges différents. Les animaux sont élevés en extensif, en utilisant les ressources naturelles d'un *rughjonu* qui correspond à une portion de terre pastorale (Bigot. M, 1887). Les porcelets restent

en général avec leur mère jusqu'à environ 2 mois. Puis une fois le sevrage effectué, les jeunes porcs rejoignent les autres porcs et ils transhumeront ainsi de mai à septembre en montagne, où ils trouveront de la nourriture et des conditions de vie favorables durant la période chaude de l'année. L'alimentation majeure lors de ces transhumances sont les glands et les châtaignes qui donnent un goût et un gras particulier à la viande. Le porc mange également les plantes, les racines qu'il trouve, c'est un animal omnivore. L'éleveur peut également compléter l'alimentation des porcs lorsque les ressources naturelles ne suffisent pas (orge, céréales, autres). Ces pratiques extensives, plein-air, sont assez spécifiques en France, en opposition avec la majorité des élevages continentaux intensifs et fermés. Cependant, l'utilisation des ressources de l'environnement sur de grands espaces avec des races locales est une pratique méditerranéenne traditionnellement présente dans d'autres pays Européens tels que l'Espagne (De Pedro. E, 1987), le Portugal (Tirapicos Nunes. JL, 1993) et l'Italie (Franci. O *et al.*, 2000). La finition des porcs durant la période automnale est une étape cruciale avant la période d'abattage commençant mi-décembre. Les porcs sont finis sous châtaigneraies et chênaies, puis une fois engraissés, ils sont récupérés et préparés par lots d'abattage.

L'autre particularité des éleveurs porcins traditionnels corses est qu'ils conduisent leurs élevages, gèrent leur troupeau et le territoire pastoral associé, abattent leurs porcs, transforment leurs produits et les commercialisent. Cette organisation d'élevage lui a value le nom « d'homme filière » (Casabianca. F, 1994). Le *purcaghju* cumule donc les fonctions de sélectionneur, naisseur, engraisseur, abatteur, charcutier et vendeur. Cette « multifonction » est également retrouvée en Sardaigne et en Sicile. Malgré un type d'élevage extensif ouvert sur l'environnement, les porcs se montrent assez familiers et le lien « homme-animal » est assez fort dans ce type d'élevage.

Il existe trois types d'élevage actuellement en Corse :

- Premièrement l'élevage extensif qui correspond à l'élevage traditionnel décrit ci-dessus, puis l'élevage semi-extensif et enfin les élevages fermés.
- L'élevage semi-extensif est à la croisée des chemins entre l'élevage extensif et l'élevage fermé. En effet, dans ces élevages, l'éleveur possède une parcelle de terre assez grande, avec des enclos plein-air où il garde les porcs en fonction des types d'animaux (truies, verrats, porcs en croissance, porcs de finition etc.). Les truies sont élevées à part et sont mises en contact avec les verrats durant les périodes d'accouplement. Lors des gestations (3 mois, 3 semaines et 3 jours), les truies sont souvent dans des box

individuels et y restent avec leurs porcelets de la mise bas jusqu'au sevrage (2 mois après environ). Les jeunes porcs rejoignent ensuite un enclos où des porcs plus âgés sont présents. Bien que les terrains soient généralement assez grands, les point d'alimentation et d'abreuvement sont partagés par tous les animaux du groupe. Les porcs grandissent sur ces parcelles jusqu'à ce qu'ils aient pris suffisamment de poids (80 à 120kg) et atteignent l'âge d'abattage (principalement aux alentours de 14 à 18 mois).

- Enfin, quelques élevages fermés, bien que minoritaires existent en Corse. L'élevage est couvert avec de nombreux box qui séparent les porcs en fonction de l'âge, les truies séparées, les verrats, les porcs en croissance etc. Dans ces élevages les porcs sont souvent de races continentales (Large White, Duroc, etc.) et la prise de masse y est beaucoup plus rapide, que ce soit du fait de la race elle-même ou de la configuration de l'élevage. Cela implique donc un âge d'abattage beaucoup plus précoce (6 à 8 mois). Dans ces élevages, un porc n'est élevé généralement qu'avec des porcs de son âge (différentes portées de la même période).

Le marché de la charcuterie et la problématique des matières importées

Dans un plan de relance de la filière porcine en 2006, l'Assemblée de Corse a dressé un bilan sur le marché de la charcuterie (Assemblée de Corse, 2006). Bien que ce rapport date d'il y a déjà quelques années, le type de produits et la problématique de l'offre et de la demande est toujours d'actualité.

La filière porcine traditionnelle telle qu'elle existe aujourd'hui ne peut pas répondre à la demande du marché en charcuterie. En effet, seulement 10% des produits de charcuterie corses sont issus de cette filière. Pour ce qui est des 90%, ils sont produits par les salaisonniers qui peuvent acheter des carcasses (ou des animaux vivants) en dehors de la Corse (France Continentale, Pays de l'EST ou autre). Cette matière première est souvent issue de l'élevage intensif et revient à un coût moindre en comparaison avec la matière première locale. Ainsi, depuis plusieurs dizaines d'années, des entreprises de transformations industrielles se sont développées dans la région et vendent leurs produits sous le nom de « charcuterie corse ». Ces unités de transformation profitent ainsi de l'image de marque du produit traditionnel à partir de matière première extérieure issue de l'élevage intensif. Certains éleveurs transformateurs locaux complètent également leur production avec des matières importées.

Cette situation donne lieu à la mise en marché de 4 types de produits :

- Les produits issus de la transformation de porcs de race corse, nés et élevés en Corse

- Les produits issus de la transformation de porcs de toute race, nés et élevés en Corse
- Les produits issus de la transformation de porcs importés puis transformés en Corse
- Les produits finis directement importés de l'extérieur

Les produits issus de la filière traditionnelle sont souvent vendus en circuit court, sur les marchés, les épiceries spécialisées ou les points de vente personnels des éleveurs (vente directe). Les autres types de produits sont souvent retrouvés chez les grossistes, les grandes surfaces et la restauration. Evidemment il est possible de retrouver les uns et les autres dans les différents circuits. Vu que l'appellation « Charcuterie Corse » est commune sur tous les produits cela entretien une énorme confusion pour le consommateur. L'appellation d'origine contrôlée (AOC) peut cependant permettre au consommateur d'être sûr que le produit a été fait avec des porcs *Nustrale* (race locale).

Race Nustrale et appellations d'origine

Le porc Nustrale (« le nôtre » en Corse) est une race locale présente uniquement sur l'île (Figure 16). Ce type de porc est caractérisé par une petite taille, un pelage de couleurs diverses (majoritairement noir) et une grande rusticité. Les porcs Nustrale ont une croissance plus lente que les races continentales. La race Nustrale a été reconnue en 2006 par la Commission Nationale d'Amélioration Génétique (CNAG).

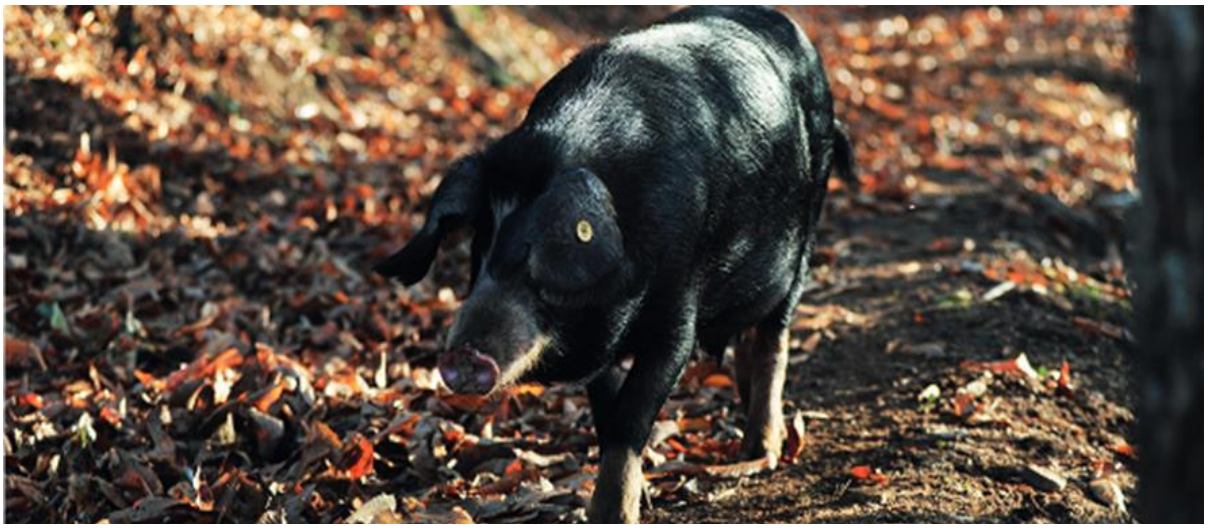


Figure 16 Porc Nustrale (DRAAF., 2017)

Le porc Nustrale est essentiellement valorisé en production de produits charcutiers fermiers, beaucoup plus rentables que la vente de viande fraîche pour les éleveurs. Une Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) « Charcuterie Corse » a été validée en avril 2012 par l'Institut National d'Appellations d'Origine (INAO) et a pour but de garantir des produits issus d'animaux de race Nustrale pure et d'un type d'élevage traditionnel. Seuls le « Jambon sec de

Corse » ou « Jambon sec de Corse - Prisuttu », la « Coppa de Corse » ou « Coppa de Corse - Coppa di Corsica » et le « Lonzo de Corse » ou « Lonzo de Corse - Lonzu » bénéficient de cette appellation AOP (Figure 17). Les producteurs engagés dans l'Appellation Origine Protégée (AOP) sont regroupés au sein du syndicat Salameria corsa (120 éleveurs environ). L'ARGRPC (Association régionale de gestion de la race de porc corse) gère le schéma de sélection de la race porcine Nustrale.

Par ailleurs, l'AREP (Association régionale des éleveurs porcins) travaille actuellement à la mise en place d'une Certification Label Rouge de porc fermier né et élevé en Corse. Et, récemment, s'est constitué l'APC, (Associu di i Purcaghji Corsi, association des porchers corses) qui vise à fédérer les producteurs qui ont fait d'autres choix que celui de la race Nustrale tout en s'inscrivant dans le mode d'élevage traditionnel. Ces formes d'organisation montrent que l'AOP ne parvient pas à réunir tous les producteurs locaux car elle leur demande des efforts importants et coûteux pour revenir à des pratiques plus conformes aux usages anciens.

Récemment « une indication géographique protégée (IGP) « île de beauté » a été obtenue par un consortium d'une dizaine d'entreprises de salaisons industrielles en corse. Cette IGP a fait polémique car elle n'exige aucune provenance locale de la viande utilisée pour la fabrication de la charcuterie mais met en avant le savoir-faire local pour la production de la charcuterie.

Figure 17 Produits charcutiers bénéficiant de l'Appellation d'Origine Contrôlée (Salameria Corsa., 2018)

Des pratiques locales à risque

En Corse, malgré l'exode rural du siècle dernier, un lien fort avec la nature et la ruralité continue d'exister. En effet, la notion d'ancrage au « village » d'origine d'un ou des parents constitue un

élément culturel fort. Ce rapport avec la nature est également illustré par la chasse, A *caccia* en Corse, qui est une pratique très répandue sur l'île. Durant la saison 2017-2018, 16 495 permis de chasse ont été délivrés dans la région (Cardi, 2018). Ce chiffre est relativement élevé lorsqu'on le ramène à la population régionale. En effet, près de 5% de la population possède un permis en Corse, contre moins de 2% au niveau national (1,2 millions de chasseurs avec un permis valide en France en 2017/2018). La chasse est surtout pratiquée sur le sanglier (70%) et possède un aspect identitaire et communautaire fort pour les corses (PNRC, 1995). En plus des licenciés, la famille des chasseurs est souvent conviée à la préparation du dépeçage, de l'éviscération et de la préparation des plats cuisinés à partir des sangliers. Cet animal sauvage est très présent dans la région et peut être retrouvé en milieu urbain ou péri-urbain.

La Corse possède également des coutumes alimentaires traditionnelles à risque concernant le HEV. Le *ficatellu* est une saucisse à base de foie de porc (au moins 30%) consommée régulièrement en Corse durant la période hivernale. Ce produit est particulièrement à risque notamment à cause de la présence de foie qui est le lieu de multiplication principal du virus de l'hépatite E. Cependant une cuisson à 70°C à cœur pendant 20 minutes peut permettre d'éliminer le virus (Emerson *et al.*, 2005b ; Barnaud *et al.*, 2012a) mais ce n'est malheureusement pas une pratique courante lors de la consommation de ce produit. La présence du virus dans ces produits a déjà été prouvée dans la littérature (Colson *et al.*, 2010 ; Berto *et al.*, 2013 ; Pavio *et al.*, 2014 ; Renou *et al.*, 2014 ; Pavio *et al.*, 2016), et les souches détectées étaient très proches génétiquement des souches humaines et porcines. Un autre produit ressemblant au *ficatellu* est consommé cru et sec (majoritairement en Corse-du-Sud) ce qui pourrait le rendre encore plus à risque concernant l'infection au HEV : il s'agit du *fittonu*. De nombreux autres produits à base de porc font partie du patrimoine gastronomique corse (saucisson et jambon sec : *salamu*, *coppa*, *prisuttu*, *lonzu*) ou de sanglier (charcuterie, ragout, terrine etc.) et sont également fréquemment consommés en Corse.

Autres voies de contamination possibles

En Corse, une forte production d'huîtres et de moules existe avec deux points majeurs de conchyliculture : les étangs de Diana et Urbinu en Haute-Corse (Préfecture de Corse, 2015). De plus, ce rapport de 2015 indique que 95% de cette production est consommée localement. La présence du virus au sein des animaux filtreurs a été détectée dans différents pays (Crossan *et al.*, 2012 ; Donia *et al.*, 2012 ; Rivadulla *et al.*, 2019). En plus d'être une voie de transmission à l'Homme par sa consommation, les animaux filtreurs sont également des sentinelles de la présence du virus dans l'eau. En effet, ces animaux sont capables de filtrer d'énormes quantité

d'eau, concentrant ainsi l'éventuelle présence du virus au niveau de leurs organismes. Cette voie de transmission ne doit donc pas être exclue dans une région hyper endémique comme la Corse, même si aucune infection liée à cette consommation n'a encore été rapportée en France. De plus la dernière étude française sur le sujet n'a détecté aucun ARN HEV sur 286 échantillons (Grodzki *et al.*, 2014)

Enfin, la Corse est une région très montagneuse reconnue pour ses activités de randonnée. Les eaux de sources en montagne sont fréquemment consommées par les randonneurs et peuvent être contaminées par le virus à cause des excréments de la faune sauvage (sangliers) ou domestique (porcin, ovin, bovin et caprin d'élevages extensifs).

Ruralité et qualité de l'eau

L'environnement et l'organisation spatiale de la population en Corse, impliquent également une proximité avec des animaux sauvages et domestiques mais également des zones rurales. En effet, même autour des villes principales de l'île, des élevages, des zones agricoles et des espaces naturels sont très nombreux. Le sanglier par exemple, bien qu'étant un animal sauvage et fréquemment retrouvé autour des villes et des villages.

L'impact de la ruralité sur les taux de séroprévalences a déjà été rapporté dans la littérature. Récemment, une étude portugaise a déterminé que les personnes vivant dans les régions les plus rurales présentaient des séroprévalences plus élevées (Nascimento *et al.*, 2018).

Bien que la qualité de l'eau de consommation soit majoritairement de bonne qualité en Corse, certaines communes ont montré des résultats très moyens d'après une étude bactériologique de 2016 (Agence Régionale de la Santé, 2017). Ce rapport de l'ARS peut remettre en cause « la mise à l'écart » de la voie de transmission hydrique qui est généralement très minoritaire dans les pays industrialisés. Cette qualité de l'eau moyenne dans certaines petites communes de Corse pourrait donc être une voie de transmission supplémentaire pouvant expliquer les hautes séroprévalences de la région. De plus, dans les villages corses, la consommation d'eau de fontaines est très fréquente et l'eau provenant de ces fontaines n'est pas issue du réseau d'eau de ville classique et n'est donc pas traitée ni contrôlée de la même façon. Cette voie de transmission ne doit pas être négligée même dans les pays industrialisés comme décrit précédemment dans les voies de transmissions du virus.

Hypothèses et objectifs

Au regard de la séroprévalence des IgG anti-HEV très élevée en Corse que ce soit en population humaine ou animale, de nombreuses questions apparaissent quant aux spécificités locales et aux modes de transmission existant sur l'île. En effet, la transmission zoonotique par contact direct avec le réservoir ou la consommation de produits à base de foie de porc ne semble pas pouvoir expliquer exclusivement une si grande exposition de la population. Ainsi de nombreux points sont à éclaircir afin de mieux comprendre l'épidémiologie du virus dans cette région supposée hyper-endémique.

L'hypothèse générale de ces travaux est que l'hyperendémicité de la Corse vis-à-vis du HEV est due à des pratiques locales à risque et que les hauts taux de séroprévalences observés ne sont pas uniquement dus à la consommation de *ficatellu*.

Différents objectifs ont été déterminés après avoir fait l'état de la littérature existant sur le virus et les spécificités locales de la région.

En population humaine, l'objectif principal a été d'établir une séroprévalence régionale des IgG anti-HEV de la population adulte Corse à partir d'un nombre solide d'échantillons. Des objectifs secondaires ont également été fixés afin de déterminer les facteurs associés à cette séroprévalence, mais également d'approfondir les connaissances des titres d'anticorps au niveau de la population adulte.

D'autre part, le second objectif majeur de ce travail de thèse a été de détecter la présence du HEV au sein de la filière porcine traditionnelle en Corse sur un grand nombre d'échantillons de fèces ainsi que les facteurs associés à cette détection. Enfin, l'identification des souches circulant dans la filière était également un des objectifs secondaires de ce travail (génotype et sous-type).

L'ensemble de nos travaux a pour but commun d'améliorer la connaissance de l'épidémiologie du HEV en Corse en population humaine et animale afin de mieux appréhender ce qui fait de la Corse, une région hyperendémique.

Méthodologie générale des études

Afin d'atteindre les différents objectifs détaillés ci-dessus, trois études principales ont été mises en place et une méthodologie spécifique a été appliquée. Les éléments majeurs permettant d'avoir une vision globale à propos des différentes études sont présentés ici.

Etude donneurs de sang : détection et quantification des IgG anti-HEV

La première étude réalisée durant ce travail de thèse est une étude de séroprévalence chez les donneurs de sang corses. Cette étude sera identifiée par le nom suivant dans l'intégralité du manuscrit : Etude SERO-QUANTI. Afin de poursuivre les travaux de Mansuy et al. (2016), l'ensemble des dons de sang provenant de donneurs vivant en Corse et reçus par l'Etablissement Français du sang entre Septembre 2017 et Janvier 2018 a été analysé en sérologie pour la détection et la quantification des IgG anti-HEV.

Le nombre de donneurs minimum à inclure était de 384, cette valeur a été déterminée en tenant compte de la séroprévalence précédemment déterminée d'environ 50% et du nombre d'habitants en Corse (Arya *et al.*, 2012). Ce nombre d'inclusion a permis d'estimer une séroprévalence avec un intervalle de confiance de 95% et une erreur maximale tolérée de 5%.

Les sérologies ont été réalisées avec le kit Wantai HEV IgG enzyme immunoassay en suivant les recommandations du fabriquant (Wantai Biologic Pharmacy Enterprise, Beijing, PRC). Le kit Wantai a été choisi afin d'être en adéquation avec les précédents travaux français et avec la majorité des études de séroprévalences réalisées dans les pays industrialisés. Ce test est basé sur un antigène recombinant correspondant à l'ORF2 du HEV (Zhang *et al.*, 2003).

Pour chaque échantillon, la détection et la quantification des IgG a été réalisée. Cette étude ne comporte pas de questionnaire spécifique, mais les variables suivantes disponibles pour chaque don ont été analysées afin d'étudier une éventuelle association avec la détection des anticorps : âge, sexe, ville de résidence principale, naissance en Corse ou non et groupes sanguins (ABO, Rhésus et Kell).

Enfin, un travail de modélisation statistique a été réalisé par l'équipe de modélisation mathématique des maladies infectieuses de l'Institut Pasteur. Le but de ce travail de modélisation a été de déterminer la probabilité d'infection ou force d'infection selon trois modèles sérocatalytiques : un modèle âge dépendant, un modèle indépendant de l'âge et un modèle avec séroréversion. La séroreversion correspond à la perte de l'immunité et à un retour à l'état sensible de l'individu. Cela afin d'avoir une vision sur l'évolution des séroprévalences avant 18 ans qui est une information manquante majeur dans la littérature.

SéroMed : Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux de la population adulte corse

SéroMed est une étude transversale de séroprévalence pour laquelle chaque sérologie est associée au remplissage d'un questionnaire spécifique par les individus inclus. Le pathogène d'intérêt majeur de cette étude est le HEV, mais les anticorps dirigés contre d'autres pathogènes ont été également recherchés (arboviroses, maladies parasitaires et maladies à prévention vaccinales). Les résultats liés à ces autres pathogènes n'entrent pas dans le cadre de ce travail de thèse.

Contrairement à l'étude précédente, trois populations d'adultes corses différentes ont été étudiées : les donneurs de sang, les patients de médecine générale et les étudiants ou personnels de l'Université de Corse. L'ensemble des personnes auquel l'étude a été proposée a été informé des modalités de l'étude grâce à un entretien et une lettre d'information (Annexe 3).

Le nombre d'inclusion pour chaque population et le kit utilisé pour la sérologie sont les mêmes que ceux de l'étude précédente. Les prélèvements issus des donneurs de sang correspondent à un don de sang classique et le donneur n'a pas de don supplémentaire à effectuer. En revanche, les prélèvements issus des deux autres populations ont été récoltés à partir d'une ponction au bout du doigt et par un personnel compétent (médecin généraliste, infirmier ou personnel formé à ce type de prélèvement). Par la suite, le sang récolté dans un tube gélosé est centrifugé afin d'obtenir le sérum. Le mode opératoire suivi par les médecins généralistes ayant participé à l'étude est présenté en Annexe 5. Les médecins généralistes participants en Corse ont été équipés de tout le matériel nécessaire pour réaliser les prélèvements (lancettes, compresses, désinfectant, tubes gélosés), la centrifugation du tube (mini centrifugeuse) et l'envoi des échantillons au laboratoire (enveloppes timbrés, triple emballage sécurisé matériel biologique). Une assurance a été souscrite afin de couvrir l'ensemble de l'étude.

Les conditions d'inclusions pour cette étude étaient les suivantes : vivre en Corse depuis au moins 6 mois, avoir rempli le questionnaire, signé le consentement et ne pas avoir de données manquantes concernant la variable sexe, âge et le résultat de la sérologie.

L'apport majeur de cette étude était la mise en place d'un questionnaire spécifique à la région, prenant en compte des spécificités locales (Annexe 4). Le questionnaire a servi à recueillir des informations sur les variables suivantes : sociodémographiques (âge, sexe, niveau

d'éducation, activités professionnelles, type de logement), facteurs cliniques (présence de maladies chroniques, transplantation, transfusion sanguine, immunodépression, infection antérieure par le HEV au cours de la vie), le contact avec les animaux (animaux domestiques et / ou animaux de ferme), la consommation de viande (gros gibier, petit gibier, porc, bœuf, volaille, viandes à viande et foie de porc), les produits à base de viande de porc (*ficatellu, fittonu,* pâté / terrine et saucisses), poissons et fruits de mer, fruits et légumes bio ou potager personnel, baies sauvages et source d'eau potable (en bouteille, robinet, sources d'eau de montagne, fontaines de village). Nous avons également enregistré le type de niveau de cuisson (cru, intermédiaire ou saignant et bien cuit).

Détection du HEV au sein de la filière porcine traditionnelle corse

Il s'agissait d'une étude prospective transversale menée au sein de la filière porcine corse. L'étude a été proposée à l'ensemble des éleveurs ayant déjà participés aux études précédentes avec l'INRA de Corse. D'autres éleveurs de la région ont été sollicités car le nombre d'éleveurs inscrits était insuffisant. L'objectif était de trouver 15 éleveurs minimum acceptant de participer à l'étude.

Des élevages de différents types ont dû être représentés (fermé, extensif, semi-extensif) dans l'échantillon et devaient être répartis si possible dans les 7 différentes sous régions de la Corse à savoir : l'Alta Rocca, la Castagniccia, le Cintu, le Liamone, la plaine Orientale, le Prunelli e Gravona et le Taravu. Cela afin d'avoir le plus de diversité possible et de couvrir l'ensemble de la région.

Les chiffres de la bibliographie sont très hétérogènes concernant le pourcentage de prélèvements de fèces positifs à une recherche virale HEV chez le porcin. De plus il existe des différences majeures selon les régions, l'âge des porcs, mais également selon le type d'élevage (intensif, extensif etc.). La seule valeur concernant la Corse était de 8,3% (2/24) (Jori *et al.*, 2016). Cependant, ces analyses provenaient d'échantillons de foies et non d'une étude de prévalence de l'infection dans les élevages. Il a donc fallu fixer une valeur arbitraire en dessous de l'ensemble des chiffres de la littérature afin d'optimiser les chances d'atteindre l'objectif. Si l'on considère un taux de positif ARN à 5 % parmi nos échantillons de fèces et un objectif de 50 échantillons positifs à obtenir (cette valeur a été fixée afin d'obtenir une certaine diversité de souches) il faut au total réaliser environ 1000 prélèvements de fèces.

Les prélèvements réalisés ont été récoltés dans chaque élevage des éleveurs participants. Les périodes de prélèvement ont été ciblées en fonction des périodes de mises bas classiques

en Corse. Chez le porc le HEV peut se retrouver majoritairement au niveau du foie, mais également au niveau des fèces et du sang. Les prélèvements au niveau des fèces semblaient les plus accessibles que ce soit pour l'aspect pratique des manipulations ou pour les autorisations (éleveurs et autorités). C'est donc ce type de prélèvement qui a été choisi pour cette étude.

Les prélèvements ont été réalisés sur des fèces de porcs fraiches mais également au niveau rectal pour les porcs les plus jeunes pouvant être attrapés facilement. Chaque échantillon a été identifié grâce à un code « élevage » et un numéro croissant de prélèvement. Une fiche de prélèvement a été conçue et a permis de recueillir les informations suivantes lors de la collecte : la nature du prélèvement, l'âge du porc, le type de porc (race, croisés etc.) et une description des éléments notables lors du prélèvement (enclos, terrain, troupeau) (Annexe 6).

La recherche d'ARN viral a été effectuée par qRT-PCR sur la totalité des prélèvements en utilisant des amorces spécifiques précédemment décrites et avec une Applied Quant Studio 3 (Applied Biosystems, California, United-States) (Garson *et al.*, 2012). L'ARN des échantillons positifs a été amplifié pour le génotypage un utilisant un système d'amorce ciblant l'ORF2 précédemment décrit dans la littérature (Huang *et al.*, 2002a). Les produits de PCR ayant la taille attend de 348 bp ont ensuite été purifiés et séquencés.

Cela a permis de calculer la prévalence de l'infection au HEV totale et selon les différentes variables (par classe d'âge, par élevage, par type d'élevage etc.). Enfin des analyses univariées et multivariée ont été réalisées afin de déterminer quels étaient les facteurs associés à la détection d'ARN viral dans les fèces.

Ci-dessous est présenté le schéma récapitulatif de la méthodologie des différentes études menées durant la thèse (Figure 18).

Etude donneurs de sang : détection et quantification des IgG anti-VHE

Etude SéroMed : Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux de la population adulte corse

Détection du VHE au sein de la filière porcine traditionnelle corse

Objectif général d'inclusion dans chaque population N = 384

Donneurs de sang

Echantillons dons de sang

Variables recueillies lors du don

Détection sérologie Wantai et quantification des IgG

Modélisation de données et analyses statistiques

Détermination de la séroprévalence, des titres anticorps IgG et de la force annuelle d'infection

Donneurs de sang

Etudiants et personnels universitaire

Médecine générale

- Dons de sang ou échantillons sanguins récoltés à l'Université et au cabinet du médecin
- Remplissage consentement et questionnaires spécifiques

Détection IgG sérologie Wantai

Analyses statistiques des variables recueillies dans le questionnaire spécifique

Détermination de la séroprévalence dans chaque population et des facteurs de risques associés à une sérologie positive

Objectif : environ 1000 échantillons de fèces dans une douzaine d'élevages

1 **Prélèvements élevage porcin**

Porcs adultes

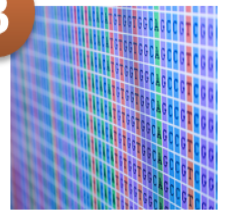
Jeunes porcs

Prélèvements fèces fraiches

Prélèvements rectaux

2

Recherche du génome viral dans les prélèvements par qRT-PCR

3 

Détermination génotype et sous-type, séquençage du génome complet des différentes souches

4 **Analyse des facteurs associés aux prélèvements positifs (type d'élevage, âge des porcs, environnement etc.)**

Figure 18 Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour les différentes études

La thèse étant sur article, la partie suivante présente l'ensemble des articles publiés ou soumis durant le travail de thèse et est ainsi divisée en quatre chapitres : le premier chapitre concerne l'étude SERO-QUANTI, le second l'étude SEROMED, le troisième l'étude de la filière porcine et enfin une partie concernant les travaux complémentaires réalisés sur les fèces de porcs domestiques. Cette dernière partie est annexe à la problématique de thèse.

Chaque chapitre comporte : un contexte d'étude, l'objectif de l'étude ainsi qu'un tableau récapitulatif des principaux résultats de l'article. Enfin, l'article en lui-même est présenté en version publiée, acceptée ou soumise selon le statut du papier.

Chapitre 1 : Quantification des IgG anti-HEV chez les donneurs de sang en Corse et modélisation du taux annuel d'infection

Résumé et résultats majeurs de l'article : Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.

La grande majorité des études de séroprévalences concernant l'hépatite E analyse les échantillons sanguins pour les IgG anti-HEV de façon qualitative. Le dosage des anticorps n'est que rarement effectué et un manque de données existe concernant le seuil immuno-protecteur de ces anticorps. En effet, des études ont montré que la majorité des cas cliniques d'hépatite E recensés concernent des hommes ayant une cinquantaine d'année. Cet élément soulève une question concernant les cas détectés malgré une éventuelle exposition passée au virus. Il semble surprenant en effet, que des primo infections interviennent sur ces classes d'âges vu les taux de séroprévalences observés. Les individus peuvent-ils être réinfectés ? Quel est le seuil de protection immunitaire concernant les anticorps ? Ces questions nécessitent la quantification systématique des anticorps.

Comme décrit précédemment, la Corse apparait comme une région hyper endémique concernant le HEV. De plus, des spécificités alimentaires, des zones rurales ou urbaines, et d'hétérogénéité de qualité de l'eau existent sur l'île. Il pourrait donc y avoir des différences au niveau micro-régional en fonction de ces différents paramètres ou même d'autres critères non déterminés.

Dans le cadre de travaux en collaboration avec l'EFS, environ 3000 dons de sang ont été récoltés entre septembre 2017 et janvier 2018. L'ensemble de ces échantillons a été analysé pour la détection et le dosage des anticorps IgG anti HEV. Ce dosage a permis d'apporter des données quantitatives sur les titres d'anticorps des donneurs de sang. De plus une cartographie des échantillons et des taux de séroprévalences par sous-région a été réalisée afin de voir si l'exposition de la population au virus apparaît de façon homogène ou non sur l'île. Des régressions logistiques (univariée et multivariée) ont permis de déterminer différentes variables associées à la positivité aux IgG anti-HEV. Enfin, différentes modélisations ont été effectuées afin d'essayer de comprendre comment ce profil de séroprévalence en fonction de l'âge a été obtenu (modèle âge dépendant ou non, séroréversion, etc.).

Le tableau 10 ci-dessous présente les résultats principaux de l'article.

Tableau 10 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude SERO-QUANTI

Séroprévalence globale	2,705 échantillons analysés	56,1%
Séroprévalence par arrondissement	Pas de différence significative entre les différents arrondissement	p-value > 0,05
Facteurs associés à la détection des IgG anti-HEV	Séroprévalences plus élevées chez les hommes que les femmes (association perdue chez les natifs Corse)	60,0% vs 52,2% p-value = 0,002
	Les natifs corses présentaient des taux significativement plus élevés que les non-natifs	60,6% vs 53,2% Odds Ratio = 1,62 [1,41-1,86]
	L'âge croissant était significativement associé à la détection d'anticorps	De 45,95% chez les 18-27 à plus de 63% chez les plus 48 ans
Modélisation	Chez les natifs Corse, la probabilité annuelle d'infection au HEV calculée était de 2,5% selon le modèle "non dépendant de l'âge". Selon le modèle "âge dépendant" la probabilité allait d'environ 4% avant 18 ans à 1,3% après 18ans.	
Groupes sanguins	Pas d'association entre les groupes sanguins et les séroprévalances ou titre anticorps	p-value > 0,05
Titre anticorps IgG anti-HEV	Titres anticorps globalement faibles	70% des positifs IgG anti-HEV avec des titres < 3UI/ml
	Titre anticorps moyen significativement plus élevé chez les femmes que chez les hommes	6,35 UI/ml vs 4,17 UI/ml
	Les faibles taux d'anticorps (< 3UI/ml) sont plus présent chez les personnes âgés de plus de 58 ans	73% vs 64%

En conclusion, notre étude confirme que la Corse est une région hyper endémique concernant le virus de l'hépatite E, avec une exposition homogène dans les différentes zones géographiques étudiées. Les séroprévalences augmentent avec l'âge jusqu'à 60 ans et sont plus élevées chez l'homme que chez la femme. Enfin nos modèles ont déterminé pour la première fois, une force d'infection annuelle chez les adultes et les enfants.

L'article présenté ci-dessous (Figure 11) a été accepté le 4 Novembre, et est actuellement en attente d'édition dans le journal Eurosurveillance (IF = 7,4).

Article

Eurosurveillance

Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	eurosurveillance-D-19-00336R2
Full Title:	Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.
Article Type:	Research
Keywords:	Hepatitis E virus; epidemiology; IgG titres; Seroprevalence; blood donors; Corsica
Corresponding Author:	Lisandru Capai, PHD Student Université de Corse CORTE, CORSE FRANCE
Corresponding Author's Institution:	Université de Corse
First Author:	Lisandru Capai, PHD Student
Order of Authors:	Lisandru Capai, PHD Student
	Nathanaël Hozé
	Jacques Chiaroni
	Sylvie Gross
	Rachid Djoudi
	Rémi Charrel
	Jacques Izopet
	Frédéric Bosseur
	Stéphane Priet
	Simon Cauchemez
	Xavier De Lamballerie
	Alessandra Falchi
	Pierre Gallian
Abstract:	Background: Hepatitis E virus (HEV) is an emerging zoonotic pathogen and a leading cause of acute viral hepatitis in European countries. Corsica Island has been previously identified as a hyperendemic area for HEV. Aim: To characterize the prevalence and titres of IgG antibodies to HEV among blood donors in Corsica and establish a model of the annual force of infection. Methods: Between September 2017 and January 2018, 2,705 blood donations were tested for anti-HEV IgG using the Wantai HEV IgG enzyme immunoassay kit. Results: The overall seroprevalence was 56.1%. In multivariate analysis, seroprevalence was higher in males than in females (60.0% vs 52.2%, p<0.01), increased with age and was significantly higher among donors born in Corsica (60.6% vs 53.2%; p<0.01). No significant difference was observed between the five districts of the island. IgG anti-HEV titres were globally low (70% of positives had titres < 3 IU/ml). In Corsican natives, increasing seroprevalence by age could be explained by models capturing a loss of immunity (annual probability of infection p: 4.5%; duration of immunity: 55 years) or age-specific probabilities of infection (p=3.8% for children, 1.3% for adults). Conclusion: We confirm the high HEV seroprevalence in Corsica and identify three items that should be further explored: (i) the epidemiology under the age of 18 yo; (ii) common sources of contamination, in particular drinking water, that may explain the wide exposure of the population; (iii) the actual protection afforded by the low IgG titres observed and the potential susceptibility to secondary HEV infection.
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Additional Information:	
Question	Response
Word count of the text	3985
Has informed consent has been obtained from persons whose details are described in your manuscript (or from the persons' guardians) that this information may be published?	Yes
If the answer to the above question is no, explain here why informed consent was not obtained.	
Please copy/paste your covering letter here.	COVER LETTER Corte, 20th October 2019 Dear Eurosurveillance Editor, We would like to thank you and the reviewers for the constructive and helpful comments to our manuscript. We have revised the manuscript and submitted a revised manuscript using the "Track Changes" tool in Microsoft Word for your consideration. Please find below our point-by-point response (in blue) to the reviewers and to the editorial comments. All co-authors have read and approved the manuscript. Should you have any further questions please do not hesitate to contact us. Kind regards, Lisandru Capai.
If a collective author is included (e.g. a working group or disease-specific network) and if the persons comprising the group are to be included at the end of the article, please list each person here. The contribution of the collective author should be stated in the relevant section.	
Authors' contributions: the contribution of each author to the article, including collective author if applicable, should be described here. This information will appear at the end of the published article.	Lisandru Capai, Alessandra Falchi, Pierre Gallian and Xavier de Lamballerie wrote the manuscript. Lisandru Capai, Frédéric Bosseur and Stephane Priet performed serological and/or statistical analyzes. Nathanael Hoze and Simon Cauchemez performed modeling studies of the infection. Sylvie Gross, Remi Charrel and Jacques Chiaroni analyzed the data. Pierre Gallian, Xavier de Lamballerie , Rachid Djoudi, and Jacques Izopet drafted the manuscript. All authors participated in review of the manuscript.
Please include any acknowledgements here. You may acknowledge anyone who has helped you with any aspect of the report, but it is always the corresponding author's responsibility to obtain permission from anyone being acknowledged.	

CONFIDENTIAL

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Have these findings already been published or is publication of these findings planned in a different format (e.g.: national or European report)?	No.
Do you have any conflicts of interest regarding your manuscript? If yes, please specify. If no, enter 'None'.	None.
Have the nucleic acid sequence data been deposited in sustainable, public, and open access, databases?	No
Manuscript Classifications:	France; food-borne infections; waterborne infections; zoonotic infections; viral infections; hepatitis E; hepatitis E virus; epidemiology; modelling
Author Comments:	Dear Editors, As you requested, we submitted the figures in excel format. However, concerning the tables present in these excel files, they should not be integrated into the article. They are there only if you have to make any modifications of form on the figures. Only the graphics (1A, 1B and 2) and the titles of the figures are to be included in the article. Thank you. Kind regards Editorial comments answer's Point by point response Editorial comments: Your responses to the reviews should be reflected in the manuscript text. Please include a few words on these reviewer questions: •Rev1 (1) on what is known about blood donors vs general population Author's response: In Material and methods / studied population section, we added the following sentence: "When compared to the general population, French blood donors present classical representativeness: children and young adults (<18 yo) are not represented and the elderly population (>65-70 yo) is underestimated." •Rev1 (1) on potential reasons for higher seroprevalence in men Author's response: In the discussion section we added the following sentence: "It was previously proposed that such differences may be explained by sociological factors (specific occupation, hunting etc...), but there is to date no direct evidence-based explanation that takes into account both the general high prevalence observed in both males and females and the difference between males and females." •Rev1 (1) on the nature of the questionnaire and why no specific questions could be asked Author's response: In Material and methods / studied population section, we added 2 sentences: "There was no specific epidemiological questionnaire in this study. The questionnaire used was the regular blood donation questionnaire used identically in all French territories." •Rev1 (5) on excluding bias from non-consenting donors Author's response: In Material and methods / studied population section, we changed the sentence "Blood donors accepted for donation according to the national requirements and living in Corsica were included in the study from September 2017 to January 2018, donors who did not consent that their samples might be used for epidemiological studies were excluded. "

CONFIDENTIAL

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	by "Blood donors accepted for donation according to the national requirements and living in Corsica were included in the study from September 2017 to January 2018. Only five donors (0.18%) who did not consent that their samples might be used for epidemiological studies were excluded." •Rev2 (2) on genotypes and type of infection, the part that acute goes with all genotypes Author's response: The question of the reviewer 2 was about genotypes that could be responsible of chronic infection ("Chronic vs acute HEV infection characterizes different genotypes"). As required by reviewer, we have clarified this item in our previous answer by mentioning that chronic forms of infection were reported for HEV genotype 3 and 4 (underlined in green see below) in industrialized countries (we also added references) in the introduction section: "In developed countries, chronic forms of infection have been reported in immunocompromised patients (undergoing transplantation or treatments for haematological malignancies) [14-17], or with pre-existing liver diseases [18], infected by HEV genotypes 3 [19, 20] or 4 strains [17, 21]." •Rev2 (6) on your reasons to include blood groups Author's response: We added sentences in the discussion section "Association between HLA or blood group antigens and infectious diseases has been documented in the literature [42-45] but, to our best knowledge, has never been investigated in the case of HEV infection. Here, we did not identify such a link between ABO, Rhesus and Kell blood groups and the presence of anti-HEV antibodies." •Rev2 (7) on why you recommend to study any possible transmission Author's response: The comment of reviever 2 was ". Therefore, it is unclear why the authors suggest to study the role of drinking water in Corsica as HEV source. Accordingly, the last paragraph which discusses the priority fields should be modified." We completed the last paragraph which discusses the priority fields, in the discussion section, we add a reference and we change the sentence : "Second, common sources of contamination, in particular drinking water, deserve further studies." By "Second, common sources of contamination, in particular drinking water, deserve further studies because (i) HEV can be found in feces and wastewater [50]; (ii) Corsica is a region where infection of pigs and boars is frequent [51-52] and (iii) the quality of water supply in the island could be a significant issue." We also added a reference and a sentence in the discussion section to justify the interest of a possible transmission route linked to water even in the industrialized countries: "Moreover, a recent study in Sweden has detected Hepatitis E virus genotype 3 strains in raw and still in tap water [49]" •Editors comments You say that you included the figures in editable Word format. However, it seems that your figures are graphs, they should therefore be submitted in (editable) Excel format, including the underlying data. We need to be able to change colours, lines, width of columns, fonts etc. Author's response: We have deposited figures 1A 1B, and 2 in excel format.

CONFIDENTIAL

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Title: Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.

Authors: Lisandru CAPAI[1], Nathanaël Hozé[2], Jacques Chiaroni[3], Sylvie Gross[4], Rachid Djoudi[4], Rémi Charrel[5], Jacques Izopet[6,7], Frédéric Bosseur[8], Stéphane Priet[5], Simon Cauchemez[2], Xavier de Lamballerie[5], Alessandra Falchi[1], Pierre Gallian[3,4,5].

Affiliations:

1 EA 7310, Laboratoire de Virologie, Université de Corse, 20250, Corte, France

2 Mathematical Modelling of Infectious Diseases Unit, Institut Pasteur, UMR2000, CNRS, 75015 Paris, France

3 Etablissement Français du Sang Provence alpes Côte d'Azur et Corse, 13005, Marseille, France

4 Etablissement Français du Sang, 93210, La Plaine-Saint-Denis, France

5 Unité des Virus Émergents (UVE): Aix Marseille Univ, IRD 190, INSERM 1207, IHU Méditerranée Infection, 13005, Marseille, France

6 Laboratoire de Virologie, Institut Fédératif de Biologie, Centre Hospitalier et Universitaire, Toulouse, France

7 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1043, Université Toulouse III, Toulouse, France

8 Sciences Pour l'Environnement – UMR CNRS 6134 Université de Corse, 20250, Corte, France

Corresponding author: Lisandru Capai

Corresponding author email: capai_l@univ-corse.fr

CONFIDENTIAL

Abstract

Background: Hepatitis E virus (HEV) is an emerging zoonotic pathogen and a leading cause of acute viral hepatitis in European countries. Corsica Island has been previously identified as a hyperendemic area for HEV. **Aim:** To characterize the prevalence and titres of IgG antibodies to HEV among blood donors in Corsica and establish a model of the annual force of infection. **Methods:** Between September 2017 and January 2018, 2,705 blood donations were tested for anti-HEV IgG using the Wantai HEV IgG enzyme immunoassay kit. **Results:** The overall seroprevalence was 56.1%. In multivariate analysis, seroprevalence was higher in males than in females (60.0% *vs* 52.2%, p<0.01), increased with age and was significantly higher among donors born in Corsica (60.6% vs 53.2%; p<0.01). No significant difference was observed between the five districts of the island. IgG anti-HEV titres were globally low (70% of positives had titres < 3 IU/ml). In Corsican natives, increasing seroprevalence by age could be explained by models capturing a loss of immunity (annual probability of infection p: 4.5%; duration of immunity: 55 years) or age-specific probabilities of infection (p=3.8% for children, 1.3% for adults).

Conclusion: We confirm the high HEV seroprevalence in Corsica and identify three items that should be further explored: (i) the epidemiology under the age of 18 yo; (ii) common sources of contamination, in particular drinking water, that may explain the wide exposure of the population; (iii) the actual protection afforded by the low IgG titres observed and the potential susceptibility to secondary HEV infection.

Keywords: Hepatitis E virus - Epidemiology – IgG titres – Seroprevalence – Blood donors – Corsica

Conflict of interest: None.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a virus with a single-stranded positive-sense RNA of approximately 7.5 kb belonging to family *Hepeviridae* (genus *Orthohepevirus*) [1]. HEV has originally been described as a non-enveloped virus [2, 3] but a "quasi-enveloped" form has been observed in blood [4, 5]. HEV strains infecting humans are currently classified in 5 genotypes (HEV-1 to HEV-4 and HEV-7) [6], but belong to a single serotype.

HEV-1 and 2 infections have been reported in humans, with person-to-person transmission occurring via the oral-fecal route. These strains are responsible for both epidemics and sporadic cases in developing countries. HEV-3 and 4 are zoonotic pathogens infecting humans, domestic (e.g., pigs) and wild animal species (e.g., boars, deers) which constitute the animal reservoir [7]. The main route of infection for genotypes 3 and 4 is the consumption of contaminated food or water or the contact with infected animals [1, 8]. Genotypes 3 and 4 are responsible for sporadic autochthonous cases in high-income countries.

HEV infection can lead to an acute hepatitis syndrome but also, in a significant proportion of cases, to asymptomatic forms (or at least presentations that do not call specific medical attention) [9-11]. Severe presentations (fulminant hepatitis) have been reported when infection occurs during pregnancy (in particular for genotype 1 during the last trimester) [12, 13]. In developed countries, chronic forms of infection have been reported in immunocompromised patients (undergoing transplantation or treatments for haematological malignancies) [14-17], or with pre-existing liver diseases [18], infected by HEV genotypes 3 [19, 20] or 4 strains [17, 21]. The interpretation and the comparison of the seroprevalence studies remain difficult because of the wide variations in sensitivity and specificity rates of the different anti-HEV IgG assays [22, 23]. The Wantai assay is frequently used in European countries [24], and has specificity and sensitivity values for the HEV-IgG in the order of magnitude of 98% and 99.5% respectively (manufacturer's operating instructions). This test is based on a recombinant antigen corresponding to ORF2, which encodes the structural protein of the icosahedral capsid [25]. Epidemiological studies in Europe, conducted with the 'Wantai' serological test, showed a great geographical heterogeneity of anti-HEV carriers with seroprevalence ranging from 5-6% in Scotland [26, 27] to 52% in South-Western France [28]. Important variability was observed even within individual country [29]. A nationwide seroprevalence study conducted in France reported a 22% anti-HEV IgG seroprevalence in French blood donors population tested in 2011-2012 [29]. In this study, seropositivity was associated with male, increasing age, consumption of oysters, pork meat and raw pork liver sausages. Drinking bottled water was associated with lower anti-HEV IgG seropositvity rate. A national report on the surveillance of HEV in France has shown a significant increase in the number of autochthonous cases detected between 2002 and 2016 (from 9 to 2,292) [30]. However,

CONFIDENTIAL

this increase could be due to a better awareness among physicians and in the general population resulting in increased testing [30]. With a population of 338,000 inhabitants in 2018 [31], Corsica is a large French island (8,680 km²) located in the Mediterranean Sea in the southeast of mainland France. Here, we investigated HEV seroprevalence in volunteer blood donors from the island, which is considered a zone of high prevalence [29]. Titres of all positive donation were estimated using the Wantai ELISA making it possible to assess the level of immunity in the population together with a fine scale analysis of prevalence in Corsican districts.

Material and methods

Ethics

The study received approval from the medical and scientific direction of the French Public Transfusion service (Établissement Français du Sang: EFS) and from the *ad hoc* ethics committee (Comité de Protection des Personnes #2016-A01000-51). All French blood donors are voluntary and non-remunerated. Blood donors were informed that samples might be used for epidemiological studies. Donors who did not consent were not included.

CONFIDENTIAL

Studied populations

Blood donors accepted for donation according to the national requirements and living in Corsica were included in the study from September 2017 to January 2018. Only five donors (0.18%) who did not consent that their samples might be used for epidemiological studies were excluded. Distribution of the studied population and the general population of Corsica according to age groups and sex is presented in Supplemental Figure S1. When compared to the general population, French blood donors present classical representativeness: children and young adults (<18 yo) are not represented and the elderly population (>65-70 yo) is underestimated. Only data recorded in the EFS database (age, sex, place of residence and birth) were used in the study after anonymization. There was no specific epidemiological questionnaire in this study. The questionnaire used was the regular blood donation questionnaire used identically in all French territories. Blood donors born in or outside Corsica were assigned to the "native" or "non-native" groups, respectively.

Laboratory Methods

Anti-HEV IgG detection:

Plasma samples were tested for the presence of anti-HEV IgG (EFS Provence Alpes Cotes d'Azur & Corse, Marseille) using a single lot reagent of the Wantai HEV IgG enzyme immunoassay kit (Wantai Biologic Pharmacy Enterprise, Beijing, PRC). The assay is based on a recombinant antigen encoded by a structural region of ORF-2 derived from a Chinese isolate of HEV-1 [25, 32] and its analytical and

clinical performances have been evaluated recently [33]. Testing was performed according to the manufacturer's instructions. For each sample, the ratio (sample OD/cutoff OD) was calculated. A result was considered to be positive if the sample ratio was ≥1. The limit of detection of the Wantai IgG anti-HEV assay is 0.25 World Health Organization (WHO) units per millilitre [34].

Anti-HEV IgG quantification:

Anti-HEV IgG titres were estimated as previously described [35] using dilution series (ranging from 0.25 to 5.0 IU/mL) from the WHO Anti-HEV IgG reference material, 95/584 (supplied by the National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, United Kingdom). For samples with titre > 5.0 IU/L, final titration was determined after testing dilutions of these samples until the signal was in the linearity part of the titration curve (0.25 to 5.0 IU/mL)

Blood grouping:

ABO/Rh/Kell phenotypes were determined using a fully automated microplate haemagglutination procedure [36] according to routine EFS procedures.

Statistical analysis

Association of the presence of anti-HEV IgG with biological factors (Blood grouping results) and epidemiological data (Sex, age, place of residence and place of birth) was analysed and tested using the Fisher's exact test. Multivariate analysis was performed using an unconditional logistic regression model. Results were considered statistically significant when p-value was lower than 0.05. All statistical analyses were performed using the R program (http://www.r-project.org).

Models of the annual force of infection

The analysis of seroprevalence stratified by age can provide key insight on the history of circulation of HEV in Corsica, the associated risk factors for exposure as well as patterns of long-term antibody decay following HEV infection. Indeed, serocatalytic models are now commonly used to reconstruct from such data trends in the force of infection λ_a, defined as the rate of infection among susceptible individuals of age *a* [37]. For example, if the force of infection is constant with age ($\lambda_a = \lambda$) and if there is no decay in immunity, these models predict that the annual probability of infection for a susceptible individual is $1 - exp(-\lambda)$ and the seroprevalence in individuals of age a is $P_a = 1 - exp(-\lambda.a)$. By fitting model predictions to data, it is possible to estimate the force of infection.

Here, we consider three competing serocatalytic models to explain the observed age-stratified seroprevalence. First, we consider the simple model described above where the force of infection is age-invariant ($\lambda_a = \lambda$) and there is no decay in immunity. Second, we assume that the force of infection is different for children (λ_C; <18 years old (yo)) and for adults (λ_A) (and still no decay of immunity). In this second model, the seroprevalence in individuals of age *a* is:

CONFIDENTIAL

$$P_a = \begin{cases} 1 - exp(-a\lambda_C) & \text{if } a < 18 \\ 1 - exp(-18\,\lambda_C - (a-18)\lambda_A) & \text{otherwise} \end{cases}$$

Finally, we assume that the force of infection is age-invariant but immunity decays at a rate ρ:

$$P_a = \frac{\lambda}{\lambda + \rho}\left[1 - e^{-a(\lambda+\rho)}\right]$$

In the latter model, males and females can have a different risk of infection but are assumed to have the same duration of immunity.

The contribution to the likelihood of an individual of age a with seropositivity status s (s=1 if seropositive; otherwise s=0) is $(P_a)^s(1-P_a)^{1-s}$. Parameters were estimated in a Bayesian framework using a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in R using the Rstan package [38]. Four independent chains of 5000 iterations each were simulated, with the 2,500 first iterations corresponding to the burn in. Flat priors were chosen for the force of infection λ and the seroreversion rate ρ.

Mean and 95% credible intervals (CrI) of the posterior distributions were calculated. We report the annual probability of infection of a susceptible individual using the formula $p = 1 - e^{-\lambda}$. The seroreversion rate was converted into a duration of immunity using the expression: $d = \frac{1}{\rho}$.

Goodness of fit of the different models was assess using the deviance information criterion (DIC), a measure of the deviance in the likelihood commonly used in parameter estimations in a Bayesian setting. The smaller the DIC of a model, the better the model fit [39]. A DIC difference above 4 corresponds to a substantial improvement of the fit.

CONFIDENTIAL

Results

Anti-HEV IgG seroprevalence analyses

Population studied: a total of 2,705 blood donors (18-70 yo) living in Corsica for at least six months participated in this study, including 1,347 females (49.80%) with a mean age of 42 yo and 1,358 males (50.20%) with a mean age of 43 yo (Table 1).

The overall seroprevalence for anti-HEV IgG antibodies in this population was 56.1% (95% Confidence Interval CI 54.2-58.0). The adjusted estimate of seroprevalence in the general population of Corsica was 55.8% (95% CI 53.9-57.7; see Supplemental Table S1).

Sex: in both univariate and multivariate analyses (Tables 1, 2), the seroprevalence was significantly higher in males (60.0%) than in females (52.2%) (p value <0.001). Significance was lost when the analysis was restricted to native individuals.

Age: Among the 18-57 yo individuals recruited in the study, the seroprevalence increased with age in both males and females (Figure 1A and Supplemental Figure S2A). The overall increase in

Table 1: Statistical analysis of biological and epidemiological factors associated with IgG antibodies for Hepatitis E Virus (Univariate analysis). NS: Non significant value; CI: confidence Interval.

Parameters	Variables	n	Anti-HEV IgG positive		Test	p-value	Odds Ratio [CI* 95%]
			n	%			
Sex	Female	1,347	703	52.19%	Male > Female	0.000024*	1.37 [1.18-1.60]
	Male	1,358	815	60.01%			
Age group	18-27	605	278	45.95%	One age group > other age groups	< 0.00001	0.59 [0.49-0.70]
	28-37	492	244	49.59%		0.0008	0.72 [0.59-0.88]
	38-47	575	323	56.17%		NS	NS
	48-57	566	377	66.60%		< 0.0001	1.74 [1.44-2.12]
	58-70	467	296	63.38%		0.0003	1.44 [1.17, 1.77]
Place of residence (District)	Ajaccio	1,047	611	58.36%	One district > other districts	0.023	1.18 [1.01-1.37]
	Bastia	560	304	54.29%		NS	NS
	Calvi	258	140	54.26%		NS	NS
	Corte	419	223	53.22%		NS	NS
	Sartène	421	240	57.01%		NS	NS
Native of Corsica	Yes	1,068	647	60.58%	Native > Non-native	< 0.0001	1.35 [1.16-1.58]
	No	1,637	871	53.20%			
ABO Blood Group (BG)	A	1,019	569	55.84%	One BG > other BG	NS	NS
	B	257	136	52.92%		NS	NS
	AB	105	65	61.90%		NS	NS
	O	1,324	748	56.50%		NS	NS
Rhesus (Rh)	Positive	2,25	1,261	56.04%	Rh+ > Rh-	NS	NS
	Negative	455	257	56.48%			
Kell	Positive	238	135	56.72%	Kell+ > Kell-	NS	NS
	Negative	2,467	1,383	56.06%			

CONFIDENTIAL

Table 2: Statistical analysis of biological and epidemiological factors associated with IgG antibodies for Hepatitis E Virus (multivariate analysis). CI: confidence Interval. Table includes only risk factors associated with p-value <0.05.

Parameters	Test	p-value	Adjusted Odds Ratio [CI* 95%]
Sex	Males ➔ Females	0.002	1.28 [1.12- 1.46]
Age group	18-27	< 0.00001	0.60 [0.49-0.73]
	28-37	0.018	0.74 [0.60-0.91]
	48-57	0.00021	1.68 [1.29-1.94]
	58-70	0.03	1.32 [1.07-1.63]
Native of Corsica	Native ➔ Non-native	< 0.0000001	1.62 [1.41-1.86]

CONFIDENTIAL

Figure 1: Distribution of anti-HEV IgG seroprevalence in age groups.

Figure 1A: distribution by sex (red bars = females & blue bars = males). **Figure 1B:** by place of birth of blood donors living in Corsica (grey bars = native of Corsica and orange bars = non-native of Corsica). This asterisk (*) means that, for a given age-group, the two values between variables (sex in figure 1A and place of birth for figure 1B) are significantly different (p-value < 0.05).

Models of the annual force of infection

This increase of the seroprevalence per year of age is expected to underestimate the annual probability of infection in susceptible individuals (*i.e.* the force of infection) because it does not account for the fact that only a proportion of an age group is susceptible for infection. For example, if the force of infection is 2% but only 50% of the age group is susceptible, the increase in the seroprevalence (1%) will substantially underestimate the force of infection (2%). The fact that the seroprevalence increases at a lower rate in adults than in children might therefore be partly explained by higher levels of susceptibility in children. We therefore use serocatalytic models to derive, from these data, estimates of the force of infection.

Restricting the analysis to native individuals, we find that the model that assumes a constant "age-independent" force of infection and no loss of immunity over time cannot reproduce the large seroprevalence observed in the younger age group nor the plateau in the seroprevalence of older males (Supplemental Figure S4A, B). To integrate these features, we tested two alternative models ("age-dependent" force of infection *vs* "seroreversion"). Both models fit the data equally well. In the model where the force of infection is age-dependent (Supplemental Figure S4C, D), we find that the force of infection in children has to be 2.9 (95% CrI: 1.6 – 4.9) times higher than that in adults to explain the data (Table 3). Alternatively, a model where there is a long term decay of immunity (average duration of immunity: 55 years, 95% CrI: 32-93) also provides a satisfying fit to the data as a loss of immunity in adults can explain the plateau in the age-profile of seroprevalence (Supplemental Figure S4E, F). The estimated force of infection in this model is around 4% for male and female individuals (Table 3).

CONFIDENTIAL

Table 3: Parameter estimates for the serocatalytic models. Three models are considered where the force of infection is constant ("age-independent") or varies with age ("age-dependent"), and a model that includes decay of immunity ("seroreversion"). Mean and 95% credible intervals are given for the different parameters.

Models	Annual probability of infection in native susceptible male	Annual probability of infection in native susceptible female	Duration of immunity
Age-independent*	2.6% (2.3% - 2.8%)	2.5% (2.3% - 2.8%)	∞
Age-dependent	<18: 3.9% (3.2% - 4.6%) >18: 1.4% (0.89% - 1.9%)	<18: 3.7% (3.1% - 4.4%) >18: 1.3% (0.8% - 1.9%)	∞
Seroreversion	4.6% (3.6% - 6.2%)	4.4% (3.4% - 5.8%)	55yrs (32 yrs - 93 yrs)

Anti-HEV IgG geographical distribution:

Seroprevalence of anti-HEV IgG was analysed in the five Corsican administrative districts. Positive anti-HEV IgG rates were globally high, ranging from 53.22% in the "Corte" district to 58.26% in the "Ajaccio" district (see Table 1 and Supplemental Figure S5)

Anti-HEV IgG quantification:

All positive anti-HEV IgG samples (n =1,518) were quantified. Titres were ranging from 0.25 to 153 IU/mL, mean and median titres were estimated at 2.91 IU/ml and 0.46 IU/ml respectively. Around 70% of positive blood samples had an anti-HEV IgG titre lower than 3 IU/ml and 85.90% had a titre lower than 10 IU/ml (Figure 2). Among positive donations, women had a mean antibody titre (6.35 IU/ml) higher than men (4.17 IU/ml) (p-value < 0.05). Among women, 17.64% of positive samples had a titre higher than 10 IU/ml versus 11.04% among men (p-value < 0.001). No difference was observed between titre and age groups (Supplemental Figure S6)."

Figure 2: Distribution of anti-HEV IgG titre (IU/mL) estimated using the WHO standard 95/584 according to sex (females = red bars; males = blue bars). This asterisk (*) means, for a given titre, that values between sex are significantly different (p value < 0.05).

CONFIDENTIAL

Blood grouping:

Among the 2,705 blood donors, the distribution of ABO blood groups was: O: 48.9% (n=1,324); A: 37.7% (n=1,019); B: 9.5% (n=257), AB: 3.9% (n=105). Anti HEV IgG rates (Table 1) for ABO blood groups was ranging from 52.92% (B) to 61.90% (AB). The prevalence values of Rhesus positive (RH+1) and Kell positive (KEL+1) phenotypes were 56.04% and 56.72%, respectively. No significant difference was observed when comparing the distribution of the anti-HEV IgG positive donations by blood groups or by combination of them.

Discussion

In 2011-2012, a nationwide survey (using the Wantai assay) identified geographical heterogeneity in the distribution of the anti-HEV IgG serological status among volunteer blood donors in mainland France [29]. The Corsica Island was among the areas with the highest seroprevalence recorded (62%). The ficatellu, a local pork liver sausage, has been formally identified as a source of Hepatitis E Virus foodborne contamination [40], but the actual impact of ficatellu consumption on HEV epidemiology is unknown and other potential sources of contamination remain to be explored. Here, we completed the abovementioned study by performing a specific analysis of a new and larger sample of Corsican blood donors.

Between September 2017 and January 2018 (a period without important touristic activity), we enrolled 2,705 blood donors residing in Corsica among whom 1,518 (56.1%) tested positive for the presence of anti-HEV IgG. This fully confirmed the high endemicity of HEV in Corsica. Other high prevalence areas have been identified in Europe using the same anti-HEV IgG assay, *i.e.* Central Italy (Abruzzo region, 49%) [41] and South Western France (Midi-Pyrénées Region, 52.5%) [28].

The analysis of the raw data indicates that HEV seroprevalence is globally higher in males, a finding that was previously described in univariate but not multivariate analysis [29], and in individuals born in Corsica. It was previously proposed that such differences may be explained by sociological factors (specific occupation, hunting etc...), but there is to date no direct evidence-based explanation that takes into account both the general high prevalence observed in both males and females and the difference between males and females. Association between HLA or blood group antigens and infectious diseases has been documented in the literature [42-45] but, to our best knowledge, has never been investigated in the case of HEV infection. Here, we did not identify such a link between ABO, Rhesus and Kell blood groups and the presence of anti-HEV antibodies.

Antibody titres are globally low with 77.2%, 81.6% and 85.9% of donors having anti-HEV IgG titres below 5, 7 and 10 IU/mL, respectively. The seroprevalence increases with age, except in those over ca. 60 years of age. In our models, the latter item can be explained either by a force of infection that varies with age (but this is not supported to date by specific epidemiological or sociological information), or by a loss of specific antibodies over time. Previous studies have shown that antibody levels decreased over time and in some subjects, anti-HEV IgG can disappear after a follow-up ranging from 1 to 22 years [46]. A recent study among blood donors from Central Italy using for antibodies detection the Wantai assay, has reported an HEV seroconversion rate of 2.1/100 person-years [47], in the same order of magnitude (1.3 to 4.6 /100 person-years) than those estimated with our models (Table 3).

Noticeably, the seroprevalence in the youngest age group of blood donors (18-27yo) is more than 10% higher in those born in Corsica (ca. 51%) than in those born outside (ca. 39%). This is reflected in a force of infection of 4.3% (95% CrI: 3.5% - 5.6%) per year in natives versus 2.8% (95% CrI: 2.5% - 3.2%) per year in non-natives in the "seroreversion model". However, in the absence of detailed epidemiological data for individuals under the age of 18 yo, the exact shape of the seroconversion curve in children and teenagers remains to be established. Clearly, identifying determinants of exposure in the Corsican population under the age of 18 yo is essential to understand the epidemiology of HEV locally. The comparison of the HEV seroprevalence measured here (56.1%) and in archived sera from blood donors collected in 2000 in both departments of Corsica (53.3%; n=90) suggests that exposure to HEV has been stable in the Corsican population for at least two decades. In addition, no

CONFIDENTIAL

great variation in prevalence was identified according to the administrative district of residence. Overall, the epidemiological information seems to converge towards a potential common, ubiquitous exposure to HEV infection for individuals living in Corsica.

The animal reservoir (mainly pigs and boars) is consensually regarded as a major source of infection in humans. However, the relative importance of direct (i.e. related to pig and boar meat consumption) or indirect routes of contamination remains unclear. Indirect contamination may be related to hand borne/fomite virus transmission, but also to contaminated drinking water. Previous information from the French nationwide study [29] identified drinking bottled water as a protective factor against infection, and in the rural Auvergne region (central Mainland France), water from the public network was identified as the common source of infection for a cluster of 7 human cases, with HEV RNA being detected in a private well that accidentally contaminated the public water network [48]. Moreover, a recent study in Sweden has detected Hepatitis E virus genotype 3 strains in raw and still in tap water [49].Therefore, as more research is implemented to identify ubiquitous sources of HEV exposure in Corsica, the potential role of drinking water in the spread of HEV infection should carefully be investigated.

In conclusion, our study confirms that Corsica is a high endemic area for Hepatitis E Virus infection, with an homogeneous exposure in the different geographical districts. Seroprevalence increases with age until 60 yo and is higher in males than in females.

Our study identifies three priority fields for further investigations in Corsica, which are of general interest for a better understanding of HEV epidemiology. First, the epidemiology in the younger age group (under the age of 18yo) is essentially unknown in absence of biological data and should be explored further.

Second, common sources of contamination, in particular drinking water, deserve further studies because (*i*) HEV can be found in feces and wastewater [50]; (*ii*) Corsica is a region where infection of pigs and boars is frequent [51, 52] and (*iii*) the quality of water supply in the island could be a significant issue.

The relationship between the animal reservoir, waste water and the potential contamination of the public water network may be one avenue worth exploring. Third, the high proportion of donors with low anti-HEV antibody titre raises the question of the actual protection afforded by IgG antibodies and that of susceptibility to secondary HEV infection.

CONFIDENTIAL

References

1. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. Lancet. 2012;379(9835):2477-88.
2. Bradley DW. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. Br Med Bull. 1990;46(2):442-61.
3. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. Rev Med Virol. 2003;13(3):145-54.
4. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, 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. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1112-25.
5. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. Biochimie. 2017;141:70-9.
6. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classi fi cation, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses. 2016;8(10).
7. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. Vet Res. 2010;41(6):46.
8. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. Lancet Infect Dis. 2008;8(11):698-709.
9. Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. Virus Res. 2011;161(1):15-22.
10. Guillois Y, Abravanel F, Miura T, Pavio N, Vaillant V, Lhomme S, et al. High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. Clin Infect Dis. 2016;62(3):351-7.
11. Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. Emerging infectious diseases. 2009;15(11):1738-44.
12. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. Int J Gynaecol Obstet. 2004;85(3):240-4.
13. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhya D, Gupta RK, et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22(5):676-82.
14. de Niet A, Zaaijer HL, ten Berge I, Weegink CJ, Reesink HW, Beuers U. Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. Neth J Med. 2012;70(6):261-6.
15. Gauss A, Wenzel JJ, Flechtenmacher C, Navid MH, Eisenbach C, Jilg W, et al. Chronic hepatitis E virus infection in a patient with leukemia and elevated transaminases: a case report. J Med Case Rep. 2012;6:334.
16. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. J Hepatol. 2016;65(1):200-12.
17. Behrendt P, Steinmann E, Manns MP, Wedemeyer H. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. J Hepatol. 2014;61(6):1418-29.
18. Crossan CL, Simpson KJ, Craig DG, Bellamy C, Davidson J, Dalton HR, et al. Hepatitis E virus in patients with acute severe liver injury. World J Hepatol. 2014;6(6):426-34.
19. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. N Engl J Med. 2012;367(13):1237-44.
20. Te HS, Drobeniuc J, Kamili S, Dong C, Hart J, Sharapov UM. Hepatitis E virus infection in a liver transplant recipient in the United States: a case report. Transplant Proc. 2013;45(2):810-3.
21. Geng Y, Zhang H, Huang W, T JH, Geng K, Li Z, et al. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. Hepat Mon. 2014;14(1):e15618.
22. Shrestha AC, Flower RL, Seed CR, Stramer SL, Faddy HM. A Comparative Study of Assay Performance of Commercial Hepatitis E Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits in Australian Blood Donor Samples. Journal of blood transfusion. 2016;2016:9647675.
23. Park HK, Jeong SH, Kim JW, Woo BH, Lee DH, Kim HY, et al. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. BMC infectious diseases. 2012;12:142.

CONFIDENTIAL

24. Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, et al. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. Viruses. 2016;8(8).
25. Zhang J, Ge SX, Huang GY, Li SW, He ZQ, Wang YB, et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. Journal of medical virology. 2003;71(4):518-26.
26. Cleland A, Smith L, Crossan C, Blatchford O, Dalton HR, Scobie L, et al. Hepatitis E virus in Scottish blood donors. Vox sanguinis. 2013;105(4):283-9.
27. Thom K, Gilhooly P, McGowan K, Malloy K, Jarvis LM, Crossan C, et al. Hepatitis E virus (HEV) in Scotland: evidence of recent increase in viral circulation in humans. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2018;23(12).
28. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. Emerging infectious diseases. 2011;17(12):2309-12.
29. 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(4):1145-54.
30. Couturier E, Abravanel F, Figoni J, Van Cauteren D, Septfons A, Lhomme S, et al. SURVEILLANCE DE L'HÉPATITE E EN FRANCE, 2002-2016 / HEPATITIS E SURVEILLANCE IN FRANCE, 2002-2016. 2018.
31. INSEE. Estimation de la population corse en 2019 2019 [Available from: https://www.insee.fr/fr/statistiques/1893198.
32. Li X, Kamili S, Krawczynski K. Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. J Viral Hepat. 2006;13(12):835-9.
33. Avellon A, Morago L, Garcia-Galera del Carmen M, Munoz M, Echevarria JM. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. Journal of medical virology. 2015;87(11):1934-9.
34. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Miedouge M, Peron JM, Alric L, et al. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. J Clin Virol. 2013;58(4):624-8.
35. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, et al. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. The Journal of infectious diseases. 2014;209(12):1900-6.
36. Rookard LE, Edmondson O, Greenwell P. ABO reverse grouping: effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. Br J Biomed Sci. 2009;66(2):93-7.
37. Hens N, Aerts M, Faes C, Shkedy Z, Lejeune O, Van Damme P, et al. Seventy-five years of estimating the force of infection from current status data. Epidemiol Infect. 2010;138(6):802-12.
38. Team TSd. RStan: the R interface to Stan. R package version, 2(1).
39. Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BR, van der Linde A. Bayesian measures of model complexity and fit. J Roy Stat Soc B. 2002;64:583-616.
40. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. The Journal of infectious diseases. 2010;202(6):825-34.
41. Lucarelli C, Spada E, Taliani G, Chionne P, Madonna E, Marcantonio C, et al. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2016;21(30).
42. Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Krengel U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. Curr Opin Struct Biol. 2017;44:190-200.
43. Politis C, Parara M, Kremastinou J, Hasapopoulou E, Iniotaki A, Siorenta A, et al. Associations of ABO, D, and Lewis blood groups and HLA Class I and Class II alleles with West Nile virus Lineage 2 disease outcome in Greece, 2010 to 2013. Transfusion. 2016;56(8):2115-21.
44. Kaidarova Z, Bravo MD, Kamel HT, Custer BS, Busch MP, Lanteri MC. Blood group A and D negativity are associated with symptomatic West Nile virus infection. Transfusion. 2016;56(7):1699-706.

CONFIDENTIAL

45. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. Viruses. 2019;11(3).
46. Servant-Delmas A, Abravanel F, Lefrere JJ, Lionnet F, Hamon C, Izopet J, et al. New insights into the natural history of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused immunocompetent patients in France. J Viral Hepat. 2016;23(7):569-75.
47. Marcantonio C, Pezzotti P, Bruni R, Taliani G, Chionne P, Madonna E, et al. Incidence of hepatitis E virus infection among blood donors in a high endemic area of Central Italy. J Viral Hepat. 2019;26(4):506-12.
48. Spaccaferri G. Cas groupés d'infections par le virus de l'hépatite E Auvergne, 2015. Santé Publique France, France SP; 2015.
49. Wang H, Kjellberg I, Sikora P, Rydberg H, Lindh M, Bergstedt O, et al. Hepatitis E virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water. Water Res. 2019;168:115141.
50. Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Izopet J, et al. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2018;23(7).
51. Capai L, Maestrini O, Casabianca F, Villechenaud N, Masse S, Bosseur F, et al. Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France. Transbound Emerg Dis. 2019.
52. Jori F, Laval M, Maestrini O, Casabianca F, Charrier F, Pavio N. Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. Viruses. 2016;8(8).

CONFIDENTIAL

Figure 1A

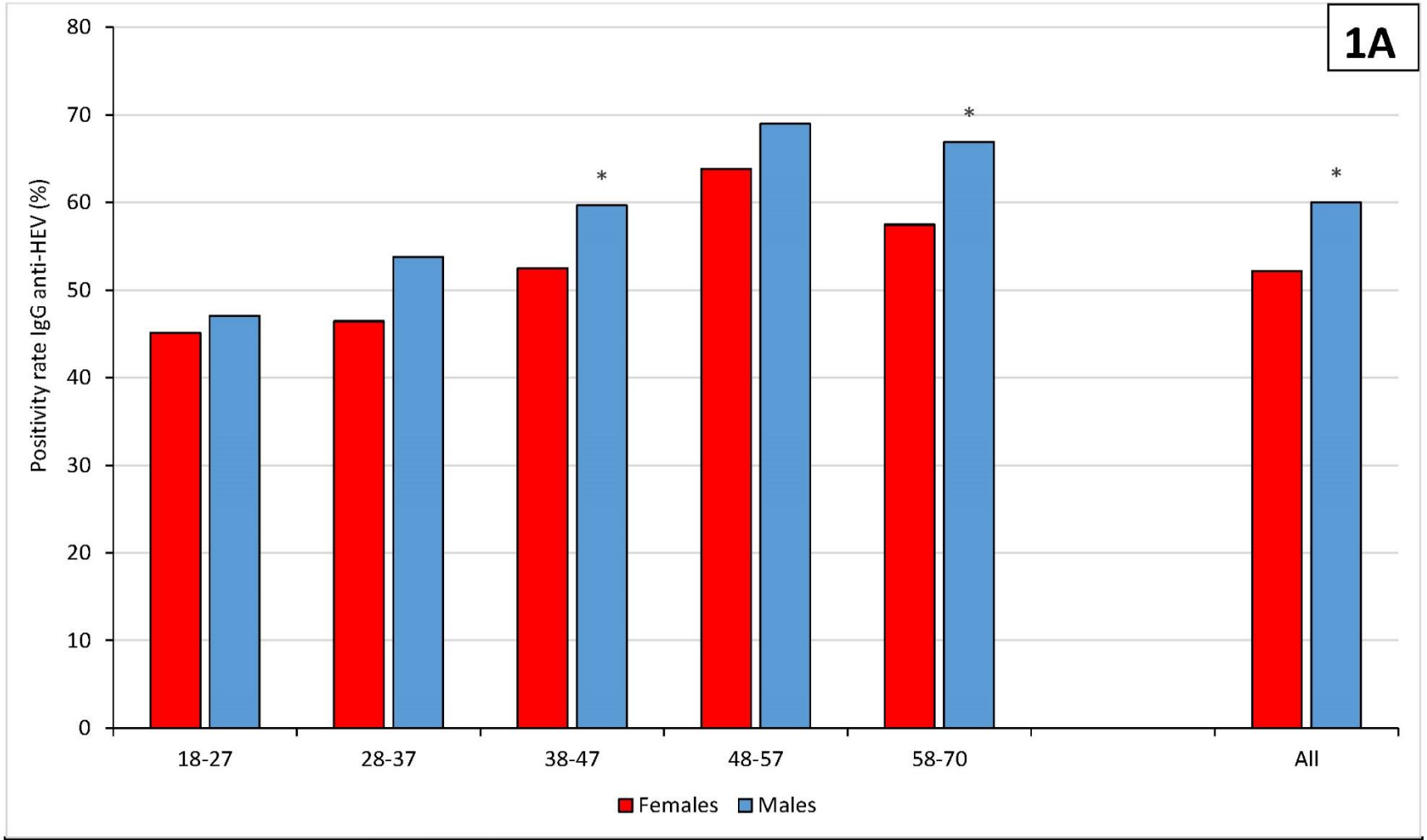


Figure 1: Distribution of anti-HEV IgG seroprevalence in age groups. Figure 1A: distribution by sex (red bars = females & blue bars = males). Figure 1B: by place of birth of blood donors living in Corsica (grey bars = native of Corsica and orange bars = non-native of Corsica). This asterisk (*) means that, for a given age-group, the two values between variables (sex in figure 1A and place of birth for figure 1B) are significantly different (p value < 0.05).

Figure 1B

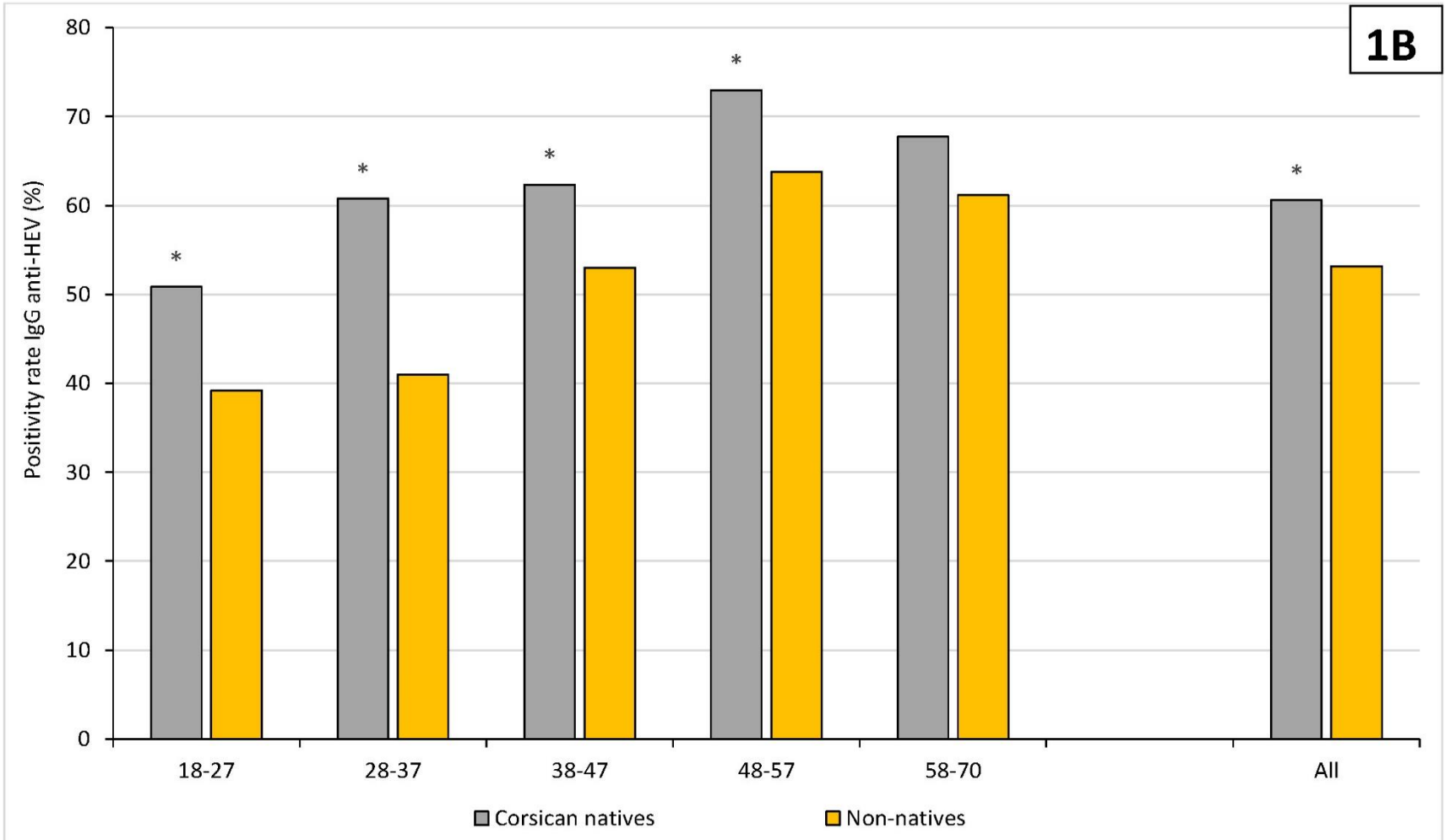


Figure 1: Distribution of anti-HEV IgG seroprevalence in age groups. Figure 1A: distribution by sex (red bars = females & blue bars = males). Figure 1B: by place of birth of blood donors living in Corsica (grey bars = native of Corsica and orange bars = non-native of Corsica). This asterisk (*) means that, for a given age-group, the two values between variables (sex in figure 1A and place of birth for figure 1B) are significantly different (p value < 0.05).

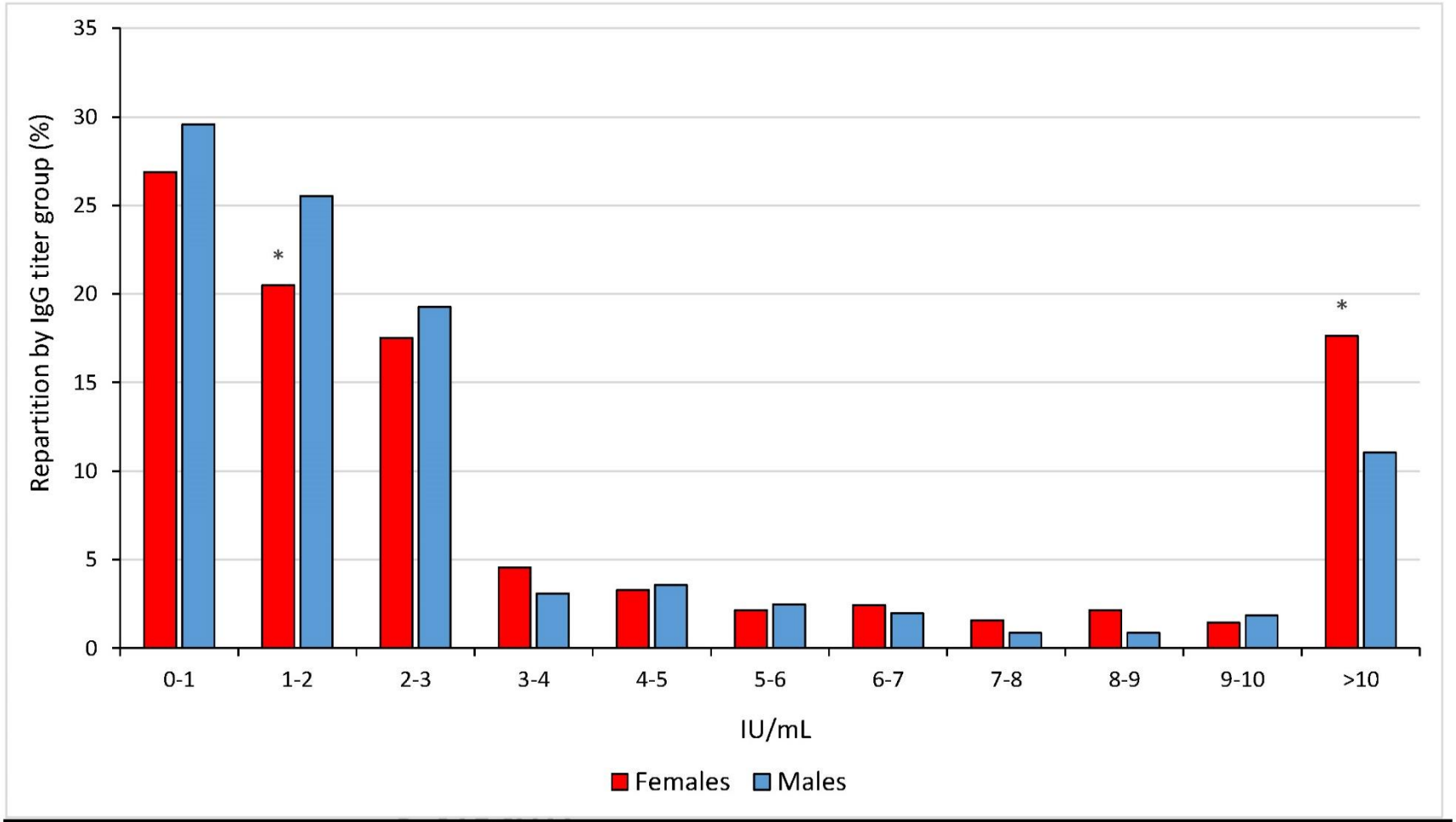


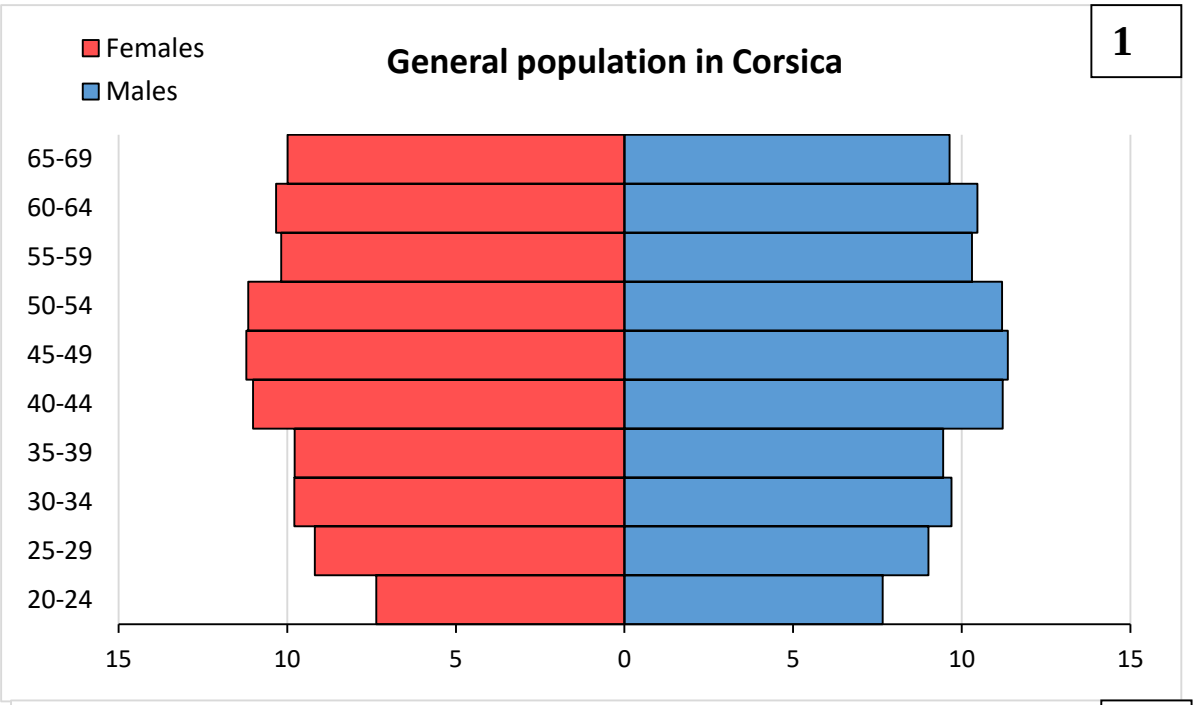
Figure 2: Distribution of anti-HEV IgG titre (IU/mL) estimated using the WHO standard 95/584 according to sex (females = red bars; males = blue bars). This asterisk (*) means, for a given titre, that values between sex are significantly different (p value < 0.05).

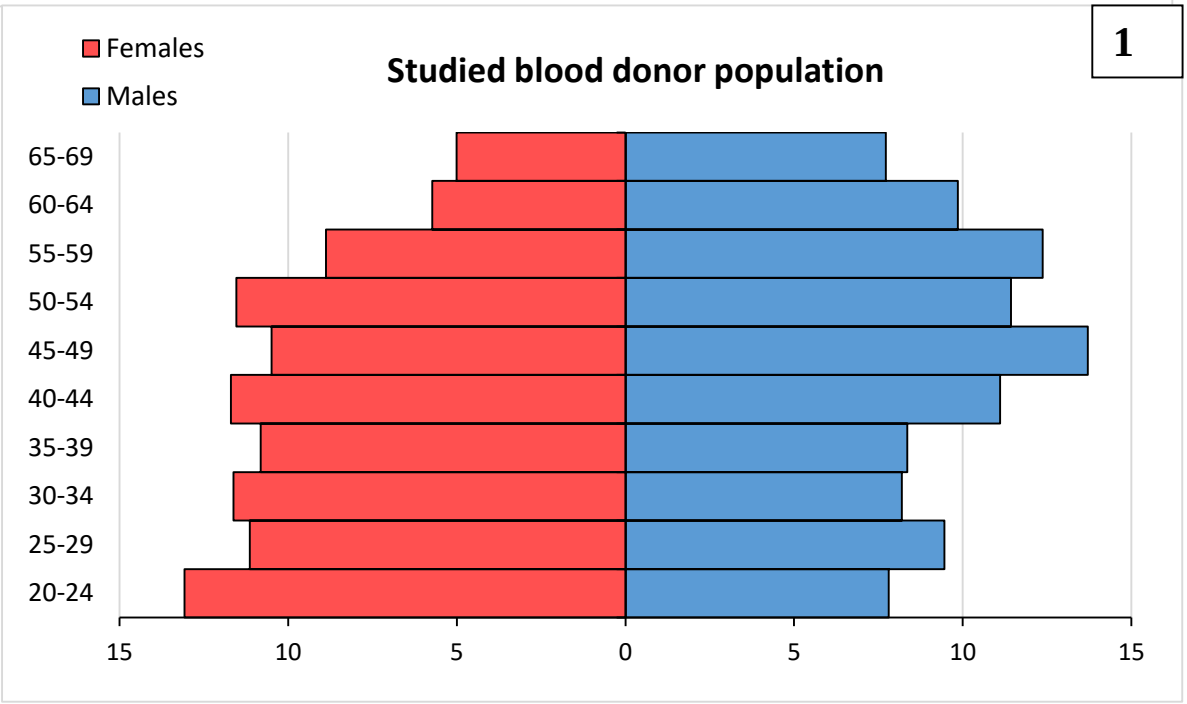
Copy

Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.

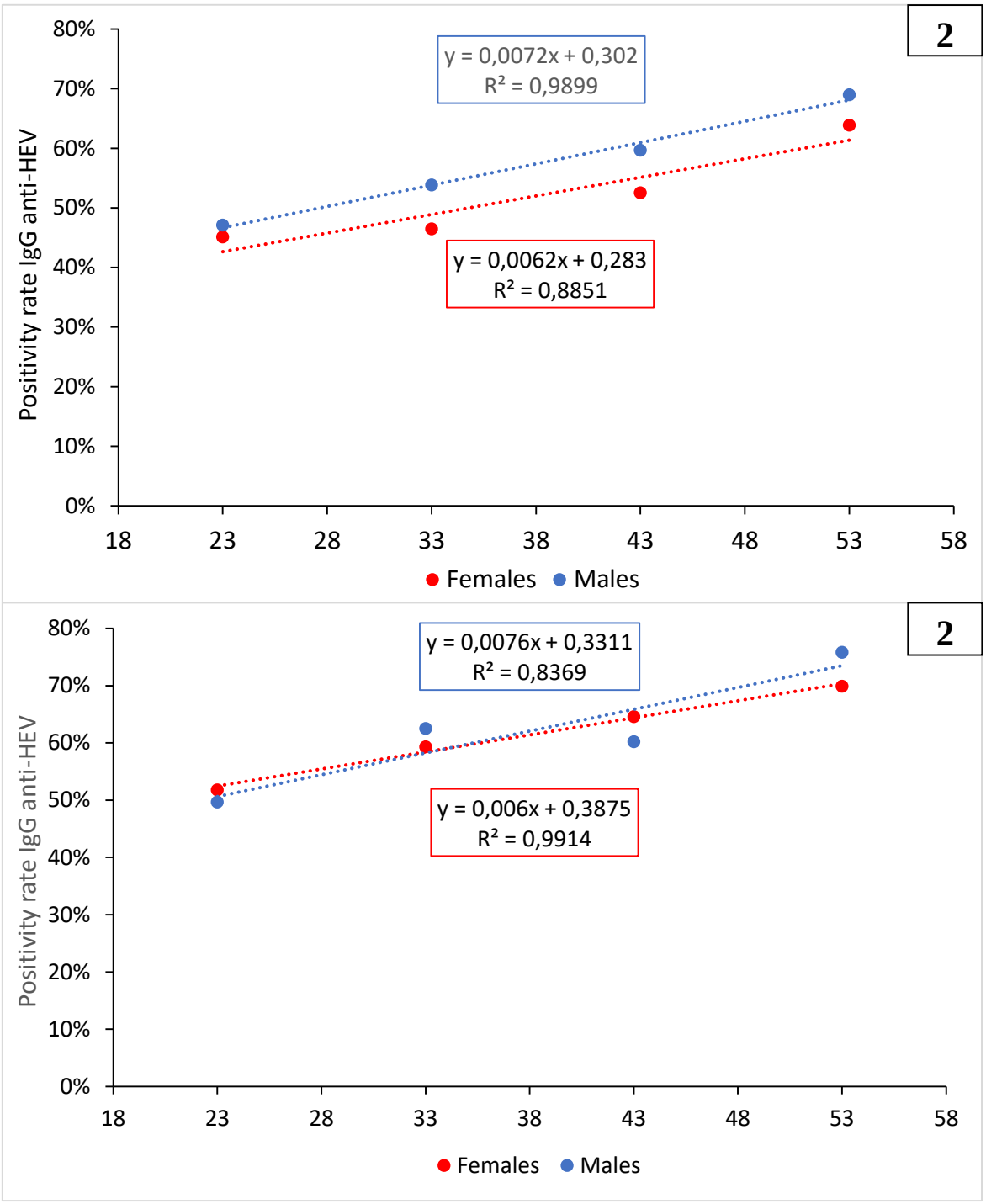
Supplemental material

Disclaimer: This supplementary material is hosted by *Eurosurveillance* as supporting information alongside the article [Seroprevalence of Hepatitis E virus among blood donors in Corsica, France, 2017.], on behalf of the authors, who remain responsible for the accuracy and appropriateness of the content. The same standards for ethics, copyright, attributions and permissions as for the article apply. Supplements are not edited by *Eurosurveillance* and the journal is not responsible for the maintenance of any links or email addresses provided therein.

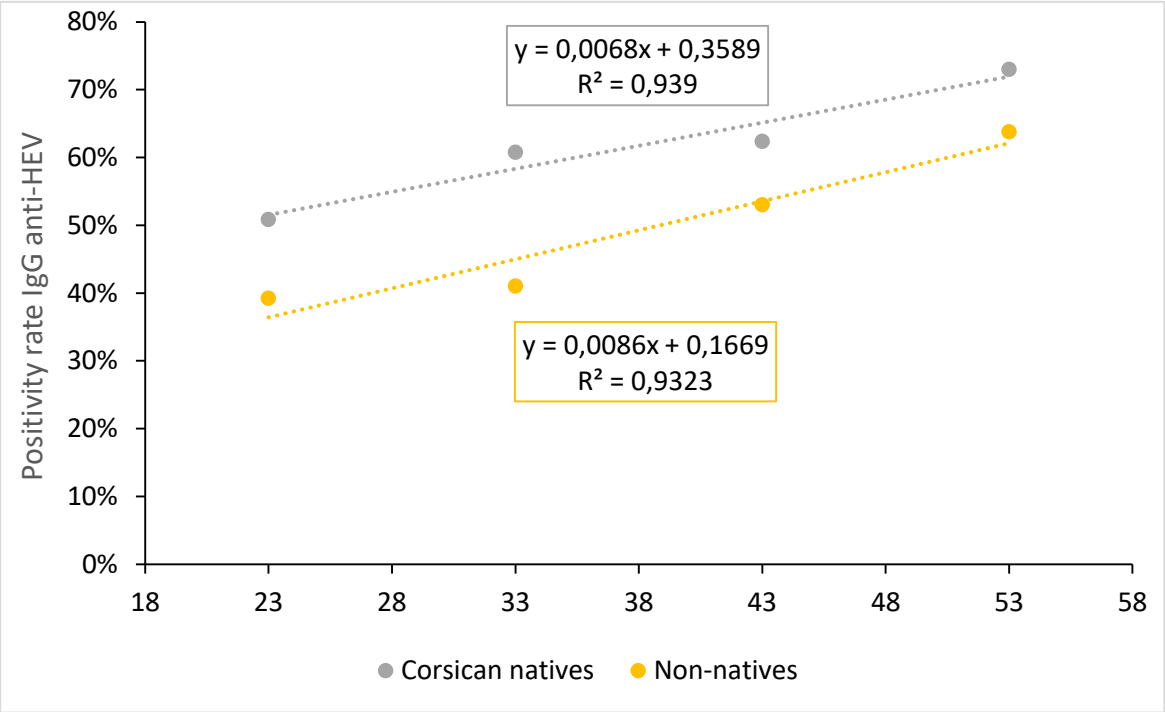




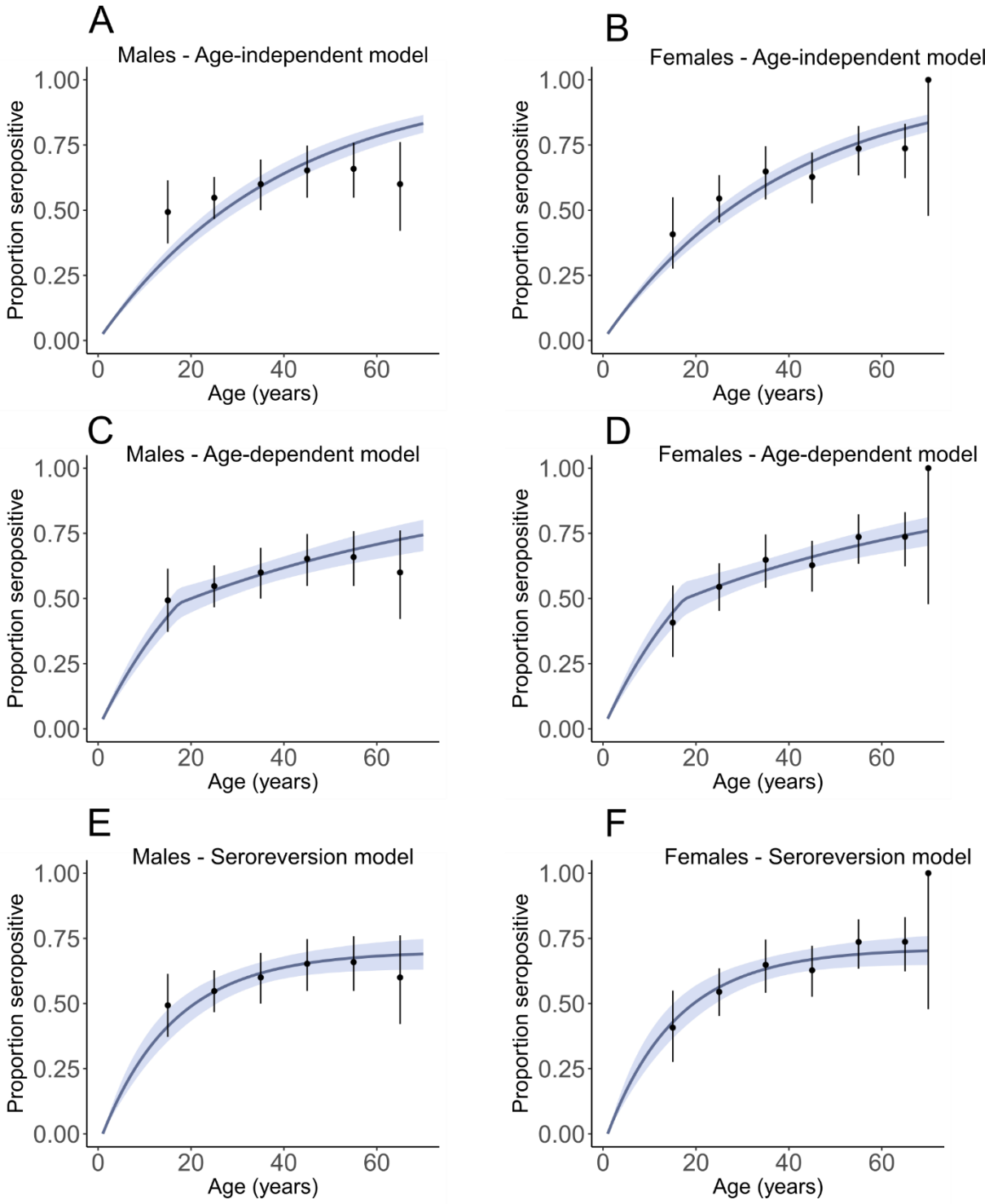
Supplemental Figure S1: demographic characteristics of general population in Corsica (1A) and the studied blood donor population (1B). Data in general population (2018) were obtained from the National Institute of Statistics and Economic Studies (INSEE), (https://www.insee.fr/fr/statistiques/3696315).



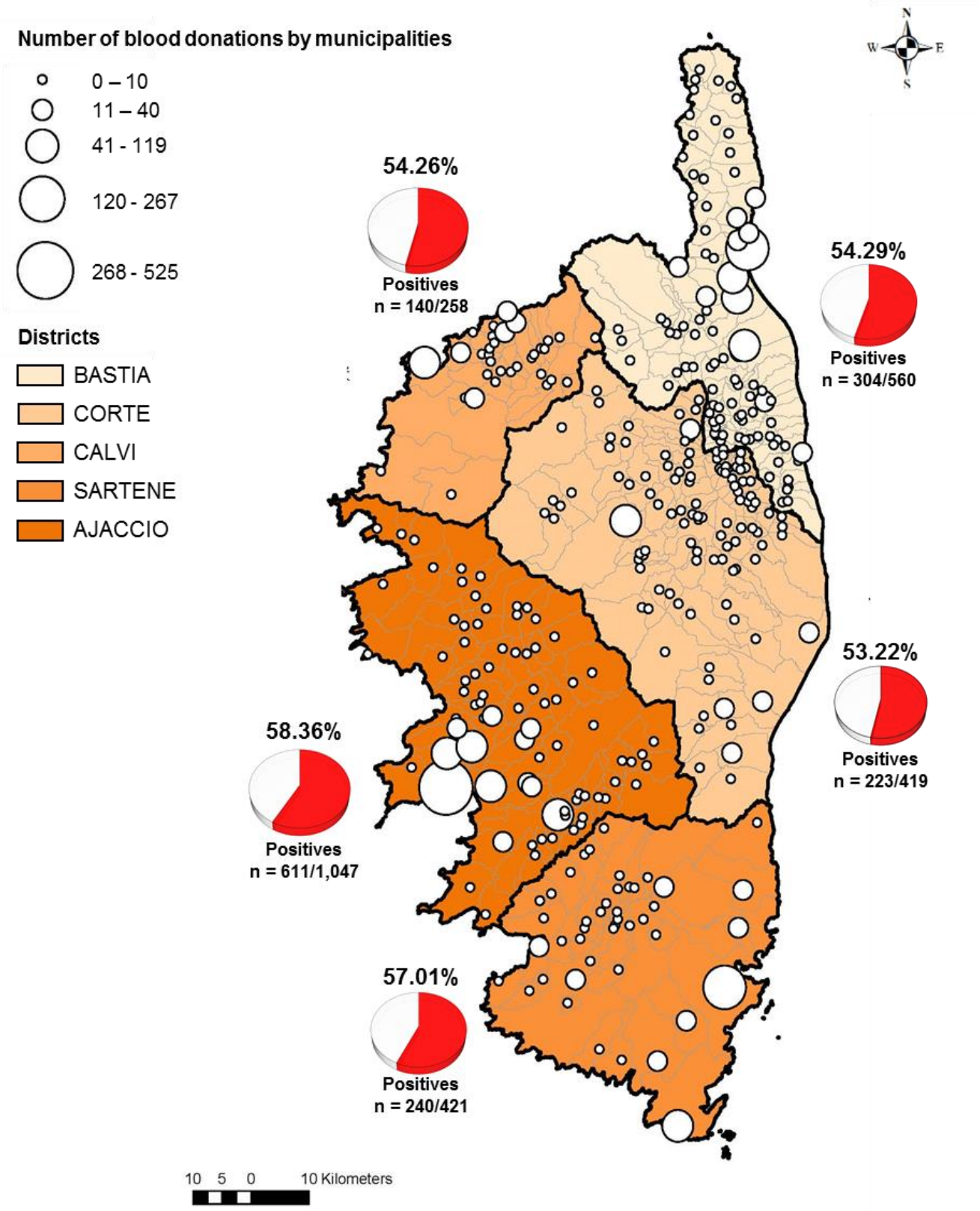
Supplemental Figure S2: HEV seroprevalence in age groups. Distribution by sex: red = females, blue = males. **Figure S2A:** all blood donors tested. **Figure S2B:** Natives of Corsica. In these graphs, in x axis, median age for each age group was used.



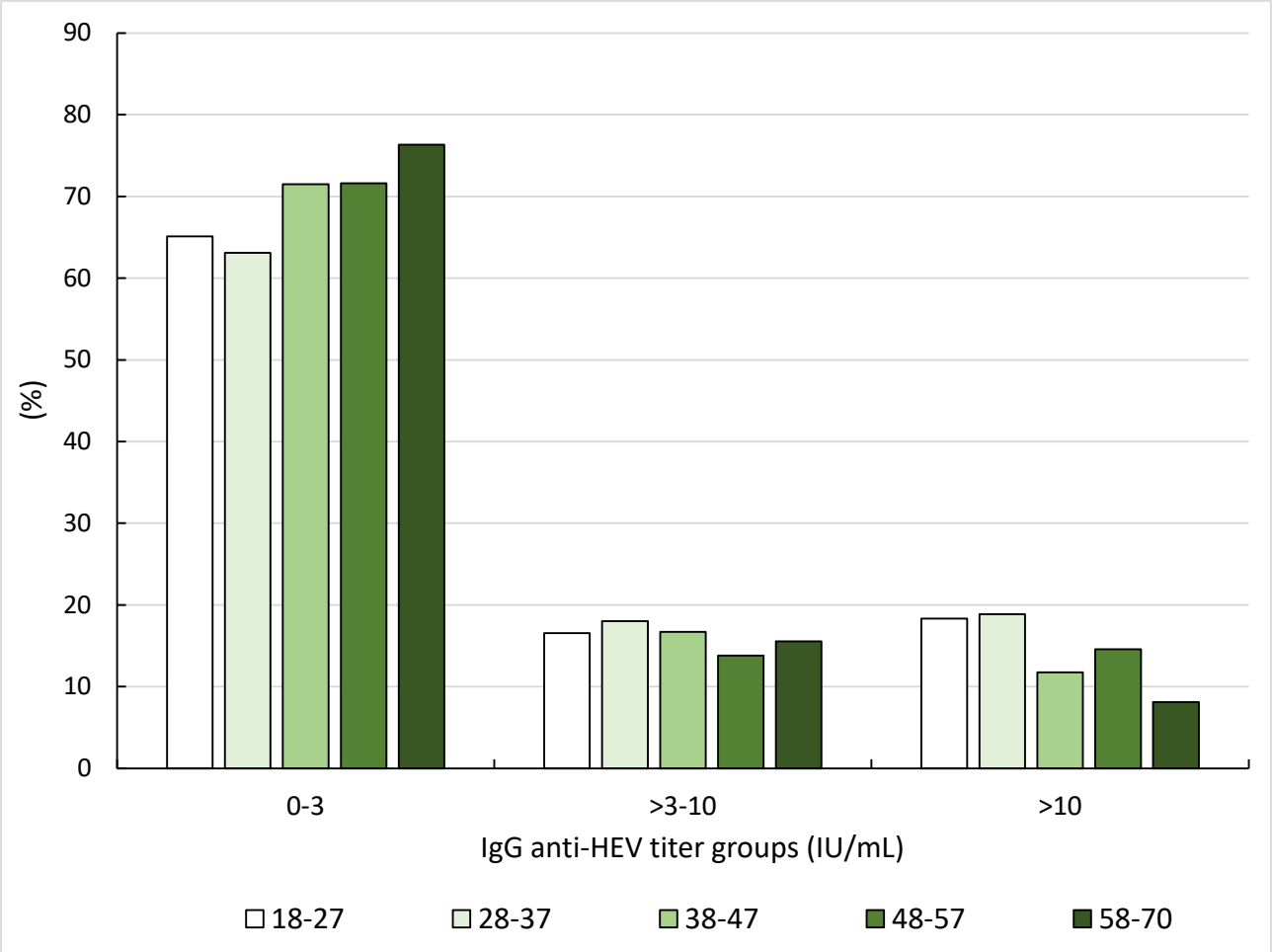
Supplemental Figure S3: HEV seroprevalence among native (grey) and non-native (yellow) of Corsica. In these graphs, in x axis, median age for each age group was used.



Supplemental Figure S4: Adequacy of serocatalytic models to age seroprevalence for native males and native females. We fit models where the force of infection is age-invariant ("age independent model", panels A & B) and age-dependent ("age-dependent model", panels C & D) as well as a reversible catalytic model ("seroreversion model", panels E & F). Black points and bars represent the mean and 95% binomial confidence intervals from the data, respectively. The solid blue line is the mean age seroprevalence obtained from the model fit and the envelope is the 95% credible interval.



Supplemental Figure S5: Geographical distribution and number of blood donations (white circles) collected during the study according to the place of residence (municipality) and anti-HEV IgG seroprevalence in the 5 districts of Corsica (pie charts). The map was performed with the ARCGIS software (https://www.esri.com/arcgis/).



Supplemental Figure S6: Distribution of anti-HEV IgG titre (IU/mL) (estimated using the WHO standard 95/584) according to age groups.

Chapitre 2 : Caractérisation de l'immunité grégaire vis-à-vis de l'hépatite E de la population adulte corse et détermination des facteurs associés

Résumé et résultats majeurs de l'article : Seroprevalence study of anti-HEV IgG detection among different adult populations in Corsica, France, 2019.

Comme vu précédemment dans l'introduction et l'article de revue #1, la France est une région particulièrement touchée par le HEV en comparaison avec les autres pays industrialisés. Elle présente un taux global de séroprévalence nationale de 22,4% (Mansuy *et al.*, 2016) et des taux de sujets virémiques de 1/2218 et de 1/744 chez les donneurs de sang (Gallian *et al.*, 2014 ; Gallian *et al.*, 2017). De plus, il existe des régions d'hyperendémie (taux >50%), notamment les régions PACA, Occitanie et Corse ayant des taux de séroprévalence IgG anti-HEV autour de 60%. La Corse possède une situation particulière que ce soit sur le plan géographique, culturel ou zoonotique. En effet, la filière porcine en Corse est un réservoir très important avec 100% des élevages étudiés qui possédait au moins un animal séropositif et un taux de séroprévalence IgG des porcs de 88% (Jori *et al.*, 2016).

De plus, traditionnellement durant la période hivernale, un aliment à risque y est largement consommé. Il s'agit du *ficatellu*, un produit à base de foie de porc dans lequel le HEV a déjà été retrouvé (Pavio *et al.*, 2014). De nombreuses zones rurales sont également présentes en Corse et une certaine proximité avec la faune existe. Malgré certains facteurs déjà reconnus, des questions subsistent quant à d'autres voies de transmission que ce soit en Corse ou dans d'autres régions hyperendémiques d'Europe. En effet, on peut se questionner sur la responsabilité unique du *ficatellu* pour arriver à des séroprévalences si élevées. Le HEV est un virus résistant dans l'environnement, particulièrement dans l'eau et au niveau du sol. Un rapport de la qualité de l'eau en Corse en 2016 (Agence Régionale de la Santé, 2017), a montré que dans certaines petites communes, la qualité de l'eau n'était pas satisfaisante. L'eau de consommation pourrait être également à risque dans certains villages mais cela doit être démontré. Le HEV étant présent fortement dans les élevages porcins, il peut également se retrouver dans les cours d'eaux en aval de certains élevages, et donc contaminer d'autres animaux, voir l'homme.

C'est autour de l'ensemble de ces interrogations que le questionnaire joint au prélèvement sanguin a été conçu. En effet, en plus des données sociodémographiques classiques, ce questionnaire comprend des items sur les habitudes alimentaires, le contact avec des eaux usées, la consommation d'eau en bouteille ou du robinet, la proximité avec des élevages etc. Ce questionnaire doit permettre de renseigner les liens entre présence d'IgG anti-HEV et des facteurs de risque potentiels ; avec comme conséquence la possibilité d'ouvrir des perspectives sur des études de détection du virus dans certains milieux ou autres animaux que les suidés.

Les résultats majeurs de cette étude SEROMED sont résumés dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude SEROMED

Séroprévalence globale	930 échantillons	52,3%
Séroprévalence par population	Donneurs de sang Etudiants et personnel universitaire Patients de médecine générale	54,4% 47,6% 64,3%
Séroprévalences par classe d'âge	18-27 ans ➔ 42,8% 28-37 ans ➔ 55,5% 38-47 ans ➔ 54,2% 48-57 ans ➔ 57,7% 58-70 ans ➔ 69,1% Plus de 70ans ➔ 72,2%	
Facteurs associés à la détection des IgG anti-HEV	Age croissant	p-value = 0,00272
	Consommation de *ficatellu*	Odds ratio = 2,22 [1,45-3,45] p-value = 0,00023
	Consommation de *fittonu*	Odds ratio = 1,95 [1,45-2,64] p-value = 0,00001
	Eviscération et dépeçage	Odds ratio = 2,76 [1,51-5,37] p-value = 0,00077
Tendances	Tendances observées pour des variables associées à l'environnement	Baies sauvages, eaux de sources en montagne, eaux de fontaines dans les villages, fruits de mer…

Cette étude transversale a déterminé une séroprévalence des IgG anti-HEV supérieure à 50%, dans la population adulte corse, homogène entre les populations, augmentant avec l'âge et non significativement différente entre les hommes et les femmes. Enfin, nous avons identifié une forte association entre la consommation de *ficatellu / fittonu* et la pratique du dépeçage et de l'éviscération avec la détection d'IgG anti-HEV parmi les trois populations étudiées.

L'article ci-dessous (Figure 12) a été publié le 16 octobre 2019 dans le journal Microorganisms (IF = 4,167) dans le cadre d'une Special Issue "Hepatitis E Virus, an Emergent Foodborne Pathogen? Public Health Implications".

microorganisms

MDPI

Article

Article

Seroprevalence Study of Anti-HEV IgG among Different Adult Populations in Corsica, France, 2019

Lisandru Capai [1,*], Shirley Masse [1], Pierre Gallian [2,3], Cécile Souty [4], Christine Isnard [2,3], Thierry Blanchon [4], Brigitte Peres [2], Xavier de Lamballerie [3], Rémi Charrel [3] and Alessandra Falchi [1,*]

[1] EA 7310, Laboratoire de Virologie, Université de Corse, 20250 Corte, France; masse_s@univ-corse.fr
[2] Etablissement Français du Sang Provence alpes Côte d'Azur et Corse, 13005 Marseille, France; pierre.gallian@efs.sante.fr (P.G.); Christine.ISNARD@efs.sante.fr (C.I.); Brigitte.PERES@efs.sante.fr (B.P.)
[3] Unité des Virus Émergents (UVE), Aix Marseille Univ, IRD 190, INSERM 1207, IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France; xavier.de-lamballerie@univ-amu.fr (X.D.L.); remi.charrel@univ-amu.fr (R.C.)
[4] Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), F-75012 Paris, France; cecile.souty@iplesp.upmc.fr (C.S.); thierry.blanchon@iplesp.upmc.fr (T.B.)
* Correspondence: capai_l@univ-corse.fr (L.C.); falchi_a@univ-corse.fr (A.F.); Tel: +33-(04)-9545-0155 (L.C.); +33-(04)-9545-0677 (A.F.)

Received: 9 September 2019; Accepted: 15 October 2019; Published: 16 October 2019

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of acute hepatitis worldwide. In France, hyperendemic areas including Corsica have an anti-HEV Immunoglobulin G (IgG) prevalence higher than 50%. The aim of this study was to determine the seroprevalence of anti-HEV IgG in three adult populations in Corsica and the risk factors associated with antibody detection. Between 2017 and 2019, a total of 930 individuals, including 467 blood donors, 393 students or university staff members and 70 patients from general practice, were tested for the presence of anti-HEV IgG using the Wantai HEV IgG enzyme immunoassay kit and filled a questionnaire. The association between seropositivity and potential risk factors was tested with univariate and multivariate analyses. Out of the 930 samples, 52.3% (486/930) were seropositive—54.4% (254/467) among blood donors, 47.6% (187/393) among university students and 64.3% (45/70) among patients of general practice. Three main risk factors were identified: (i) skinning and butchering (Adjusted Odds Ratio aOR = 2.76, 95% confidence interval [95% CI] [1.51–5.37]; p-value < 10^{-3}), (ii) consumption of a local pork live raw sausage (fittonu) (aOR = 1.95 95% CI [1.45–2.64]; p-value = 10^{-5}), and (iii) increasing age (p-value = 0.003). Seropositivity rates between the different populations were homogeneous after age stratification. This cross-sectional study indicates a high anti-HEV IgG seroprevalence in the Corsican adult population, not significantly different between women and men and increasing with age. This serosurvey also showed homogeneity regarding the exposure to HEV among three different types of populations. Finally, we confirmed the endemicity of Corsica with respect to HEV and identified a strong association between consumption of figatellu/fittonu and the practice of skinning and butchering with the detection of anti-HEV IgG.

Keywords: seroprevalence; hepatitis E; IgG; risk factor; corsica; hyperendemic; hepatitis; France

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) possesses a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7.5 kb which contains three separate open reading frames (ORFs) [1-2]. This virus belongs to family *Hepeviridae* (genus *Orthohepevirus*) [3]. Viral strains infecting humans are classified into five genotypes (HEV-1 to HEV-4 and HEV-7) [4], but belong to a single serotype.

Genotypes HEV-3 and 4 are zoonotic pathogens infecting domestic (e.g., pigs) and wild animal species (e.g., boars, deers) which constitute the animal reservoir [5]. They are mainly detected in industrialized countries and are responsible for sporadic and autochthonous cases [1, 6]. In Europe, the majority of cases is due to HEV-3 genotype and HEV is the most common cause of acute viral hepatitis [7].

A recent meta-analysis describing the HEV seroprevalence in industrialized countries, based on studies using the Wantai HEV Immunoglobulin G (IgG) enzyme immunoassay, reported an overall seroprevalence of 19% [14%–25%], with great heterogeneity between countries and regions (<5% in New Zealand to >50% among French regions) [8].

The largest seroprevalence study conducted in France on 10,569 blood donors reported a 22.4% (95% [CI] 21.6%–23.2%) rate with significant geographical differences and the identification of hyperendemic areas (prevalence >50%) in southern and northeastern regions [9]. The presence of anti-HEV IgG was associated with increasing age and the consumption of pork/pork liver sausages/wild game meat/offal/oysters. Conversely, drinking bottled water was associated with a lower rate of anti-HEV IgG [9]. A national report on the surveillance of HEV in France has highlighted a sharp increase (9 to 2292) in the number of autochthonous cases reported to the public health authorities between 2002 and 2016 [10]. This apparent increase is likely due (i) to improved diagnostic tests and (ii) to better awareness among physicians and in the general population, resulting in increased testing rather than a true epidemic situation. However, seroprevalence data (rates >50%), the hospitalization rate per 100,000 inhabitants, and the total number of prescribed serological tests underline the hyperendemicity of HEV in southern France.

In Corsica, a French Mediterranean island, the seroprevalence was estimated at 62% [9]. The main risk factor observed in Corsica seems to be the consumption of raw pig liver sausage (figatellu [plural: figatelli]; small liver in the Corsican language) which is traditionally eaten grilled. Indeed, grouped cases of HEV have been described and related to its consumption [11-12]. Pavio et al. (2014) described the presence of HEV RNA in 30% of tested figatelli. In Corsica, other behaviors may correlate with higher exposure to HEV such as the frequent practice of hunting, the consumption of food products derived from the porcine reservoir (figatellu and fittonu) and the existence of important rural areas.

Except for specific groups of patients (immunodepressed patients, transplanted patients, etc.), the population of blood donors is the largest group for which HEV seroprevalence studies have been performed [13-14]. Here, we recruited two additional populations to evaluate whether exposure to HEV was similar or different in other adult populations.

There is a lack of in-depth information about the actual impact of transmission route links with the porcine reservoir and other alternative sources of contamination (including environmental sources) on the epidemiology of HEV in Corsica. The main objective of this study was to improve the knowledge about the epidemiology of HEV in Corsica island, using a seroprevalence study including a large cohort of adults consisting of blood donors, general practitioner patients and staff and students of the University of Corsica. The present study gives new insights into the epidemiology of HEV in an endemic area of metropolitan France.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The study received approval from the medical and scientific direction of the French Public Transfusion service (Établissement Français du Sang: EFS) and from the ad hoc ethics committee (Comité de Protection des Personnes #2016-A01000-51, 11 January 2017). The questionnaire and all data collected were validated by the data protection officer of the University of Corsica (UCPP). All participants were included on a voluntary non-remunerated basis. They were informed that samples will be used for seroprevalence studies by a letter of information and they signed a consent form.

2.2. Study Populations

Participants were included in the study if they declared living in Corsica for at least six months, at enrolment.

Population A Blood donors (BD): Voluntary blood donors accepted for classical donation according to the national requirements and agreeing to complete the questionnaire were included from 11 March 2019 to 15 April 2019.

Population B University of Corsica Pascal Paoli (UCPP): Students and personnel of the UCPP were included from January 2017 to January 2019 on the different campuses of the UCPP.

Population C Patient from General Practice (PGP): Patients from general practice >18 years old were recruited by General Practitioners (GPs) from June 2017 to September 2017. All participants were informed about the study by letter or during a face-to-face discussion with a member of the health staff.

2.3. Questionnaire

The questionnaire contained information about socio-demographical variables (age, gender, educational level, professional activities, type of dwelling, and sewage disposal), clinical factors (presence of chronic diseases, transplantation, blood transfusion, immunosuppression, and a past HEV infection during the life of the individual), contact with animals (pets and/or domestic farm animals), the consumption of meat (big game, little game, pork, beef, poultry, giblets, and pork liver), derived meat products (figatellu, fittonu, pâté/terrine, and sausages), fish and shellfish (seafood), organic fruits and vegetables or personal vegetable garden, wild berries and the source of drinking water (bottled, tap, mountain water sources, and fountains). We also recorded the type of cooking levels (raw, rare, medium, and well cooked) (items listed in Appendix A). Only the UCPP and PGP populations were asked as to clinical factors (presence of chronic diseases, transplantation, blood transfusion, immunosuppression, and a past HEV infection during the life of the individual).

The survey was conducted in the presence of knowledgeable medical personnel to ensure the accuracy of data collection.

2.4. Blood Samples and Laboratory Methods

2.4.1. Blood Samples

The blood samples obtained from blood donors corresponded to EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) tubes collected systematically during the standard protocol. Samples from the UCPP and PGP groups were from capillary blood and were obtained using a safety lancet on a cleansed puncture finger that was collected into 0.8 mL tubes containing a coagulation activator and serum separator; these tubes were centrifuged at 6000 rpm for 15 min and the resulting serum was stored at −20 °C until processed for serology.

2.4.2. Anti-HEV IgG Detection

Serum samples were analyzed for the presence of anti-HEV IgG (EFS Provence-Alpes-Côtes-d'Azur & Corse, Marseille, and Laboratoire de Virologie Université de Corse) using the Wantai HEV IgG enzyme immunoassay kit (Wantai Biologic Pharmacy Enterprise, Beijing, PRC). The assay is based on a recombinant antigen corresponding to open reading frame 2 [15], the analytical and clinical performances of which were evaluated recently with a specificity and sensitivity of 97.96% and 99.60%, respectively [16]. Analyses were performed according to the manufacturer's instructions. For each sample, the ratio (sample OD/cutoff OD) was calculated and values ≥1 were positive. This assay was chosen in order to be in line with our previous work and to compare our results with the main French serosurvey [9] and the majority of European seroprevalence studies. In addition, this test is used by the National Reference Center for Hepatitis E in France.

2.5. Statistical Analysis

2.5.1. Sample Size

The sample size was calculated according to previously described methods [17]. A sample size of 384 was calculated assuming an a priori 50% anti-HEV seroprevalence, a confidence in the estimate of 95%, a maximum allowable error in the prevalence of 5%, and a Corsican population size of 330,455 habitants (based on the latest French census data).

2.5.2. Seroprevalence and Epidemiological Factors Analysis

Descriptive statistics were performed for all variables. Continuous data were reported as medians with interquartile ranges (IQRs). All categorical data were reported as percentages.

HEV seroprevalence (IgG) and its 95% exact binomial confidence intervals (CIs) were estimated for each population and overall. Frequencies were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test (p-value < 0.05).

Associations between explanatory variables (socio-demographic, lifestyle factors and eating habits) and having anti-HEV IgG were tested in univariate analyses for each population and overall. All variables with a p-value below 0.2 were included in the multivariate analyses using an unconditional logistic regression model. Statistical significance was set at a p-value <0.05. We also performed a logistic regression model with a random effect at the population level, taking into account that the people included came from different subpopulations. We used R packages (questionr, stats and lme4-package) and function glmer and glm. All statistical analyses were performed using the R program [18].

3. Results

A total of 930 individuals were included in the study: 467 BD, 393 UCPP, and 70 PGP (Figure 1). The characteristics of the three groups are presented in Table A1.

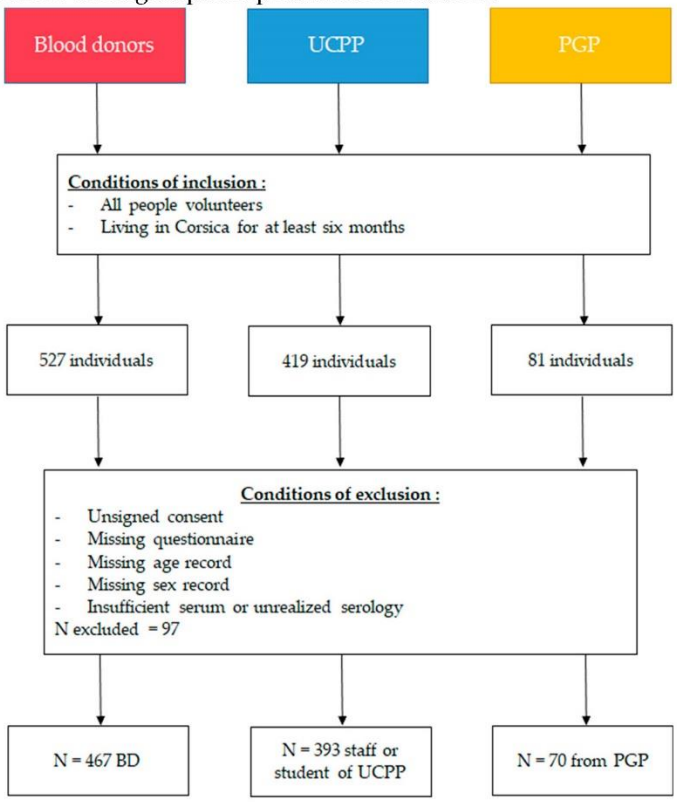


Figure 1. Flowchart for the inclusion and exclusion of studied populations.

The overall median age was 32 years (IQR: 22–49). The median age of BD was 38 years (IQR: 28–52), 24 years (IQR: 20–35) for UCPP and 55 years (IQR: 44–67) for GP. Age and gender distributions differed significantly when we compared the three groups.

Among the PGP and UCPP groups, no participant was declared to have knowledge of previous infection due to HEV (0/463).

3.1. Anti-HEV IgG Seroprevalence

Anti-HEV IgG were detected in 54.4% (n = 254) (IC 95% [49.8–58.9]) of the BD group, in 47.6% (n = 187) (IC 95% [42.6–52.5]) of the UCPP group and in 64.3% (n = 45) (IC 95% [53.1–75.5]) of the PGP group (Table 1). Prevalence differed significantly among the three populations (p-value = 0.015).

Males had higher rates compared with females in each of the three groups, but significantly higher only in BD and globally (p-value = 0.00169 and 0.00009, respectively) (Table 1).

Seroprevalence according to age groups and to population groups is presented in Figure 2. Among the UCPP and PGP populations, there was no significant difference between the different age groups (same letter). In BD, seroprevalences of the youngest age group (18–27) and the oldest (58–70) were significantly different (p-value < 0.05 illustrated by letters a and c). Globally, the seroprevalence of the youngest age group (18–27) was significantly different compared with all other age groups. Between the 28 to 57 years age groups, there was a plateau with observed rates that were very close to each other (54.2% to 57.7%; letter b in common), followed by two higher seroprevalences of 69.1% and 72.2% for the oldest age groups (58–70 and > 70 years) (Figure 2). For a given age group, the seroprevalence rates are not significantly different between the three groups (all p-values > 0.05).

3.2. Risk Factors Associated with Anti-HEV IgG Seroprevalence

3.2.1. Univariate Analysis

Results of univariate analyses and seroprevalences by variable are presented in Table 1.

In the BD group, fourteen variables were significantly associated with higher seropositivity rates (p-value < 0.05): age groups, male (OR = 1.81 [1.25–2.64]), breeding (OR = 2.79 [1.15–7.78]), skinning and butchering (OR = 3.05 [1.07–10.88]), fountain water (OR = 1.58 [1.08–2.33]), mountain spring waters (OR = 1.76 [1.2–2.6]), big wild game (OR = 1.8 [1.23–2.65]), pork (OR = 2.95 [1.36–6.92]), sausages and pâtés (OR = 2.47 [1.37–4.62]), liver (OR = 1.82 [1.2–2.77]), figatellu (OR = 4.14 [2.37–7.53]), fittonu (OR = 2.6 [1.76–3.86]), offal (OR = 1.86 [1.25–2.78]) and wild berries (OR = 1.57 [1.07–2.31]).

In the UCPP group, the exposure for ten variables presented significantly higher seroprevalences: hunting (OR = 2.24 [1.17–4.45]), skinning and butchering (OR = 2.73 [1.37–5.75]), big wild game (OR = 1.84 [1.19–2.88]), pork (OR = 3.26 [1.35–9.09]), sausages and pâtés (OR = 2.6 [1.11–6.78]), liver (OR = 1.56 [1.01–2.42]), figatellu (OR = 2.71 [1.53–4.98]), fittonu (OR = 2.24 [1.47–3.42]), offal (OR = 1.78 [1.15–2.76]) and shellfish (OR = 1.98 [1.17–3.45]).

In the PGP group, eight variables were significantly associated with a higher anti-HEV IgG detection rate: hunting (OR = INF), skinning and butchering (OR = INF), tap water (OR =3.66 [1.14–12.58]), mountain spring waters (OR = 2.89 [1.01–9.21]), big wild game (OR = 3.14 [1.1–9.25]), fittonu (OR = 4.08 [1.46–12.47]), beef (OR = 8.38 [1.15–169.46]) and wild berries (OR = 3.38 [1.21–10.26]).

Only three variables were significantly associated with anti-HEV IgG in the three populations: skinning/butchering, big wild game, and consumption of fittonu.

The mean increase in seroprevalence for the practice of skinning and butchering is +25% (the increases ranged between +16% and +40% according to population) and +23% for consumption of fittonu (the increases ranged between +20% and +31% according to population). People who reported eating big game had a higher seroprevalence of 20% compared to those who did not eat it (45.1% vs. 59.7% among BD; 36.6% vs. 51.5% among UCPP and 45.5% vs. 72.3% among PGP).

Cooking types (overall population values in the Appendix A2) and clinical factors (data not shown) were not associated with anti-HEV IgG-seropositivity (p-value > 0.05) overall and among each population.

3.2.2. Multivariate Analysis

In multivariate analysis (Table 2), "skinning and butchering" and "consumption of fittonu" remained independent predictors for anti-HEV IgG seropositivity in each population. Male and consumption of figatellu were associated with anti-HEV IgG detection only in the BD population (*p*-value = 0.03 and < 10^{-3} respectively).

In overall multivariate analyses (glm and lmer) "skinning and butchering" (aOR = 2.76; 95% CI 1.51–5.37), "consumption of fittonu" (aOR = 1.95; 95% CI 1.45–2.64) and of "figatellu" (aOR = 2.22; 95% CI, 1.45–3.45) were associated with anti-HEV detection. Increasing age was also significantly associated with anti-HEV IgG detection in the overall multivariate analysis (*p*-value = 0.003) (Table 2).

Table 1. Seroprevalence and factors associated with anti-Hepatitis E virus (HEV) IgG detection (univariate analysis). Significant p-values < 0.05 are followed by an asterisk.

INF: Infinite NA: Missing Values		BD					UCPP				
		n	Anti-HEV IgG Positive		OR [95% CI]	*p*-Value	*n*	Anti-HEV IgG Positive		OR [95% CI]	*p*-Value
Parameters	**Variables**		*n*	%				*n*	%		
Gender	Female	266	128	48.1	Reference	**0.00169 ***	244	107	43.9	Reference	0.05807
	Male	201	126	62.7	1.81 [1.25–2.64]		149	80	53.7	1.48 [0.99–2.24]	
Age groups	18–27	126	55	43.7	Reference	**0.00633 ***	242	102	42.1	Reference	0.07139
	28–37	101	58	57.4	1.74 [1.03–2.97]		67	35	52.2	1.5 [0.87–2.59]	
	38–47	83	40	48.2	1.2 [0.69–2.1]		35	21	60.0	2.06 [1.01–4.32]	
	48–57	84	52	61.9	2.1 [1.2–3.71]		34	18	52.9	1.54 [0.75–3.2]	
	58–70	73	49	67.1	2.64 [1.46–4.87]		11	8	72.7	3.66 [1.03–17.02]	
	70			NA			4	3	75.0	4.12 [0.52–83.9]	
Hunting	No	447	240	53.7	2.01 [0.79–5.77]	0.14486	350	159	45.4	2.24 [1.17–4.45]	**0.01428 ***
	Yes	20	14	70.0			43	28	65.1		
Breeding	No	442	235	53.2	2.79 [1.15–7.78]	**0.02165 ***	366	173	47.3	1.2 [0.55–2.66]	0.64555
	Yes	25	19	76.0			27	14	51.9		
Skinning and butchering	No	449	240	53.5	3.05 [1.07–10.88]	**0.03549 ***	354	160	45.2	2.73 [1.37–5.75]	**0.00403 ***
	Yes	18	14	77.8			39	27	69.2		
Contact with wastewater	No	450	243	54.0	1.56 [0.58–4.6]	0.37978	383	181	47.3	1.67 [0.47–6.64]	0.42524
	Yes	17	11	64.7			10	6	60.0		
Tap water	No	41	23	56.1	0.92 [0.47–1.74]	0.78775	25	11	44.0	1.16 [0.52–2.69]	0.71415
	Yes	410	221	53.9			360	172	47.8		
Bottled water	No	15	10	66.7	0.57 [0.17–1.63]	0.29725	10	5	50.0	0.88 [0.24–3.19]	0.835
	Yes	440	234	53.2			375	175	46.7		
Water fountains in the villages	No	213	102	47.9	1.58 [1.08–2.33]	**0.01895 ***	168	69	41.1	1.51 [1–2.29]	0.05103
	Yes	211	125	59.2			199	102	51.3		
Mountain spring waters	No	207	96	46.4	1.76 [1.2–2.6]	**0.00401 ***	182	86	47.3	0.96 [0.64–1.45]	0.83939
	Yes	212	128	60.4			184	85	46.2		
Little wild game	No	295	150	50.8	1.45 [0.97–2.18]	0.06953	227	100	44.1	1.34 [0.89–2.02]	0.16436
	Yes	145	87	60.0			154	79	51.3		
Big wild game	No	175	79	45.1	1.8 [1.23–2.65]	**0.00264 ***	123	45	36.6	1.84 [1.19–2.88]	**0.00591 ***

	Yes	268	160	59.7			260	134	51.5		
Pork	No	30	9	30.0	2.95 [1.36–6.92]	**0.00579 ***	26	6	23.1	3.26 [1.35–9.09]	**0.0075 ***
	Yes	421	235	55.8			356	176	49.4		
Sausages and pâtés	No	52	18	34.6	2.47 [1.37–4.62]	**0.00263 ***	26	7	26.9	2.6 [1.11–6.78]	**0.027 ***
	Yes	388	220	56.7			358	175	48.9		
Liver	No	301	147	48.8	1.82 [1.2–2.77]	**0.00463 ***	255	110	43.1	1.56 [1.01–2.42]	**0.04589 ***
	Yes	134	85	63.4			120	65	54.2		
Figatellu	No	69	18	26.1	4.14 [2.37–7.53]	**2.46^{-8} ***	65	18	27.7	2.71 [1.53–4.98]	**0.00049 ***
	Yes	374	222	59.4			322	164	50.9		
Fittonu	No	218	94	43.1	2.6 [1.76–3.86]	**1.82^{-6} ***	175	64	36.6	2.24 [1.47–3.42]	**0.00015 ***
	Yes	211	140	66.4			190	107	56.3		
Offal	No	281	136	48.4	1.86 [1.25–2.78]	**0.00213 ***	247	103	41.7	1.78 [1.15–2.76]	**0.009 ***
	Yes	159	101	63.5			125	70	56.0		
Beef	No	16	8	50.0	1.18 [0.43–3.27]	0.74187	15	9	60.0	0.58 [0.19–1.64]	0.3031
	Yes	430	233	54.2			368	171	46.5		
Poultry	No	16	8	50.0	1.18 [0.43–3.28]	0.73897	19	9	47.4	0.99 [0.39–2.56]	0.99112
	Yes	437	237	54.2			362	171	47.2		
Shellfish	No	76	38	50.0	1.2 [0.73–1.97]	0.47138	71	24	33.8	1.98 [1.17–3.45]	**0.01107 ***
	Yes	376	205	54.5			314	158	50.3		
Fish	No	22	10	45.5	1 [0.41–2.36]	0.99845	31	10	32.3	1.98 [0.93–4.51]	0.07726
	Yes	431	235	54.5			352	171	48.6		
Organic fruits and vegetables	No	62	27	43.5	1.64 [0.96–2.84]	0.07122	30	12	40.0	1.4 [0.66–3.07]	0.38191
	Yes	383	214	55.9			348	168	48.3		
Wild berries	No	234	115	49.1	1.57 [1.07–2.31]	**0.02001 ***	194	84	43.3	1.32 [0.88–1.99]	0.17687
	Yes	199	120	60.3			179	90	50.3		
Total		467	254	54.4			393	187	47.6		

		PGP					Overall				
			Anti-HEV IgG Positive					Anti-HEV IgG Positive			
Parameters	**Variables**	***n***	***n***	%	**OR [95% CI]**	***p*-Value**	***n***	***n***	%	**OR [95% CI]**	***p*-Value**
Gender	Female	34	20	58.8	Reference	0.35362	544	255	46.9	Reference	**0.00009 ***
	Male	36	25	69.4	1.59 [0.6–4.33]		386	231	59.8	1.69 [1.3–2.2]	
Age groups	18-27	6	3	50.0	Reference	0.40753	374	160	42.8	Reference	**0.00001 ***
	28-37	5	3	60.0	1.5 [0.13–19.11]		173	96	55.5	1.67 [1.16–2.4]	
	38-47	13	10	76.9	3.33 [0.43–29.22]		131	71	54.2	1.58 [1.06–2.37]	
	48-57	19	9	47.4	0.9 [0.13–5.99]		137	79	57.7	1.82 [1.23–2.71]	
	58-70	13	10	76.9	3.33 [0.43–29.22]		97	67	69.1	2.99 [1.87–4.87]	
	70	14	10	71.4	2.5 [0.34–19.67]		18	13	72.2	3.48 [1.28–11.02]	
Hunting	No	64	39	60.9	INF	**0.01785 ***	861	438	50.9	2.21 [1.32–3.82]	**0.0024 ***
	Yes	6	6	100.0			69	48	69.6		
Breeding	No	65	41	63.1	2.34 [0.32–47.23]	0.42697	873	449	51.4	1.75 [1.01–3.11]	**0.04641 ***
	Yes	5	4	80.0			57	37	64.9		
Skinning and butchering	No	61	36	59.0	INF	**0.00322 ***	864	436	50.5	3.07 [1.76–5.64]	**0.00005 ***
	Yes	9	9	100.0			66	50	75.8		
Contact with wastewater	No	67	42	62.7	INF	0.09878	900	466	51.8	1.86 [0.88–4.19]	0.1043
	Yes	3	3	100.0			30	20	66.7		
Tap water	No	15	6	40.0	3.66 [1.14–12.58]	**0.02965 ***	81	40	49.4	1.13 [0.71–1.78]	0.60849
	Yes	55	39	70.9			825	432	52.4		
Bottled water	No	2	2	100.0	INF	0.17973	27	17	63.0	0.62 [0.27–1.34]	0.22479
	Yes	68	43	63.2			883	452	51.2		
Water fountains in the villages	No	35	21	60.0	1.39 [0.52–3.8]	0.50842	416	192	46.2	1.5 [1.15–1.97]	**0.00289 ***
	Yes	34	23	67.6			444	250	56.3		
Mountain spring waters	No	42	23	54.8	2.89 [1.01–9.21]	**0.04808 ***	431	205	47.6	1.36 [1.04–1.79]	**0.02331 ***
	Yes	27	21	77.8			423	234	55.3		
Little wild game	No	46	27	58.7	1.99 [0.69–6.38]	0.20866	568	277	48.8	1.38 [1.05–1.82]	**0.02055 ***
	Yes	23	17	73.9			322	183	56.8		

Big wild game	No	22	10	45.5	3.14 [1.1–9.25]	**0.03188**	320	134	41.9	1.84 [1.4–2.43]	**0.00001 ***
	Yes	47	34	72.3			575	328	57.0		
Pork	No	1	0	0.0	INF	0.14871	57	15	26.3	3.27 [1.83–6.18]	**0.00004 ***
	Yes	69	45	65.2			846	456	53.9		
Sausages and pâtés	No	5	2	40.0	2.93 [0.45–23.52]	0.25158	83	27	32.5	2.44 [1.52–3.99]	**0.00017 ***
	Yes	65	43	66.2			811	438	54.0		
Liver	No	48	28	58.3	2.29 [0.75–7.92]	0.1474	604	285	47.2	1.7 [1.28–2.28]	**0.00028 ***
	Yes	21	16	76.2			275	166	60.4		
Figatellu	No	6	2	33.3	4.1 [0.74–31.28]	0.1066	140	38	27.1	3.48 [2.35–5.24]	**1.88^{-10}**
	Yes	64	43	67.2			760	429	56.4		
Fittonu	No	35	17	48.6	4.08 [1.46–12.47]	**0.00694 ***	428	175	40.9	2.46 [1.87–3.24]	**8.41^{-11}**
	Yes	34	27	79.4			435	274	63.0		
Offal	No	39	26	66.7	0.75 [0.28–2.02]	0.56837	567	265	46.7	1.72 [1.3–2.28]	**0.00012 ***
	Yes	30	18	60.0			314	189	60.2		
Beef	No	5	1	20.0	8.38 [1.15–169.46]	**0.0349 ***	36	18	50.0	1.08 [0.55–2.11]	0.82208
	Yes	65	44	67.7			863	448	51.9		
Poultry	No	2	1	50.0	1.83 [0.07–47.76]	0.67522	37	18	48.6	1.15 [0.59–2.24]	0.67789
	Yes	68	44	64.7			867	452	52.1		
Shellfish	No	15	7	46.7	2.49 [0.77–8.21]	0.12501	162	69	42.6	1.57 [1.11–2.21]	**0.00988 ***
	Yes	54	37	68.5			744	400	53.8		
Fish	No	3	1	33.3	3.83 [0.35–84.93]	0.26558	56	21	37.5	1.61 [0.94–2.83]	0.08474
	Yes	67	44	65.7			850	450	52.9		
Organic fruits and vegetables or personal vegetable garden	No	11	8	72.7	0.61 [0.12–2.38]	0.49248	103	47	45.6	1.34 [0.89–2.03]	0.1605
	Yes	58	36	62.1			789	418	53.0		
Wild berries	No	37	19	51.4	3.38 [1.21–10.26]	**0.01937 ***	465	218	46.9	1.52 [1.17–1.99]	**0.00203 ***
	Yes	32	25	78.1			410	235	57.3		
Total		70	45	64.3			930	486	52.3		

Table 2. Multivariate analysis in the three populations and overall.

		BD		UCPP		PGP		Overall Glm		Overall Lmer Fixed Subpopulations	
Parameters	**Variables**	**aOR [95% CI]**	***p*-Value**	**aOR [95% CI]**	***p*-Value**	**aOR [95% CI]**	***p*-Value**	**aOR [95% CI]**	***p*-Value**	**aOR [95% CI]**	***p*-Value**
Gender	**Male**	1.58 [1.05–2.39]	0.02973	NS		NS		NS		NS	
Figatellu		2.82 [1.54–5.34]	0.00065					2.22 [1.45–3.45]	0.00023	1.77 [1.04–3.01]	0.035
Fittonu		1.97 [1.29–3.03]	0.00183	2.14 [1.4–3.28]	0.00039	4.35 [1.48–13.92]	0.00696	1.95 [1.45–2.64]	0.00001	1.95 [1.38–2.74]	0.00013
Skinning and butchering		3.52 [1.09–15.83]	0.03451	2.43 [1.16–5.38]	0.01764	7.88 e6 [0–INF]	0.00294	2.76 [1.51–5.37]	0.00077	3.45 [1.37–8.71]	0.0087
Age groups	**18–27**	NS		NS		NS		Reference	0.00272	NS	
	28–37							1.61 [1.09–2.38]			
	38–47							1.52 [0.98–2.37]			
	48–57							1.54 [1–2.38]			
	58–70							2.44 [1.45–4.19]			
	70							3.46 [1.17–12.65]			

NS: Non-significant value; INF: infinite value.

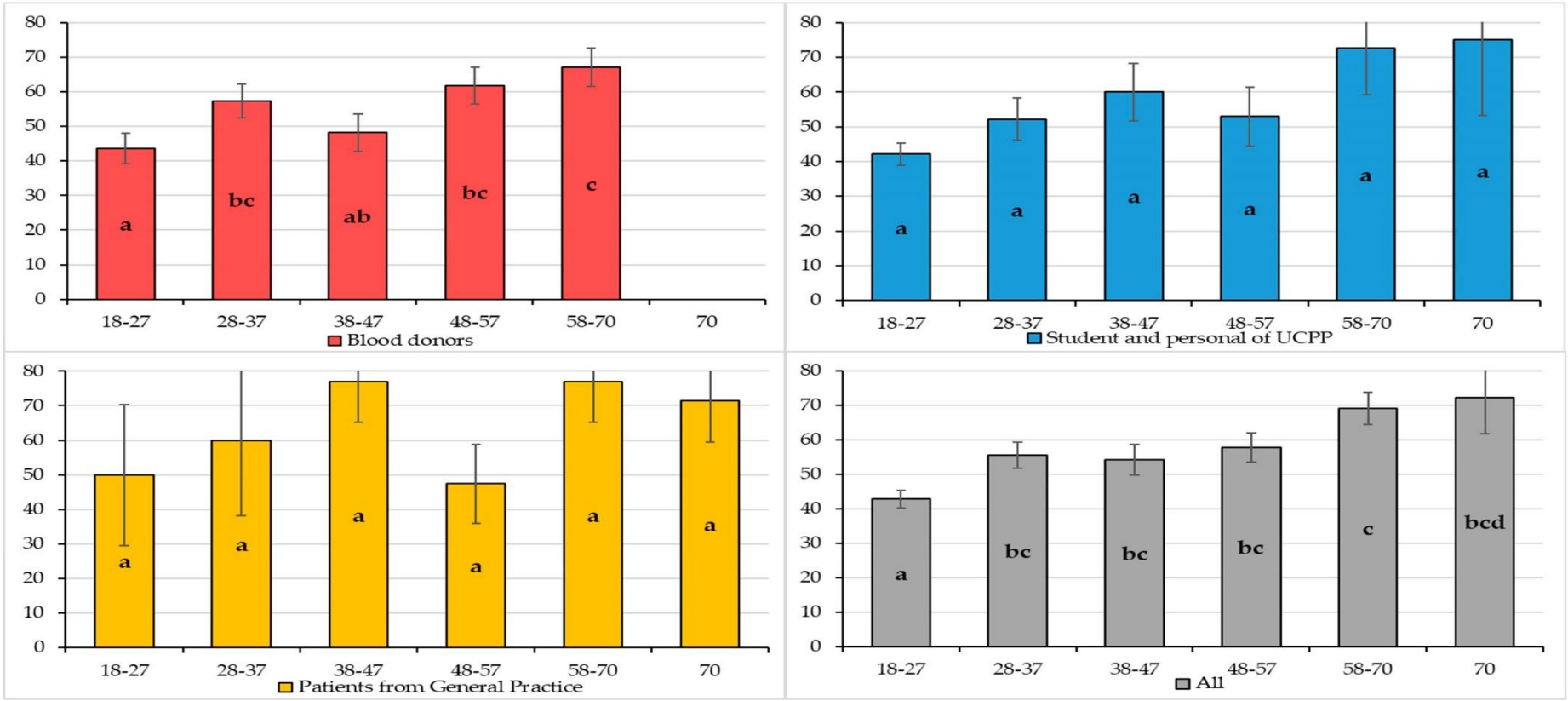


Figure 2. Graphs of the different seroprevalences of anti-HEV IgG (%) by age group and populations. The different lowercase letter (a, b, c, and d) indicates a significant difference ($p < 0.05$) between age groups of a given population. For example: among blood donors, the group 18–27 is significantly different from that of 58–70 ("a" vs. "c"), but not from that of 38–47 (presence of the letter a). The black bars correspond to the standard deviation of each proportion.

4. Discussion

In France, seroprevalence studies were conducted in blood donors and allowed the identification of different risk factors such as increasing age, hunting, consumption of pork liver sausages (figatellu), game meat offal and oysters [9, 19-20]. Hyperendemic areas were identified in southwestern France (Occitanie), southeastern France (Provence-Alpes-Cotes-d'Azur), and Corsica. Our study is the first to address Corsican populations other than blood donors, using a specific questionnaire and a large regional sampling.

A total of 52.2% of 930 individuals were positive for the presence of anti-HEV IgG. Interestingly, results of a very similar order of magnitude were observed in each of the three groups. Although the three groups were different regarding age, sex, and socio-demographic data, they seem to be fairly homogeneous with regard to HEV. Indeed, for a given age group, no significant differences in seroprevalences were observed.

We observed an age-related increase in anti-HEV IgG in the 18–27 group (42.8%) and the older than 70 group (73.7%), reflecting a cumulative life-time exposure in agreement with previous studies performed in European populations [9, 13, 21-23]. This age-related increased rate could be associated with differences in dietary habits and other behaviors such as rare or absence of consumption of uncooked meat products, a shorter exposure time and lack of hunting and skinning/butchering in the younger group. Repeated exposure leading to infection/reinfection might also play a role, although it appears that a single infection leads to long-life immunity [24], and that there is no clear data about the possibility of immunity acquisition through repeated contacts with HEV without systemic infection.

In the present study, although we recorded higher rates in men (59.8%) vs. women (46.9%), the difference was not statistically significant in the multivariate analysis. This is in line with previous studies performed in French blood donors living in the hyperendemic regions in southern France [25] and in other industrialized countries [22, 26-27]. Overall, these results could suggest that exposure to HEV is not directly related to gender but rather to individual behavior (differences in dietary habits and other behaviors such as a different frequency of consumption of meat products, and lack of hunting or other practices in contact with the animal reservoir).

Interestingly, none of the 463 participants and, more specifically, none of the 232 participants with anti-HEV IgG (50.2%) reported a known previous infection with HEV. This suggests that asymptomatic cases or cases of infection for which the patients are not seeking medical check-up might be much larger than the 50%–80% commonly reported for genotype 3 [28-30]. This is specifically important in hyperendemic regions where efforts should be exerted for better awareness of Hepatitis E and for a more systematic strategy of testing compared to what is currently done. The risk factors described in our study together with those reported in the scientific literature should be used to define "the at-risk population" which merit to be tested for the presence of viral RNA and for anti-HEV IgM whenever clinical manifestations are coherent with acute infection with HEV.

An independent factor associated with anti-HEV IgG seropositivity was to practice skinning or butchering. In Corsica, traditionally, hunter or breeder family members commonly engage in such activities, leading to HEV exposure in a distinct manner compared to food or water intake. This practice was strongly associated with HEV IgG positivity in our study. HEV infection can occur during the evisceration of an infected animal—through contact with its blood or feces. In a similar manner, higher rates in seroprevalence studies were identified in butchers and slaughterhouse workers compared with the general population [31]. The presence of HEV RNA in wild boar and swine bile, liver, sera, and faces [11, 32-33] is in line with a higher risk of exposure and strengthens the need for protective gloves during the disemboweling of wild boars [34].

Here, we observed that participants reporting eating specific types of meat such as figatellu were significantly associated with higher HEV IgG seropositivity as previously described [35-37]. Our study was the first to examine the consumption of fittonu, a dried pork liver sausage that is not cooked before eating (in contrast with figatellu). In the Netherlands, traditional Dutch dry raw sausages called "cervelaat", "fijnkost", "salami" and "salametti" were also associated with higher seroprevalence [38]. Interestingly, anti-HEV IgG rates were in range from 27% to 31% according to

three recent Dutch studies [8, 22, 38-39]. The same situation is observed in Poland with seroprevalence between 44% and 50% and where Polish dry sausage known as "Kabanos" are very popular [8].

A cooking temperature of 71 °C for twenty minutes is required to inactivate HEV [40-41]. The virus stays viable after heating at 56 °C for one hour and remains infectious up to 60 °C [41-42]. Although figatellu is usually roasted, it remains strongly associated with HEV infection; cooking does not appear to have a significant impact on seroprevalence in our study (p-value = 0.87). This could be explained by the fact that figatellu is also (i) either eaten without being roasted or (ii) eaten after the necessary cooking times and temperatures have not been respected; (iii) last, pre-roasting handling of the raw figatellu might be a risk [43]. In this regard, washing hands after product handling or wearing gloves during disemboweling must be recommended.

Meat products were not statistically associated with HEV seropositivity but showed higher rates (>55%) (game, offal, liver, pork). These meat products have been frequently associated with higher seroprevalence or HEV RNA detection [44-47].

HEV is increasingly found in the environment [48]. In our study, higher anti-HEV IgG rates were associated with consumption of fountain waters in villages and waters of natural springs (mountain hiking), and seafood. In Corsica, the Regional Health Agency (Agence Régionale de la Santé) has carried out a study on the quality of drinking water, and many counties reported unsatisfactory bacteriological results although HEV was not tested [49]. As a non-enveloped virus, HEV transmission through water consumption (such as hepatitis A virus and other picornaviruses) must be taken into consideration as an important route of infection. Many studies have identified the presence of HEV in running water. In Italy, HEV was detected in river water [50]. Irrigation water is also involved, and the virus was deteted in fruits and vegetables in several European countries [51-54] or associated with higher seroprevalence in Turkey [55].

HEV was repeatedly detected in seafood in the United Kingdom, Spain and Japan [56-59] or epidemiologically associated with higher anti-HEV IgG rates in population with frequent consumption of seafood and shellfish [9]. In these studies, strains belonging to genotype 3 (swine and human strains) were identified, suggesting the existence of an epidemiologic cycle between the different animal reservoir, environment, and human cases.

This study has several limitations. First, we investigated anti-HEV IgG seroprevalence in the adult population only. Data for children are scarce, and the risk factors remain to be thoroughly evaluated [60]. Second, the sample issued from PGP was small in size with respect to the samples issued from blood donors and university. Third, we cannot exclude that other risk factors that seem to play a minor role in our study may be more prominent when increasing the sample size. Finally, the number of individuals included who were older than 70 years was small compared to other age groups, which may underestimate the overall seroprevalence calculated.

This cross-sectional study indicates an anti-HEV IgG seroprevalence > 50% in the Corsican adult population, similar between women and men and increasing with age. This serosurvey also showed homogeneity regarding the exposure to HEV among three different types of populations. Finally, we identified a strong association between consumption of figatellu/fittonu and the practice of skinning and butchering, with the detection of anti-HEV IgG among the three populations studied. These results provide relevant information for control and preventive strategies and concrete advice to risk groups. Surface, irrigation, or consumption water could be a potential source for exposure. A study on the presence of the virus in surface waters or bivalve molluscan shellfish as an indicator of water pollution (or food products) could be carried out to better understand the epidemiology of the virus in Corsica.

Author Contributions: Conceptualization and design of the study: L.C., P.G., T.B., X.L, R.C., and A.F.; Investigation: B.P.; Writing—Original Draft preparation: L.C., R.C. and A.F.; Methodology: L.C, A.F, R.C., C.S. and T.B.; Analysis: L.C., C.I., S.M., and C.S.; Writing—Review and Editing: L.C., X.L, P.G., R.C., S.M. and A.F.; Funding acquisition, A.F.

Funding: Research was funded by the University of Corsica Pasquale Paoli (2016-0034).

Acknowledgments: All the authors thank the EFS staff, general practitioners and the University's medical doctor for their help in collecting the samples. The authors also thank all participants in the study, blood donors, students, staff of the University of Corsica, and patients.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix

Appendix A List of items of the questionnaire

- Age
- Gender
- Situation
- Professional activity
- Educational level
- ZIP code
- Type of residence
- Water distribution
- Sewage disposal
- Contact with wastewater
- Consumption water
- Hunting
- Breeding
- Home at one kilometer of a farm or a breeding
- Skinning or butchering activity
- Contact with different animals
- Eating habits and type of cooking
- Clinical factors (presence of chronic diseases, transplantation, blood transfusion, immunosuppression, and a past HEV infection during the life of the individual) except for blood donors

Table A1. Description of population and repartition of individuals included by variable.

		Blood Donors		Student and Personal of UCPP		Patient of General Practice		Overall	
		n	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%
Gender	Men	201	43.0	149	37.9	36	51.4	386	41.5
	Women	266	57.0	244	62.1	34	48.6	544	58.5
Age groups	18–27	126	27.0	242	61.6	6	8.6	374	40.2
	28–37	101	21.6	67	17.0	5	7.1	173	18.6
	38–47	83	17.8	35	8.9	13	18.6	131	14.1
	48–57	84	18.0	34	8.7	19	27.1	137	14.7
	58–70	73	15.6	11	2.8	13	18.6	97	10.4
	70			4	1.0	14	20.0	18	1.9
Graduate studies level	Pre bac	87	18.6	30	7.6	42	60.0	159	17.1
	Bac	145	31.0	180	45.8	8	11.4	333	35.8
	Post bac	232	49.7	179	45.5	20	28.6	431	46.3
Professional activity	No	64	13.7	112	28.5	1	1.4	177	19.0
	Yes	403	86.3	281	71.5	69	98.6	753	81.0
Kind of habitation	Apartment	179	38.3	182	46.3	23	32.9	384	41.3
	Individual House	284	60.8	204	51.9	47	67.1	535	57.5
	Farm	4	0.9	6	1.5	0	0.0	4	0.4
Hunters	No	447	95.7	350	89.1	64	91.4	861	92.6
	Yes	20	4.3	43	10.9	6	8.6	69	7.4
Breeders	No	442	94.6	366	93.1	65	92.9	873	93.9
	Yes	25	5.4	27	6.9	5	7.1	57	6.1
Skinning and butchering	No	449	96.1	354	90.1	61	87.1	864	92.9
	Yes	18	3.9	39	9.9	9	12.9	66	7.1
Contact with wastewater	No	450	96.4	383	97.5	67	95.7	900	96.8
	Yes	17	3.6	10	2.5	3	4.3	30	3.2
Housing water	Private	22	4.7	19	4.1	2	0.4	43	9.2
	Collective	429	91.9	360	91.6	69	98.6	858	92.3
Total		467	50.2	393	42.3	70	7.5	930	100.0

Missing values (NA): Seven for the variable "Graduate studies level" and "kind of habitation"; 29 for housing water.

Table A2. Univariate analysis of the association between anti-HEV IgG detection and the type of cooking.

Food Products	Cooking	OR [95% CI]	*p*-Value
Little wild game	Well-cooked	Reference	0.45337
	Raw	INF	
	Rare/Medium	0.85 [0.51;1.4]	
Big wild game	Well-cooked	Reference	0.23411
	Raw	INF	
	Rare/Medium	0.75 [0.5;1.15]	
Pork	Well-cooked	Reference	0.2255
	Raw	0.99 [0.4;2.49]	
	Rare/Medium	0.69 [0.46;1.05]	
Sausages and pâtés	Well-cooked	Reference	0.81779
	Raw	0.87 [0.53;1.45]	
	Rare/Medium	0.9 [0.56;1.44]	
Liver	Well-cooked	Reference	0.18698
	Raw	INF	
	Rare/Medium	0.71 [0.38;1.34]	
Figatellu	Well-cooked	Reference	0.86939
	Raw	1.18 [0.62;2.32]	
	Rare/Medium	1.05 [0.67;1.64]	
Offal	Well-cooked	Reference	0.17264
	Rare/Medium	0.65 [0.35;1.21]	
Beef	Well-cooked	Reference	0.60331
	Raw	1.29 [0.77;2.2]	
	Rare/Medium	1.01 [0.75;1.36]	
Poultry	Well-cooked	Reference	0.51125
	Raw	INF	
	Rare/Medium	0.97 [0.66;1.41]	
Shellfish	Well-cooked	Reference	0.40387
	Raw	1.24 [0.86;1.8]	
	Rare/Medium	1.3 [0.79;2.14]	
Fish	Well-cooked	Reference	0.7241
	Raw	1.07 [0.73;1.58]	
	Rare/Medium	1.16 [0.8;1.69]	

References

1. Kamar, N.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Xia, N.S.; Ijaz, S.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Hepatitis E. *Lancet* **2012**, *379*, 2477–2488.
2. Tam, A.W.; Smith, M.M.; Guerra, M.E.; Huang, C.C.; Bradley, D.W.; Fry, K.E.; Reyes, G.R. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **1991**, *185*, 120–131.
3. International Committee on Taxonomy of viruses Hepeviridae. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/hepeviridae (accessed on 11 March 2019).
4. Doceul, V.; Bagdassarian, E.; Demange, A.; Pavio, N. Zoonotic hepatitis E virus: Classi fi cation, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses* **2016**, *8*.
5. Pavio, N.; Meng, X.J.; Renou, C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 46.
6. Geng, Y.; Wang, Y. Epidemiology of hepatitis E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *948*, 39–59.
7. Adlhoch, C.; Avellon, A.; Baylis, S.A.; Ciccaglione, A.R.; Couturier, E.; de Sousa, R.; Epstein, J.; Ethelberg, S.; Faber, M.; Feher, A.; et al. Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J. Clin. Virol.* **2016**, *82*, 9–16.
8. Capai, L.; Falchi, A.; Charrel, R. Meta-analysis of human IgG anti-HEV seroprevalence in industrialized countries and a review of literature. *Viruses* **2019**, *11*.
9. Mansuy, J.M.; Gallian, P.; Dimeglio, C.; Saune, K.; Arnaud, C.; Pelletier, B.; Morel, P.; Legrand, D.; Tiberghien, P.; Izopet, J. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* **2016**, *63*, 1145–1154.
10. Couturier, E.; Abravanel, F.; Figoni, J.; Van Cauteren, D.; Septfons, A.; Lhomme, S.; Durand, J.; Izopet, J.; De Valk, H. Hepatitis E surveillance in France 2002–2016. **2018**, *28*, 566–574.
11. Pavio, N.; Laval, M.; Maestrini, O.; Casabianca, F.; Charrier, F.; Jori, F. Possible foodborne transmission of hepatitis E virus from domestic pigs and wild boars from corsica. *Emerg. Infect Dis.* **2016**, 22, 2197–2199.
12. Renou, C.; Roque-Afonso, A.M.; Pavio, N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg. Infect Dis.* **2014**, *20*, 1945–1947.
13. Lapa, D.; Capobianchi, M.R.; Garbuglia, A.R. Epidemiology of hepatitis E virus in european countries. *Int. J Mol Sci* **2015**, *16* (10), 25711–43.
14. Wilhelm, B.; Waddell, L.; Greig, J.; Young, I., Systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of hepatitis E virus in the general population across non-endemic countries. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216826.
15. Zhang, J.; Ge, S.X.; Huang, G.Y.; Li, S.W.; He, Z.Q.; Wang, Y.B.; Zheng, Y.J.; Gu, Y.; Ng, M.H.; Xia, N.S., Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J. Med. Virol.* **2003**, *71*, 518–526.
16. Avellon, A.; Morago, L.; Garcia-Galera del Carmen, M.; Munoz, M.; Echevarria, J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 1934–1939.
17. Arya, R.; Antonisamy, B.; Kumar, S. Sample size estimation in prevalence studies. *Indian J. Pediatr.* **2012**, *79*, 1482–1488.
18. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, 2015. R Foundation for Statistical Computing. Available online: https://www.r-project.org/ (accessed on 10 February 2015).
19. Izopet, J.; Labrique, A.B.; Basnyat, B.; Dalton, H.R.; Kmush, B.; Heaney, C.D.; Nelson, K.E.; Ahmed, Z.B.; Zaman, K.; Mansuy, J.M.; et al. Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. *J. Clin. Virol.* **2015**, *70*, 39–42.
20. Mansuy, J.M.; Saune, K.; Rech, H.; Abravanel, F.; Mengelle, C.; L Homme, S.; Destruel, F.; Kamar, N.; Izopet, J. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Eurosurveillance* **2015**, *20*, 27–34.
21. Christensen, P.B.; Engle, R.E.; Hjort, C.; Homburg, K.M.; Vach, W.; Georgsen, J.; Purcell, R.H. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin. Infect Dis.* **2008**, *47*, 1026–1031.
22. Slot, E.; Hogema, B.M.; Riezebos-Brilman, A.; Kok, T.M.; Molier, M.; Zaaijer, H.L. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Eurosurveillance* **2013**, *18*.
23. Olsoy, I.B.; Henriksen, S.; Weissbach, F.H.; Larsen, M.; Borgen, K.; Abravanel, F.; Kamar, N.; Paulssen, E. J.; Hirsch, H.H.; Rinaldo, C.H. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in a general adult population in Northern Norway: the Tromso study. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**.

24. Zhou, Y. Immunobiology and host response to HEV. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *948*, 113–141.
25. Mansuy, J.M.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Saune, K.; Miedouge, M.; Ellis, V.; Rech, H.; Destruel, F.; Kamar, N.; Dalton, H.R.; et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerging Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2309–2312.
26. Petrovic, T.; Lupulovic, D.; Jimenez de Oya, N.; Vojvodic, S.; Blazquez, A.B.; Escribano-Romero, E.; Martin-Acebes, M.A.; Potkonjak, A.; Milosevic, V.; Lazic, S.; et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) antibodies in Serbian blood donors. *J. Infect Dev. Ctries.* **2014**, *8*, 1322–1327.
27. Pittaras, T.; Valsami, S.; Mavrouli, M.; Kapsimali, V.; Tsakris, A.; Politou, M. Seroprevalence of hepatitis E virus in blood donors in Greece. *Vox sanguinis* **2014**, *106*, 387.
28. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* **2018**, *68*, 1256–1271.
29. De Keukeleire, S.; Reynders, M., Hepatitis E: An underdiagnosed, emerging infection in nonendemic regions. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2015**, *3*, 288–291.
30. Xin, S.; Xiao, L. Clinical manifestations of hepatitis E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *948*, 175–189.
31. Teixeira, J.; Mesquita, J.R.; Pereira, S.S.; Oliveira, R.M.; Abreu-Silva, J.; Rodrigues, A.; Myrmel, M.; Stene-Johansen, K.; Overbo, J.; Goncalves, G.; et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Med. Microbiol. Immunol.* **2017**, *206*, 77–81.
32. Jori, F.; Laval, M.; Maestrini, O.; Casabianca, F.; Charrier, F.; Pavio, N. Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France. *Viruses* **2016**, *8*.
33. Capai, L.F.C.; Maestrini, O.; Villechenaud, N.; Masse, S.; Bosseur, F.; De Lamballerie, X.; Charrel, R.; Falchi, A. Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**.
34. Schielke, A.; Ibrahim, V.; Czogiel, I.; Faber, M.; Schrader, C.; Dremsek, P.; Ulrich, R.G.; Johne, R. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 440.
35. Berto, A.; Grierson, S.; Hakze-van der Honing, R.; Martelli, F.; Johne, R.; Reetz, J.; Ulrich, R.G.; Pavio, N.; Van der Poel, W.H.; Banks, M. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 264–266.
36. Colson, P.; Borentain, P.; Queyriaux, B.; Kaba, M.; Moal, V.; Gallian, P.; Heyries, L.; Raoult, D.; Gerolami, R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 825–834.
37. Pavio, N.; Merbah, T.; Thebault, A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1925–1927.
38. Mooij, S.H.; Hogema, B.M.; Tulen, A.D.; van Pelt, W.; Franz, E.; Zaaijer, H.L.; Molier, M.; Hofhuis, A. Risk factors for hepatitis E virus seropositivity in Dutch blood donors. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 173.
39. Van Gageldonk-Lafeber, A.B.; van der Hoek, W.; Borlee, F.; Heederik, D.J.; Mooi, S.H.; Maassen, C.B.; Yzermans, C.J.; Rockx, B.; Smit, L.A.; Reimerink, J.H. Hepatitis E virus seroprevalence among the general population in a livestock-dense area in the Netherlands: a cross-sectional population-based serological survey. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 21.
40. Barnaud, E.; Rogee, S.; Garry, P.; Rose, N.; Pavio, N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5153–5159.
41. Emerson, S.U.; Arankalle, V.A.; Purcell, R.H. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 930–933.
42. Yugo, D.M.; Meng, X. J. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 4507–4533.
43. Wichmann, O.; Schimanski, S.; Koch, J.; Kohler, M.; Rothe, C.; Plentz, A.; Jilg, W.; Stark, K. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect Dis.* **2008**, *198*, 1732–1741.
44. Bouwknegt, M.; Lodder-Verschoor, F.; van der Poel, W.H.; Rutjes, S.A.; de Roda Husman, A.M. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2889–2895.
45. Szabo, K.; Trojnar, E.; Anheyer-Behmenburg, H.; Binder, A.; Schotte, U.; Ellerbroek, L.; Klein, G.; Johne, R. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 149–156.

46. Giannini, P.; Jermini, M.; Leggeri, L.; Nuesch-Inderbinen, M.; Stephan, R. Detection of hepatitis E virus RNA in raw cured sausages and raw cured sausages containing pig liver at retail stores in Switzerland. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 43–45.
47. Cossaboom, C.M.; Heffron, C.L.; Cao, D.; Yugo, D.M.; Houk-Miles, A.E.; Lindsay, D.S.; Zajac, A.M.; Bertke, A.S.; Elvinger, F.; Meng, X.J. Risk factors and sources of foodborne hepatitis E virus infection in the United States. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 1641–1645.
48. Alfonsi, V.; Romano, L.; Ciccaglione, A.R.; La Rosa, G.; Bruni, R.; Zanetti, A.; Della Libera, S.; Iaconelli, M.; Bagnarelli, P.; Capobianchi, M.R.; et al. Hepatitis E in Italy: 5 years of national epidemiological, virological and environmental surveillance, 2012 to 2016. *Euro. Surveill.* **2018**, *23*.
49. Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. RAPPORT d'activité 2017. Available Online: https://www.eaurmc.fr/jcms/pro_73733/fr/rapport-d-activite-2017 (accessed on 31 December 2017)
50. Iaconelli, M.; Purpari, G.; Della Libera, S.; Petricca, S.; Guercio, A.; Ciccaglione, A.R.; Bruni, R.; Taffon, S.; Equestre, M.; Fratini, M.; et al. Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in bivalve molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 316–324.
51. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazic, S.; Soderberg, K.; Vasickova, P.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; et al. Virological quality of irrigation water in leafy green vegetables and berry fruits production chains. *Food Environ. Virol.* **2017**, *9*, 72–78.
52. Maunula, L.; Kaupke, A.; Vasickova, P.; Soderberg, K.; Kozyra, I.; Lazic, S.; van der Poel, W.H.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.A.; et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 177–185.
53. Brassard, J.; Gagne, M.J.; Genereux, M.; Cote, C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3763–3766.
54. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazic, S.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; Kaupke, A.; Legaki, E.; et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ. Virol.* **2012**, *4*, 179–191.
55. Ceylan, A.; Ertem, M.; Ilcin, E.; Ozekinci, T. A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *131*, 753–756.
56. O'Hara, Z.; Crossan, C.; Craft, J.; Scobie, L. First report of the presence of hepatitis E virus in scottish-harvested shellfish purchased at retail level. *Food Environ. Virol.* **2018**.
57. Crossan, C.; Baker, P.J.; Craft, J.; Takeuchi, Y.; Dalton, H.R.; Scobie, L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerging Infect. Dis.* **2012**, *18*, 2085–2087.
58. Li, T.C.; Miyamura, T.; Takeda, N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (Corbicula japonica) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 170–172.
59. Rivadulla, E.; Varela, M.F.; Mesquita, J.R.; Nascimento, M.S.J.; Romalde, J.L. Detection of hepatitis E virus in shellfish harvesting areas from Galicia (Northwestern Spain). *Viruses* **2019**, *11*.
60. Oliveira, R.; Mesquita, J.R.; Pereira, S.; Abreu-Silva, J.; Teixeira, J.; Nascimento, M.S.J. Seroprevalence of hepatitis E virus antibodies in Portuguese children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 623–626.

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Chapitre 3 : Etude de prévalence de l'infection au HEV des porcs domestiques corses et identification des souches circulantes

Article : Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France.

L'hépatite E est une maladie zoonotique émergente dans les pays industrialisés dont le réservoir majeur est représenté par les porcs. Les génotypes 3 et 4 infectent la population humaine et animale et la transmission à l'homme intervient majoritairement par voie féco-orale, par ingestion de produits carnés insuffisamment cuits (Pavio *et al.*, 2014 ; Pavio *et al.*, 2016). La Corse fait partie des régions hyperendémiques d'Europe avec notamment des séroprévalences IgG anti-HEV aux alentours de 60% en population humaine (Mansuy *et al.*, 2016) et de 90% chez les porcs domestiques (Jori *et al.*, 2016 ; Charrier *et al.*, 2018). En France métropolitaine, des cas groupés de HEV ont été associés à la consommation de saucisse de foie de porc Corse (*ficatellu* [*ficatelli*]) traditionnellement consommé grillé ou cru après avoir été séché (Renou *et al.*, 2014 ; Pavio *et al.*, 2016). En effet, une enquête sur les produits alimentaires français a révélé la présence d'ARN du HEV chez 30% des *ficatelli* testés (Pavio *et al.*, 2014). Les produits à base de porc sont sans danger quand ils sont cuits) cœur car le HEV est inactivé à des températures > 70 ° C (Emerson *et al.*, 2005b ; Barnaud *et al.*, 2012a).

En Corse, les systèmes traditionnels d'élevage de porcs extensifs (ou semi-extensifs) sont majoritaires. Ce type d'élevage facilite le contact avec des populations de sangliers partageant des agents pathogènes tels que le HEV et le virus causant la maladie d'Aujesky (Jori *et al.*, 2016 ; Charrier *et al.*, 2018). Seulement 10% des produits charcutiers proviennent de ce secteur traditionnel. Les 90% restants sont préparés à partir de matières premières importées (viande et foie) de porcs d'élevage intensif appartenant à d'autres races qui sont abattues à l'âge de 6 mois (Assemblée de Corse, 2006). Dans une moindre mesure, certains systèmes d'élevage porcin fermé (avec abattage à 6 mois) existent sur l'île. Il est à noter qu'un label d'appellation d'origine protégée (AOP) pour la charcuterie corse existe pour promouvoir la race locale « Nustrale» et l'élevage traditionnel corse (Territoires, 2012 ; Relun *et al.*, 2015). Les porcs de ce type d'élevage atteignent un poids de 100 à 130 kg tardivement ce qui repousse l'âge d'abattage à 15 ou 18 mois voire même 24 mois. Un âge tardif pourrait être moins propice à la contamination par consommation car les porcs sont immunisés et ne seraient donc plus infectés (Salines *et al.*, 2017).

Dans ce contexte, la compréhension des cycles d'infections, de l'épidémiologie et des facteurs de risques dans la filière porcine en Corse apparait donc comme primordiale. Une seule étude a été réalisée en Corse sur l'infection des porcs au HEV (détection d'ARN dans le sang ou la bile) mais le nombre d'échantillons testés était faible (n = 24) et correspondait à des foies

prélevés à l'abattoir (Jori *et al.*, 2016). Pour cette raison, nous avons décidé de mener la présente étude dans laquelle un plus grand nombre d'échantillons a été testé.

L'objectif principal de cette étude a été d'estimer le taux de détection de l'ARN du HEV dans les fèces de porcs domestiques corses, de procéder à la caractérisation moléculaire des souches virales identifiées et de déterminer les facteurs de risques en analysant les résultats en fonction du type d'élevage. Les résultats majeurs de l'étude sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 Tableau récapitulatif des principaux résultats de l'étude de la filière porcine corse

Taux de fèces positives	919 échantillons	9,2% de positifs
Génotype et sous type détectés	85 génotype 3 (100%)	83 génotypes 3c (97,7%) 2 génotypes 3f (2,3%)
Taux de positifs par classe d'âge	1-3 mois 3-4 mois 4-6 mois > 6 mois	13,6% 21,9% 11,7% 1,4%
Facteurs associés à la détection du génome viral dans les fèces **(AOR = Odds ratio ajusté)**	> 6 mois	AOR = 0,08 [0,019–0,24] p-value = 0,001
	3-4 mois	AOR = 1,84 [1,15-2,92] p-value = 0,031
	Elevage semi-extensif	AOR = 1,93 [1,15-3,30] p-value = 0,039

Selon nos résultats et la cinétique d'infection observée, un âge plus élevé d'abattage semblerait associé à un risque plus faible de présence du HEV dans les produits alimentaires issus de la filière traditionnelle. C'est la première description d'un possible effet protecteur des pratiques d'élevage traditionnelles vis-à-vis du HEV. Ces résultats observés durant notre étude méritent d'être confirmés par la réalisation d'une étude de suivi des porcs de la naissance à l'abattage.

Ce travail a été publié dans le journal Transboundary and Emerging Diseases Impact factor : 3,554 (publié le 23 juillet 2019) (Capai *et al.*, 2019a) et l'article est présenté dans la figure 13 ci-dessous.

Received: 22 February 2019 | Revised: 8 June 2019 | Accepted: 15 July 2019

DOI: 10.1111/tbed.13304

Article

ORIGINAL ARTICLE

Transboundary and Emerging Diseases WILEY

Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France

Lisandru Capai[1] | Oscar Maestrini[2] | François Casabianca[2] | Natacha Villechenaud[1] | Shirley Masse[1] | Frédéric Bosseur[3] | Xavier de Lamballerie[4] | Rémi N. Charrel[4,5] | Alessandra Falchi[1]

[1]EA 7310, Laboratoire de Virologie, Université de Corse, Corte, France

[2]Laboratoire de Recherche sur le Développement de l'Elevage (LRDE), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Corte, France

[3]Sciences Pour l'Environnement – UMR CNRS 6134, niversité de Corse, Corte, France

[4]IRD 190, INSERM 1207, IHU Méditerranée Infection, Unité des Virus Émergents (UVE): Aix Marseille Univ, Marseille, France

[5]Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, Florida

Correspondence
Lisandru Capai and Alessandra Falchi, Laboratoire de Virologie, EA7310 BIOSCOPE, Campus Grimaldi, Bat PPDB RDC, Université de Corse, 20250 Corte, France.
Email: capai_l@univ-corse.fr (LC); falchi@univ-corse.fr (AF)

Funding information
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Collectivité Territoriale de Corse

Abstract

Suidae is an important reservoir of hepatitis E virus (HEV) and a source of transmission to humans (direct contact or via consumption of meat products). Our goal was to characterize the epidemiology of HEV infecting domestic pigs in Corsica Island, a French region hyperendemic for HEV. In Corsica, traditional extensive (or semi-extensive) outdoor pig farming system is common. Sixteen farms were selected according to location and breeding system. Individual pig faeces samples were collected and qRT-PCR for detecting HEV RNA was performed. Nucleic acids from HEV-positive samples were amplified using specific ORF2 genotyping system. The genotype and subtype of the Corsican HEV sequences were determined by phylogenetic analysis. Among the 919 porcine faeces samples tested 9.2% (n = 85) were positive. The presence of viral RNA was correlated with (a) age (>6 months) Adjusted Odd Ratio (AOR) 0.25 [0.068–0.90] p = .032; 3–4 months AOR = 4.94 [2.30–10.62] p = .000043) with the logistic regression model with a random effect at the farm level. Among the 85 positive samples, 83 belonged to genotype 3c and two to genotype 3f. The highest prevalence was observed in the 3–4 months age group and older age (>6 months) was negatively related to HEV infection and this suggests that traditional breeding with a late slaughter age may limit the risk of transmission to humans. A kinetic study of pigs from birth to slaughtering would allow to ensure that the type of traditional breeding reported here is very favourable to the absence of the virus in slaughtered pigs and in pork products.

KEYWORDS
domestic pigs, epidemiology, hepatitis E, virology, zoonosis

1 | INTRODUCTION

The hepatitis E Virus (HEV) is a single-stranded, positive sense non-enveloped RNA virus (7.5 kb; Tam et al., 1991) that was discovered in 1983 during an hepatitis outbreak in Afghanistan (Balayan et al., 1983). The virus belongs to the family Hepeviridae (Kamar et al., 2012). All human strains belong to the genus Orthohepevirus A in five genotypes HEV-1, HEV-2, HEV-3, HEV-4 and HEV-7. In developed countries (Europe, USA, and Japan), infections are mostly autochthonous and are caused by genotype 3 (HEV-3) or 4 (HEV-4) in contrast to Asia and Africa where genotypes 1 and 2 dominate (Echevarria et al., 2013; Kim et al., 2014).

 © 2019 Blackwell Verlag GmbH

Genotypes 3 and 4 infect animals and humans, and transmission occurs through the ingestion of infected items, including raw or insufficiently cooked meat from infected animals as well as the consumption of raw liver or liver-derived products (Pavio et al., 2016; Pavio, Merbah, & Thebault, 2014). Thus, HEV is considered an emerging zoonosis, and domestic pigs are being recognized as its main reservoir in industrialized countries. A national seroprevalence survey among blood donors in France showed a high (>60%) seroprevalence in southeastern (including Corsica) which suggests local hyperendemicity (Mansuy et al., 2016). In continental France, grouped cases of HEV have been related to the consumption of Corsican raw pig liver sausage (ficatellu [plural: ficatelli]; small liver in the Corsican language) which are traditionally eaten grilled or raw after curing (Pavio et al., 2016; Renou, Roque-Afonso, & Pavio, 2014). Indeed, a survey of French food products reported the presence of HEV RNA in 30% of tested ficatelli (Pavio et al., 2014). Pork products could be safe if they are well cooked because HEV is heat-inactivated (>70°C; Barnaud, Rogee, Garry, Rose, & Pavio, 2012; Emerson, Arankalle, & Purcell, 2005). In France, hepatitis E strains were mainly due to subtype 3f (88%), but 3c and 3e were also identified (Legrand-Abravanel et al., 2009). The same trend was observed in pig liver sausages and slaughter-aged pigs (Colson et al., 2010; Lu, Li, & Hagedorn, 2006; Rose et al., 2011). Moreover, 3c and 3e are the main subtypes among pigs from different European countries (Lu et al., 2006). Strains from human cases, domestic swines and pig liver sausages are very close genetically, which confirm zoonotic transmission.

In Corsica, traditional extensive (or semi-extensive) outdoor pig farming system is common. This kind of farming facilitates contact with wild boar populations sharing pathogens such as HEV (Charrier et al., 2018; Jori et al., 2016). Only 10% of Corsican pork products come from this traditional sector. The other part is prepared using imported raw material (meat and liver) from intensive-farm pigs belonging to other races that are slaughtered at six months of age (Assemblée de Corse, 2006). To a lesser extent, some closed pig farming system exist on the Island. Of note, a Protected Designation of Origin (PDO) label for pork products promotes the recognized local breed, "Nustrale," and the Corsican traditional pig production (Relun et al., 2015; Territoires, 2012). This is of specific interest since "Nustrale" pigs reach the slaughter weight (100–130 kg) at the age of 15 to 18, or even 24 months, i.e. in a period when HEV infection is less frequently encountered compared with younger pigs (Salines, Andraud, & Rose, 2017). Accordingly, food products issued from "Nustrale" pigs have the potential to be less frequently contaminated.

Two major studies on HEV have already been carried out on domestic pigs in Corsica. These were seroprevalence studies and anti-HEV IgG has been detected in domestic and wild boar populations (Charrier et al., 2018; Jori et al., 2016). The higher seroprevalence observed in Corsican domestic pigs (88%), compared with Corsican wild boars (29%) suggests a spillover of HEV from domestic pigs to wild boars (Charrier et al., 2018; Jori et al., 2016). HEV RNA was detected in two of the 24 pig samples tested (22 liver and 2 bile specimens); however, the number of tested samples was too small to estimate HEV infection rate (Jori et al., 2016). For this reason, we decided to conduct the present study in which a much larger number of pig stools were sampled and tested.

The main objective of this study was to estimate the HEV RNA detection rate in the feces of Corsican domestic pigs according to age, to perform HEV molecular characterization and to compare the results in light of pig breeding practices in Corsica.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study area and pig farms

The study was conducted in the French Mediterranean island of Corsica, which is mountainous (more than 20 summits over 2,000 m), with forested areas. It consists of two administrative departments (Haute-Corse and Corse-du-Sud) including 365 counties and a resident population of ~ 327,000 inhabitants (i.e. with a low population density of 37.7 inhabitants per km^2; Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques, 2018).

Livestock farming is a major economic activity in Corsica. More than 54,000 pigs are bred on the island, most of which belong to the local breed, "Nustrale" (Casabianca, Poggioli, Rossi, & Maestrini, 2000). Breeding activity relies on extensive and semi-extensive outdoor systems (see organization in Figure 1). Regarding outdoor semi-extensive breeding, piglets leave the mother box after weaning (around eight weeks) to join a plot where post-weaning pigs are held together with older pigs. Although parcels are large, feeding and watering points are mostly shared by all animals of the group. Pigs grow on these plots until they have reached a weight and age that are appropriate for slaughtering. Adult boars and sows (when they are not with piglets) live separately. In contrast, in the extensive breeding system, post-weaning pigs grow and eat outside of the pig farm in large natural areas where they feed on pasture, oaks and chestnuts. This specificity leads to seasonality in breeding and, therefore, in slaughtering periods (November to March; Direction régionale de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt de Corse, 2017).

2.2 | Sampling plan

Following Arya et al. (Arya, Antonisamy, & Kumar, 2012) we calculated that the minimal sample size necessary to assess an estimated 8% HEV RNA prevalence was 176 stool specimens (95% confidence interval [CI]; Di Martino et al., 2010; Hakze-van der Honing, Coillie, Antonis, & Poel, 2011; Jori et al., 2016). Thus, from April to September 2017, 16 farms were selected according to location and breeding system (Figure 2a). Each farm was visited twice to collect stool specimens. We collected fresh stool samples individually on the ground where pigs were pasturing. We also collected stools specimens from 1–6-month-old pigs, handled

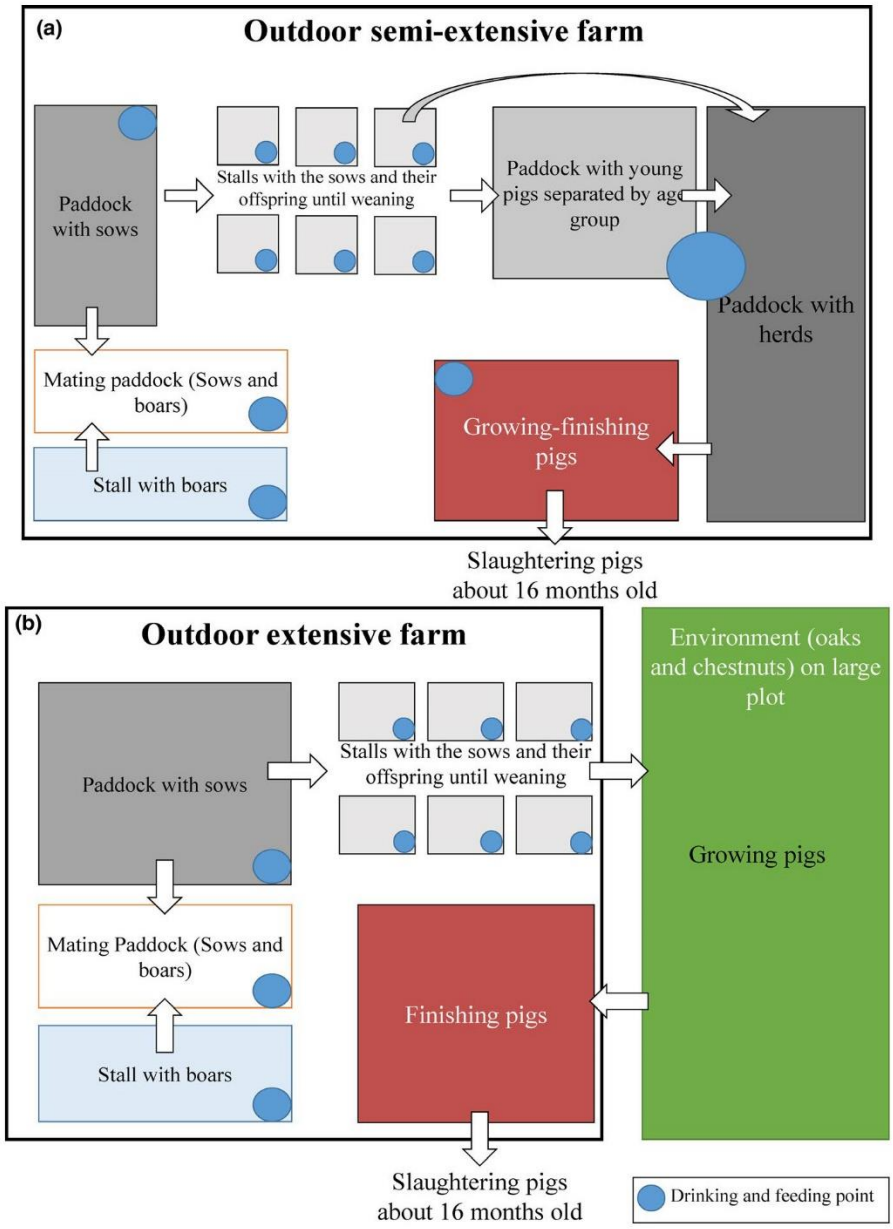


FIGURE 1 Organization of outdoor semi-extensive (a) and extensive (b) pig farms

and sampled intra-rectally with a glove and the help of a qualified technician. All samples were stored individually at −80°C until processed.

The three types of breeding systems that exist on the island were included: seven Outdoor Extensive Farms (E-farms), six Outdoor Semi-Extensive Farms (SE-farms) and three Indoor Closed Farms (C-farms; Figure 2a).

2.3 | Sample and data collection

For each stool sample, the following data were collected: department, township, anonymous breeder code, breeding type, age and race of pig, nature of the sample ("rectal" and "on the ground" faeces). Four age categories were defined among the young pigs: 1–3 months, 3–4 months, and 4–6 months. Among adult (>6 months) pigs, three categories were defined: 6–8 months, Sow/Boar (at least 18 months), and adult pigs with no exact age recorded. We classified as "Herd" group, samples from plots where post-weaning pigs were held together with older pigs (age mixed).

2.4 | HEV RNA extraction and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

One gram of faecal sample was resuspended in 9 ml of phosphate-buffered saline and then centrifuged at 5,000 × g for 10 min. The resulting supernatant was collected and stored at −80°C until processed. Viral RNA was extracted from 200 µl of supernatant using QIAamp Cador Pathogen Mini kit on a QIAcube HT (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. An internal control (T4 and MS2 phages) was spiked before extraction, to monitor the extraction and subsequent steps, as described previously (Ninove et al., 2011). Nucleic acids were eluted in 100µl of RE buffer and stored at −80°C.

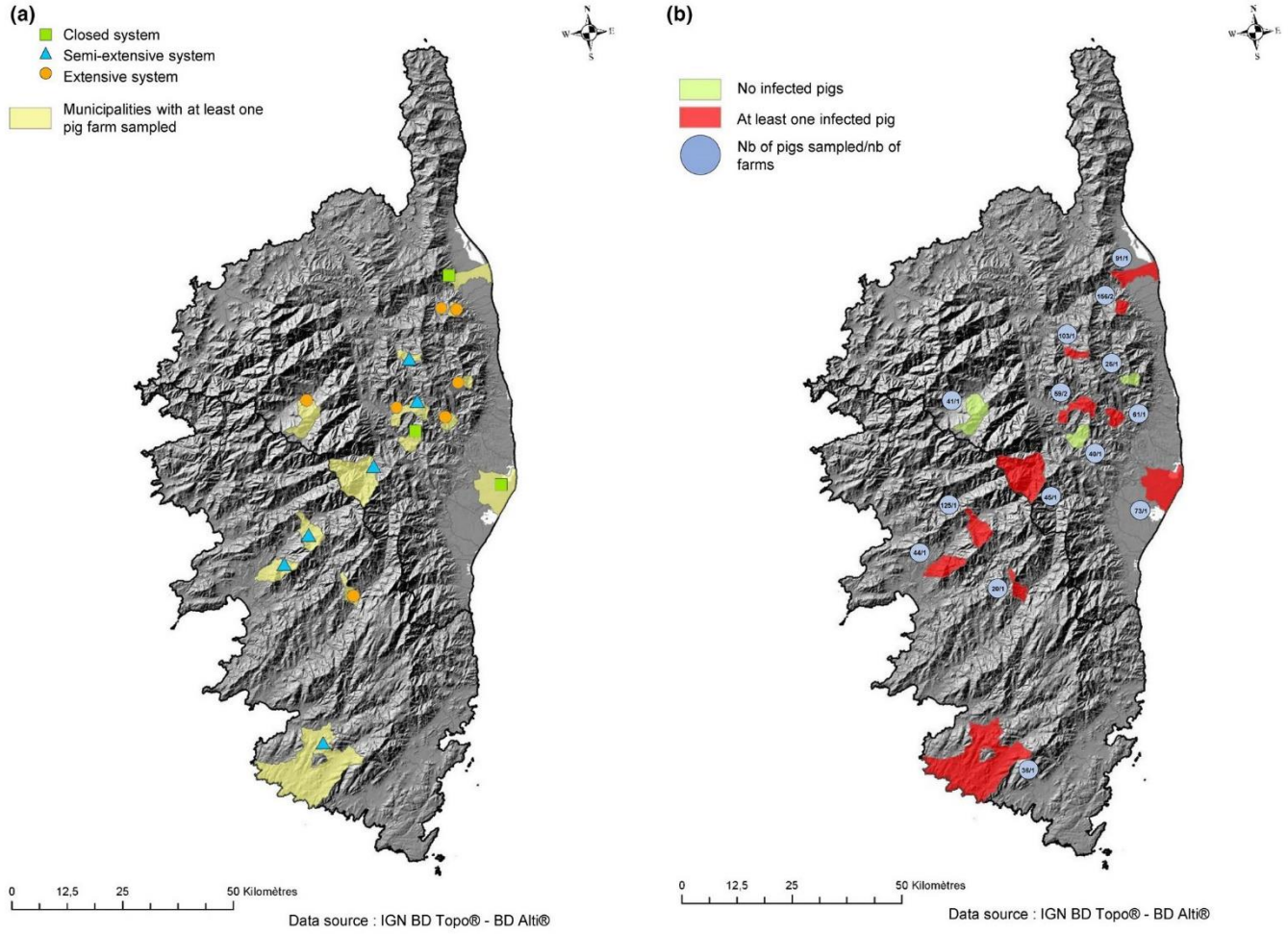


FIGURE 2 Cartography of the pig farms sampled in the study (a) and localization of infected pigs (b)

Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) for detecting HEV RNA was performed as described previously with a Applied Quant Studio 3 (Applied Biosystems; Garson et al., 2012). A qRT-PCR test was considered positive if negative controls were negative and an exponential curve was observed before a 35-Ct threshold.

2.5 | Nested RT-PCR for HEV sequencing

Nucleic acids from HEV-positive samples were amplified using the genotyping system described by Huang et al., 2002 which targets the ORF2 region (Huang et al., 2002). PCR products with the expected size of 348-bp were purified and Sanger-sequenced by Genoscreen (France).

2.6 | Phylogenetic analysis

Sequences from positive PCR products were analysed using BLASTn (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) and aligned using Mega X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). The genotype and subtype of the Corsican HEV sequences were determined by phylogenetic analysis. Therefore, only representative strains were selected from each HEV-infected farm for inclusion in the subsequent phylogenetic analysis. The genetic and phylogenetic analyses were performed using 59 sequences: (a) 28 sequences among the 85 corresponding to our positive samples; (b) 10 reference sequences according to Smith et al. (Smith et al., 2016); and 21 sequences corresponding on the five closest sequences for each of the study's strains. All 85 sequences from positive samples were deposited in the GenBank database under accession numbers MK234019 to MK234103.

Phylograms were reconstructed using Mega X (Kumar et al., 2018), using the best evolution model for the set of data identified from the data set (T3 + G+I). A bootstrap tree (1,000 replicates) was inferred using the maximum likelihood method and the Tamura 3-parameter model [T3]. A discrete Gamma distribution [+G] was used to model evolutionary rate differences between sites and the rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable [+I].

2.7 | Statistical analyses

The prevalence of RNA HEV in pig faecal samples was calculated at the individual level and at the farm level. Prevalence was

also estimated in each subgroup, and two-sided [95% CI] was calculated. Categorical variables were expressed as the number of cases (percentages). Frequencies were compared using the $\chi 2$ test or Fisher's exact test ($p < .05$). Correlation between quantitative variables was calculated using Spearman's rank-order correlation (ρ). A bivariate analysis carried out to identify the variables that were related to HEV infection. The multivariate logistic regression analysis included variables that were related to outcome variables in the bivariate analysis with a p-value < .2 or a possible association. Odds ratios (ORs), including their 95% CIs, were calculated for the logistic regression models. We also performed a logistic regression model with a random effect at the farm level taking into account that the pigs collected are not independent and that there may be an intra-fram correlation (univariate and multivariate). The risk factors analysed correspond to the fixed effects of the model. We used R package lme4-package and function glmer. All statistical analyses were performed using the R program (http://www.r-project.org). The cartography of farms and samples was made with the software ArcGIS (https://www.arcgis.com/index.html).

3 | RESULTS

3.1 | Detection rate of HEV RNA among faeces from domestic pigs and univariate analysis

The number of sampled stools per farm and their localization and the positivity according to municipality are presented in Figure 2b. Among a total of 919 samples, 85 (9.2%; 95% CI, 7.4%–11.3%) were positive for HEV RNA (Table 1). Twelve of the 16 (75%) pig farms had at least one positive sample. Four out of seven E-farms (57%), six out of six SE-farms (100%) and two out of three C-farms (67%) provided at least one positive sample. HEV detection at the farm-level varied from 1.4% to 22.7% (Table 1). The Spearman correlation coefficient showed that the HEV RNA detection rate at the farm-level was positively correlated with the mean nucleotide intra-farm distance ($\rho = 0.94$; $p = .016$).

Among the 919 stool samples collected, 825 (89.9%) were from "Nustrale" pigs, 57 (6.2%) were from hybrids pigs (wild boar/pig or Nustrale/other race), and 37 (4.0%) were from "continental

TABLE 1 Number of pigs tested, prevalence of HEV RNA according to breeding system, subtype and calculation of within farm mean nucleotide distance

Anonym code farm	System	Number of farms by system	Number of pig sampled	Number of RNA HEV positive samples	Prevalence of HEV infection by farm		Subtype	Calculation of within farm mean nucleotide distance (%)	Genebank accession number
					%	[95%CI]			
11	C-Farm	3	40	0	0.0	/	/	/	/
12			73	**1**	**1.4**	**[0.0–7.4]**	**3f**	/	**MK234046**
7			91	15	16.5	[9.5–25.7]	3c	3.90	MK234041–23404 MK234047–234050 MK234097–234102
16	E-Farm	7	16	0	0.0	/	/	/	/
1			41	0	0.0	/	/	/	/
15			25	0	0.0	/	/	/	/
6			20	1	5.0	[0.1–24.9]	3c	/	MK234034
3			94	6	6.4	[2.4–13.4]	3c	0.00	MK234019 to MK234024
10			61	7	11.5	[4.7–22.2]	3c	0.20	MK234053 to MK234059
9			62	9	14.5	[0.1–14.5]	3c	2.00	MK234025 to MK234033
13	SE-Farm	6	43	1	2.3	[0.006–12.3]	3c	/	MK234052
8			36	1	2.8	[2.4–13.4]	3c	/	MK234051
4			125	7	5.6	[2.3–11.2]	3c	0.00	MK234060 to MK234066
14			45	6	13.3	[5.0–26.8]	3c	0.23	MK234035 to MK234040
2			103	21	20.4	[13.1–29.4]	3c	2.01	MK234076 to MK234096
5			44	9	22.7	[11.5–37.8]	3c	2.53	MK234067 to MK234074, and MK234103
				1			**3f**	/	**MK234075**
Total		16	919	85	9.2	[7.4–11.3]	Compute overall mean 83 3c 2 3f	Calculation of overall mean distance (%): 3.36 (only on 3c) 4.15 (between all)	

Significance of bold values indicates $p < .05$.

TABLE 2 HEV RNA detection in stools of domestic pigs according to breeding system, race and age

Factor	Condition	Number of samples		Number of positive HEV	RNA HEV detection (%)	
		N	%		%	[95%CI]
Breeding systems	E-farm	319	34.7%	23	7.2	[4.6–10.6]
	SE-farm	396	43.1%	46	11.6	[8.6–15.2]
	C-farm	204	22.2%	16	7.8	[4.5–12.4]
Race	Nustrale	825	89.8%	83	10.1	[8.1–12.3]
	Continental French	37	4.0%	1	2.7	[0.07–14.1]
	Hybrids	57	6.2%	1	1.7	[0.04–9.4]
Age	Youngs (< 6 months)	423	46.0%	64	15.1	[11.8–18.9]
	Adults (> 6 months)	185[a]	20.1%	3[b]	1.6	[0.3–4.7]
	Herds (age mixed)	311	33.8%	18	5.8	[3.4–9.0]
All pigs		919	(100.0%)	85	9.2	[7.4–11.3]

[a]6-8 months old (n = 47); Sow/Boar (n = 30); At least 6 months old (n = 108).
[b]6-8 months old.

race" pigs (Table 2). The HEV RNA detection rate ranged from 1.7% (95% CI, 0.04%–9.4%) in "continental race" to 10.1% (95% CI, 8.1%–12.3%) in "Nustrale" pigs. Among the 311 stools collected in the "Herd" group, 5.8% (95% CI, 3.5%–9.0%) contained HEV RNA (Table 2). Stools collected from pigs bred in SE-farms (n = 396) had a significantly higher rate of HEV RNA (11.62%) than stools collected in C-farms and E-farms (7.4% p = .038; Table 2). Of the 185 adult pigs tested in our study, three pigs were positive 1.62% (95% CI, 0.3%–4.16%) and were aged 6–8 months old; two were "Nustrale" pigs and one was a continental pig (7–8 months old; Table 2). No samples from pigs older than nine months were positive (n = 30). The distribution of pigs by age group and by farm is shown in the Table S1.

A bivariate analysis based on breeding system and pig age group (young, adult and herd) showed that SE-farms (OR, 1.63; 95% CI 1.02–2.63; p = .038) and age < 6 months (OR, 4.03; 95% CI, 2.37–7.08; $p < 10^{-9}$) could be risk factors associated with HEV detection.

3.2 | Risk factors associated with HEV RNA detection in the "Nustrale" population

Of the 825 stools collected from "Nustrale" pigs, 556 (67.40%) were collected from animals with a defined age (Table 3). Of the 556 selected samples, 11.9% (95% CI, 9.3%–14.8%; n = 66) were HEV RNA positive, with the highest prevalence observed with age 3 to 4 months ($p = 10^{-8}$). In contrast, after 6 months of age, the rate of positive samples dropped drastically compared with younger pigs ($p < 10^{-16}$).

The univariate logistic regression model with a random effect at the farm level (Table 3) showed that (a) age 3–4 months was associated with a higher risk of HEV infection (OR, 7.24; 95% CI, 3.50–14.97; $p = 10^{-8}$); and (b) in contrast, after 6 months of age, the rate of positive samples dropped drastically compared with younger pigs (OR, 0.1283; 95% CI, 0.1278–0.1287; $p < 10^{-16}$). The multivariate logistic regression model with a random effect at the farm level (Table 4) showed that (a) age > 6 months (AOR, 0.25; 95% CI,

TABLE 3 Description of Nustrale pig's population with age-associated, RNA HEV seroprevalences by variables, Odd ratios and p values (univariate logistic regression model with a random effect at the farm level)

Variable	Modality	Number of samples *N*		Number of positive	RNA HEV prevalence			
		N	Distribution		%	[95%CI]	*p*-value	OR [95%CI]
Type of Breeding	E-farm	61	11.0%	8	13.1	[5.8–24.2]	0.69	1.65 [0.14–18.72]
	SE-farm	343	61.7%	43	12.5	[9.2–16.5]	0.65	1.69 [0.20–14.10]
	C-farm	152	27.3%	15	9.9	[5.6–15.7]	0.34	0.28 [0.21–3.72]
Age group	1–3 months	103	18.5%	14	13.6	[7.6–21.7]	0.69	1.25 [0.40–3.89]
	3–4 months	137	24.6%	30	21.9	[15.3–29.8]	**10^{-8}**	**7.24 [3.50–14.97]**
	4–6 months	171	30.7%	20	11.7	[7.3–17.5]	0.073	0.53 [0.27–1.06]
	<6 months	411	73.9%	64	15.6	[5.8–24.2]	**$<10^{-16}$**	**7.79 [7.76–7.82]**
	> 6 months	145	26.1%	2	1.4	[12.1–19.4]	$<10^{-16}$	**0.1283 [0.1278–0.1287]**
All		556	100%	66	11.9	[9.3–14.8]		

Significance of bold values indicates p < .05.

TABLE 4 Statistical analysis of factor associated with hepatitis E (multivariate logistic regression model with a random effect at the farm level), the table includes only factors associated with *p*-value <.05

Factor	Condition	AOR	[95%CI]	*p* value adjusted
Age group	3–4 months	4.94	[2.30–10.62]	.000043
Age group	age >6 months	0.25	[0.068–0.90]	.032

0.068–0.90; $p = .032$) and (b) the 3–4 months old pigs (AOR, 4.94; 95% CI, 2.30–10.62; $p = .000043$) were factors associated with the presence of viral RNA in the pig stools collected in the "Nustrale" population.

3.3 | Genetic and phylogenic analyses

All 85 sequences corresponded to strains belonging to genotype 3 of HEV: (a) 83 samples (97.6%) were subtyped as genotype 3c, and (b) two samples (2.4%) were subtyped as genotype 3f. The 28 selected sequences represented the diversity among the strains detected and were distributed into two clusters (Figure 3).

Cluster 1 belonged to subtype 3c and comprised 26 sequences that exhibited 96.64% nt identity. These sequences were identified in 11 pig farms and were close to the reference genotype 3c sequence (95%–98% identity depending on the sequence; FJ705359.1). The genetic distance observed between the sequences obtained from the same farm ranged between 0.00% and 3.90%, with an overall mean distance between the 83 sequences of 3.36% (Table 1). The nucleotide distance between farms ranged from 0.00% to 8.34%.

Cluster 2, belonged to subtype 3f and comprised two sequences from pigs sampled in our study, that exhibited 99% nt identity. These sequences were collected from two different farms (one C-farm and one SE-farm).

4 | DISCUSSION

Over the last years, the number of human cases of HEV infection has increased in Europe. Acute cases mostly affect male adults older than 60 (ECDC, 2017). HEV-3 and HEV-4 are responsible for the majority of cases in high-income countries, most likely because of the consumption of contaminated food. Specifically, the role of insufficiently cooked pork meat and cured meats has been increasingly suggested (Berto et al., 2013; Dalton, Bendall, Ijaz, & Banks, 2008; Kamar et al., 2012; Renou et al., 2014). As a zoonotic virus, HEV does not seem to have any pathogenesis in Suidae (Pavio, Doceul, Bagdassarian, & Johne, 2017). Interestingly, there is no indicator suggesting acute or chronic HEV infection in pigs; therefore, viral circulation can be unnoticed in pig breeding farms. The human seroprevalence in south-eastern France, including Corsica, is higher than 50%, making southern France a hotspot for HEV (Mansuy et al., 2016). There, acute cases have been undoubtedly associated with consumption of pig meat and more specifically of sausage made of pig liver, called ficatellu. Recent studies have demonstrated that commercially available ficatellu sausages can be infected with HEV in a significant proportion (Colson et al., 2010; Pavio et al., 2014; Renou et al., 2014) and therefore can be an important source of infections.

In this study, we aimed to describe risk factors associated with HEV infection in pigs to understand better the risk associated with consumption of pig meat and pig-derived products in Corsica. Pigs raised for meat and cold meat (including liver-derived products) consumption are generally slaughtered at the age of 6–7 months in French intensive farms. Most of these pigs belong to the classic races used for breeding such as "Large White" and "Landrace Français." In Corsica and south-western France, several ancient breeds, such as "Nustrale" (Corsica), are maintained, and are slaughtered later, at the age of 14–18 months, after being fed mainly with natural resources in a more or less wildlife environment. Thus, the existence of a relationship between the age of pig slaughter and the risk of HEV transmission deserves attention since it may guide safety measures applied for preventing contamination related with consumption of pig liver-derived products such as ficatellu. Our study focused on the craft sector, which predominantly raises the local pig breed "Nustrale" in Corsica.

Of the 16 farms in which samples were collected, four provided negative results. The remaining 12 farms in which HEV RNA positive samples were detected are disseminated in different regions of Corsica without clustering into geographically defined hotspots. The vast majority of HEV RNA positive samples (83/85) contained sequences corresponding to genotype 3c, which has been associated with human infections (Koot, Hogema, Koot, Molier, & Zaaijer, 2015; Lhomme et al., 2015; Wang et al., 2018), and found highly prevalent in wild boars (Pavio et al., 2016), domestic pigs, and pork meat products (Boxman et al., 2017). The two remaining samples contained sequences of genotype 3f, which has also been reported in human infections in Europe (Fogeda, Avellon, Cilla, & Echevarria, 2009; La Rosa et al., 2011; Lhomme et al., 2015; Wang et al., 2018). Interestingly, the shape of the phylogram did not support the clonality of the 83 genotype 3c sequences; these 83 sequences belonged to multiple genetic clusters that also included sequences corresponding to strains identified in human cases and in ficatellu (Pavio et al., 2014). Several of our sequences were most closely related to sequences corresponding to wild boars, suggesting that viral strains are exchanged between domestic pigs and wild boars in both directions. The shape of the phylogram did not support the clonality expected in the case of an epidemic event, but is more congruent with the hypothesis of a continuous exchange of strains between the domestic and the wildlife environments. This widespread distribution agrees with a previous study showing an IgG anti-HEV seroprevalence of 100% at Corsican farm level (Jori et al., 2016).

Despite the very high seroprevalence values in pigs and humans in Corsica (Jori et al., 2016; Mansuy et al., 2016), the infection rate in our study was only 10%. This may be because pigs were sampled only once, and PCR negative pigs could be associated

with early sampling (before infection) or late sampling (after recovery). The duration of HEV excretion in the stools remains poorly characterized, with reports varying from few days (Andraud et al., 2013) to >40 days (Bouwknegt et al., 2008). A Finnish study has reported a higher infection rate (>80%; Kantala, Heinonen, Oristo, Bonsdorff, & Maunula, 2015) among young pigs sampled

FIGURE 3 Phylogenetic tree of the hepatitis E virus (HEV) sequences identified among domestic Corsican pigs (feces). The tree with the highest log likelihood (−2509.36) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach, followed by selection of the topology with a superior log-likelihood value. A discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences between sites (five categories [+G, parameter = 1.9665]). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I]; 59.66% of sites). The tree is drawn to scale, with branch length depicted in the number of substitutions per site. This analysis involved 59 nucleotide sequences. There were a total of 291 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X. The GenBank accession number according to farm is shown in Table 1. The code presented next to the GenBank accession number means: Country France (FR), swine hepatitis E virus (SHEV), Region code (20), followed by the sample code, and the year (2017; example: FR-SHEV-20-G06-17)

repeatedly and followed up after weaning. In our study, the incidence of HEV infection peaked between 3 and 4 months; subsequently, the immune response progressively cleared HEV from stools and tissues. This result confirmed the kinetics of infection proposed previously in intensive conditions (Salines et al., 2017). The kinetics of infection would not depend on the type of breeding. Indeed, despite a later weaning age in traditional breeding the peak of infection is confirmed. This confirms that piglet passive immunity derived from colostrum and not from breastfeeding (Bourne & Curtis, 1973). Indeed, immunoglobulins A, G and M decrease after farrowing (Klobasa & Butler, 1987).

The type of breeding system could have an impact on the rate of infection. SE-farms showed a higher prevalence rate compared with E-farms and C-farms (11.62% vs. 7%; $p < .05$ and data from the Table S2). This may be related to the organization (Figure 1a) of SE-farms, in which post-weaning pigs (1–2 months old) are kept together with older pigs. After the age of 1–2 months, pigs are no longer protected by maternal immunity and are exposed to HEV infection from environmental sources, such as stool- and urine-contaminated soil and water (Banks et al., 2004; Bouwknegt et al., 2009; Fernandez-Barredo et al., 2006; Salines et al., 2017). In contrast, in E-farms, pigs do not live in the same areas and travel distances on different plots outside the farm (pastures, and chestnut and oak woods), which potentially act as a "dilution effect" regarding HEV exposure. It should be noted that in the three extensive farms with no positive detected only herd population was sampled (Appendix Table 1). As reported previously in Corsica and Spain (Jori et al., 2016; Lopez-Lopez et al., 2018), C-farms seem to be less prone to HEV contamination (9.9% vs. 13%) because (a) indoor stalling allows regular cleaning, (b) pigs are maintained in age-dependent smaller boxes and (c) pigs have no contact with environmental sources such as running water and wild fauna. However, with the logistic regression taking into account that the pigs collected are not independent and that there may be an intra-fram correlation, the effect of the type of breeding is no longer present. It would, therefore, be necessary in a future study to establish a different sampling to verify this trend.

Interestingly, here is a clear difference in the distribution of genotypes observed in pigs and in human cases. Although genotype 3c was predominant in our study, human cases reported were more frequently due to strains belonging to genotype 3f (Nicot et al., 2018; Suin et al., 2019); recently genotype 3c strains are increasingly reported in human cases (Lhomme et al., 2015). Since both genotypes hold a similar pathogenicity (Smith et al., 2015), this suggests that in Corsica human infections are not acquired from consumption of pig products produced by the traditional breeding system. A similar situation has been observed in Estonia were authors suggested that HEV infections in Estonia are most likely associated with travel or with consumption of imported food products (Kuznetsova et al., 2018). Alternatively, it may reflect a changing pattern in the local epidemiology of HEV with a shift from genotype 3f to genotype 3c as witnessed by pig's data that might be an indicator for yet to come human cases.

The major limitation of our study is the sampling strategy. It was impossible to sample the same number of pigs in each farm (a) because of the drastic discrepancies in the headcounts and respective ages, (b) due to difficulties to obtain stools specimens attributable to identified individuals (no boxes and large parcels of land), (c) and due to many farms holding small number of pigs. For these reasons, we were forced to build up our study on a global scale rather than individual farm scale.

The most striking finding of our study was that pigs > 6 months were almost never found positive for HEV RNA, in contrast to pigs aged 3–4 months, which is the age class in which the highest incidence was observed. Interestingly, the two HEV-positive samples found in pigs older than 6 months were observed in two animals that were <9 months. The same trend was described in a recent Corsican seroprevalence study (Jori et al., 2016) which found increasing IgG seroprevalence with age (despite a very limited number of pig samples to estimate HEV infection rate ($n = 24$; 22 liver and two bile samples). It is, therefore, likely that pigs acquiring HEV infection when they are 2–4 month old raise a strong immune response resulting in virus clearance by the age of 6–8 months, as supported by very low infection rate in adults (Salines et al., 2017). Our study was not designed to address viral kinetics in "Nustrale" pigs, between the age of 6 months and two years. However, our results suggest that breeding "Nustrale" pigs which are slaughtered at 14–18 months of age, are associated with a much lower risk of HEV contaminated products compared with the situation in the industrial system where pigs are slaughtered much younger when the risk of HEV contamination is higher.

According to our results and the kinetics of infection, higher age of slaughtering is associated with a lower risk of HEV presence in the food products. Therefore, the risk of having meat or liver products originating from "Nustrale" pigs bred traditionally that are positive for HEV RNA is very low. This is the first description of a possible protective effect of traditional breeding practices. These results

observed in our study merit to be confirmed by conducting a study assessing kinetics of HEV infection from birth to slaughtering to unambiguously demonstrate the lower risk of infection associated with traditional breeding behaviour.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to all breeders for their participation in the study. The authors also thank Delphine Bawin for technical assistance in swine sample analysis during her internship. This study is part of a thesis funded by the territorial collectivity of Corsica (CDC) and the National Institute of Health and Medical Research (INSERM). Moreover, the Hepatitis E Virus project of EA BIOSCOPE is also financed by the territorial collectivity of Corsica (CDC).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

The study was exempt of authorization because the molecular analysis was carried out on stool samples collected from live pigs (or on the ground) by technicians. All the breeders gave their explicit agreement for the collection of the samples and all the data was anonymized.

ORCID

Lisandru Capai https://orcid.org/0000-0002-3618-1582

Alessandra Falchi https://orcid.org/0000-0003-0799-1460

REFERENCES

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Andraud, M., Dumarest, M., Cariolet, R., Aylaj, B., Barnaud, E., Eono, F., … Rose, N. (2013). Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Veterinary Research*, *44*, 102. https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-102

Arya, R., Antonisamy, B., & Kumar, S. (2012). Sample size estimation in prevalence studies. *Indian Journal of Pediatrics*, *79*(11), 1482–1488. https://doi.org/10.1007/s12098-012-0763-3

Assemblée de Corse (2006). *Plan de relance de la filière porcine Corse*. Collectivité Territoriale De Corse.

Balayart, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., & Poleschuk, V. F. (1983). Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, *20*(1), 23–31. https://doi.org/10.1159/000149370

Banks, M., Heath, G. S., Grierson, S. S., King, D. P., Gresham, A., Girones, R., … Harrison, T. J. (2004). Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, *154*(8), 223–227. https://doi.org/10.1136/vr.154.8.223

Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., & Pavio, N. (2012). Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and Environment Microbiology*, *78*(15), 5153–5159. https://doi.org/10.1128/AEM.00436-12

Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., … Banks, M. (2013). Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(2), 264–266. https://doi.org/10.3201/eid1902.121255

Bourne, F. J., & Curtis, J. (1973). The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunology*, *24*(1), 157–162.

Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S. A., Wellenberg, G. J., de Roda Husman, A. M., van der Poel, W. H. M., & de Jong, M. C. M. (2008). Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Veterinary Research*, *39*(5), 40. https://doi.org/10.1051/vetres:2008017

Bouwknegt, M., Rutjes, S. A., Reusken, C. B. E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M. C. M., … van der Poel, W. H. M. (2009). The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Veterinary Research*, *5*, 7. https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-7

Boxman, I. L. A., Jansen, C. C. C., Hägele, G., Zwartkruis-Nahuis, A., Cremer, J., Vennema, H., & Tijsma, A. S. L. (2017). Porcine blood used as ingredient in meat productions may serve as a vehicle for hepatitis E virus transmission. *International Journal of Food Microbiology*, *257*, 225–231. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.029

Bradley-Stewart, A., Ijaz, S., Harvala, H., Hogema, B., Izopet, J., Tedder, R. S., … Gunson, R. (2015). Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *Journal of General Virology*, *96*(11), 3255–3264. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000264

Casabianca, F., Poggioli, A., Rossi, J. D., & Maestrini, O. (2000). *The beginning of collective management for the Corsican pig breed*. Building up a standard and elaborating the breeders performance recording: Retrieved from.

Charrier, F., Rossi, S., Jori, F., Maestrini, O., Richomme, C., Casabianca, F., … Le Potier, M.-F. (2018). Aujeszky's disease and hepatitis E viruses transmission between domestic pigs and wild boars in corsica: evaluating the importance of wild/domestic interactions and the efficacy of management measures. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*, 1. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00001

Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., … Gerolami, R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *Journal of Infectious Diseases*, *202*(6), 825–834. https://doi.org/10.1086/655898

Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S., & Banks, M. (2008). Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *The Lancet Infectious Diseases*, *8*(11), 698–709. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X

Di Martino, B., Di Profio, F., Martella, V., Di Felice, E., Di Francesco, C. E., Ceci, C., & Marsilio, F. (2010). Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Archives of Virology*, *155*(1), 103–106. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0544-0

Direction régionale de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt de Corse. (2017). *Chiffres clés de l'agriculture corse - Edition 2017 - bilan de campagne 2016*.

ECDC. (2017). *Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015 Baseline assessment of testing, diagnosis, surveillance and epidemiology*. Retrieved from Stockolm: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/HEV_Surveillance-report-2005-2015.pdf.

Echevarría, J. M., González, J. E., Lewis-Ximenez, L. L., dos Santos, D. R. L., Munné, M. S., Pinto, M. A., … Rodríguez-Lay, L. A. (2013). Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *Journal of Medical Virology*, *85*(6), 1037–1045. https://doi.org/10.1002/jmv.23526

Emerson, S. U., Arankalle, V. A., & Purcell, R. H. (2005). Thermal stability of hepatitis E virus. *Journal of Infectious Diseases*, *192*(5), 930–933. https://doi.org/10.1086/432488

Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M. T., & Perez-Gracia, M. T. (2006). Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *18*(5), 462–465. https://doi.org/10.1177/104063870601800506

Fogeda, M., Avellon, A., Cilla, C. G., & Echevarria, J. M. (2009). Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *Journal of Medical Virology*, *81*(10), 1743–1749. https://doi.org/10.1002/jmv.21564

Garson, J. A., Ferns, R. B., Grant, P. R., Ijaz, S., Nastouli, E., Szypulska, R., & Tedder, R. S. (2012). Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *Journal of Virological Methods*, *186*(1–2), 157–160. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.027

Hakze-van der Honing, R. W., van Coillie, E., Antonis, A. F., & van der Poel, W. H. (2011). First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS ONE*, *6*(8), e22673. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022673

Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., … Meng, X. J. (2002). Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(4), 1326–1332. https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1326-1332.2002

Institut National and de la Statistique et des Etudes Economiques. (2018). *Comparateur de territoire Région de Corse (94)*. Retrieved from https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=REG-94.

Jori, F., Laval, M., Maestrini, O., Casabianca, F., Charrier, F., & Pavio, N. (2016). Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France. *Viruses*, *8*(8), https://doi.org/10.3390/v8080236

Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., & Dalton, H. R. (2012). Hepatitis E. *The Lancet*, *379*(9835), 2477–2488. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61849-7

Kantala, T., Heinonen, M., Oristo, S., von Bonsdorff, C. H., & Maunula, L. (2015). Hepatitis E virus in young pigs in Finland and characterization of the isolated partial genomic sequences of genotype 3 HEV. *Foodborne Pathogens and Disease*, *12*(3), 253–260. https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1841

Kim, J. H., Nelson, K. E., Panzner, U., Kasture, Y., Labrique, A. B., & Wierzba, T. F. (2014). A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infectious Diseases*, *14*, 308. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-308

Klobasa, F., & Butler, J. E. (1987). Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers. *American Journal of Veterinary Research*, *48*(2), 176–182.

Koot, H., Hogema, B. M., Koot, M., Molier, M., & Zaaijer, H. L. (2015). Frequent hepatitis E in the Netherlands without traveling or immunosuppression. *Journal of Clinical Virology*, *62*, 38–40. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.11.020

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Kuznetsova, T. V., Ivanova-Pozdejeva, A., Reshetnjak, I., Geller, J., Värv, K., Rumvolt, R., … Golovljova, I. (2018). Hepatitis E virus infection in different groups of Estonian patients and people who inject drugs. *Journal of Clinical Virology*, *104*, 5–10. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.011

La Rosa, G., Muscillo, M., Vennarucci, V. S., Garbuglia, A. R., La Scala, P., & Capobianchi, M. R. (2011). Hepatitis E virus in Italy: Molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *Journal of General Virology*, *92*(Pt 7), 1617–1626. https://doi.org/10.1099/vir.0.031278-0

Legrand-Abravanel, F., Mansuy, J.-M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J.-M., Rostaing, L., & Izopet, J. (2009). Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(1), 110–114. https://doi.org/10.3201/eid1501.080296

Lhomme, S., Abravanel, F., Dubois, M., Chapuy-Regaud, S., Sandres-Saune, K., Mansuy, J.-M., … Izopet, J. (2015). Temporal evolution of the distribution of hepatitis E virus genotypes in Southwestern France. *Infection, Genetics and Evolution*, *35*, 50–55. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.028

Lopez-Lopez, P., Risalde, M. D. L. A., Frias, M., García-Bocanegra, I., Brieva, T., Caballero-Gomez, J., … Rivero-Juarez, A. (2018). Risk factors associated with hepatitis E virus in pigs from different production systems. *Veterinary Microbiology*, *224*, 88–92. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.020

Lu, L., Li, C., & Hagedorn, C. H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology*, *16*(1), 5–36. https://doi.org/10.1002/rmv.482

Mansuy, J. M., Gallian, P., Dimeglio, C., Saune, K., Arnaud, C., Pelletier, B., … Izopet, J. (2016). A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*, *63*(4), 1145–1154. https://doi.org/10.1002/hep.28436

Nicot, F., Jeanne, N., Roulet, A., Lefebvre, C., Carcenac, R., Manno, M., … Izopet, J. (2018). Diversity of hepatitis E virus genotype 3. *Reviews in Medical Virology*, *28*(5), e1987. https://doi.org/10.1002/rmv.1987

Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Thirion, L., Delogu, I., Zandotti, C., … De Lamballerie, X. (2011). RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: A comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS ONE*, *6*(2), e16142. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016142

Pavio, N., Doceul, V., Bagdassarian, E., & Johne, R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary Research*, *48*(1), 78. https://doi.org/10.1186/s13567-017-0483-9

Pavio, N., Laval, M., Maestrini, O., Casabianca, F., Charrier, F., & Jori, F. (2016). Possible foodborne transmission of hepatitis E virus from domestic pigs and wild boars from Corsica. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(12), 2197–2199. https://doi.org/10.3201/eid2212.160612

Pavio, N., Merbah, T., & Thebault, A. (2014). Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(11), 1925–1927. https://doi.org/10.3201/eid2011.140891

Relun, A., Charrier, F., Trabucco, B., Maestrini, O., Molia, S., Chavernac, D., … Jori, F. (2015). Multivariate analysis of traditional pig management practices and their potential impact on the spread of infectious diseases in Corsica. *Preventive Veterinary Medicine*, *121*(3–4), 246–256. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.004

Renou, C., Roque-Afonso, A. M., & Pavio, N. (2014). Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage. *France. Emerg Infect Dis*, *20*(11), 1945–1947. https://doi.org/10.3201/eid2011.140791

Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., … Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *34*(5), 419–427. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.07.003

Salines, M., Andraud, M., & Rose, N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: A comprehensive review. *Veterinary Research*, *48*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s13567-017-0436-3

Suin, V., Klamer, S. E., Hutse, V., Wautier, M., Jacques, M., Abady, M., …Gucht, S. (2019). Epidemiology and genotype 3 subtype dynamics of hepatitis E virus in Belgium, 2010 to 2017. *Eurosurveillance*, *24*(10), https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.10.1800141.

Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C.-C., Bradley, D. W., Fry, K. E., & Reyes, G. R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, *185*(1), 120–131. https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90760-9

Territoires, D. G. P. A. A. (ed.) (2012). *Cahier des charges de l'appellation d'origine « Jambon sec de Corse » ou « Jambon sec de Corse – Prisuttu » homologué par le décret n° 2012-445 du 2 avril 2012*. In Bulletin officiel n°14 du 06-04-12. (Vol. 14).

Van der Poel, W. H. M., Meng, X.-J., Koenig, M., Harrison, T. J., Oliveira-Filho, E. F., Johne, R., … Izopet, J. (2016). Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *Journal of General Virology*, *97*(3), 537–542. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393

Wang, B. O., Harms, D., Papp, C. P., Niendorf, S., Jacobsen, S., Lütgehetmann, M., … Bock, C.-T. (2018). Comprehensive Molecular approach for characterization of hepatitis E virus genotype 3 variants. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(5), https://doi.org/10.1128/JCM.01686-17

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Capai L, Maestrini O, Casabianca F, et al. Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France. *Transbound Emerg Dis*. 2019;00:1–12. https://doi.org/10.1111/tbed.13304

Travaux complémentaires réalisés sur les fèces de porcs domestiques corses

Essais de culture cellulaire du HEV et première identification et caractérisation d'un Sapelovirus porcin en Corse, France, 2017.

Les travaux présentés ici ont été effectuées en collaboration avec notre équipe partenaire de l'Université d'Aix Marseille. L'unité des virus émergents (UVE), IRD 190 est dirigée par Xavier de Lambellerie et dans laquelle travaille également mon co-directeur Rémi Charrel.

Ce travail autour de l'identification du Sapelovirus a mené à la publication d'un Article Genome Announcement dans le journal Microbiology Ressource Announcements (Piorkowski *et al.*, 2018) (Figure 14). Ce papier a été publié en co-premier auteur avec Géraldine Piorkowski qui travaille également au sein de l'UVE.

Suite à la collecte des échantillons de fèces de l'étude présentée dans le Chapitre 3 (infection par le HEV au sein de la filière porcine en Corse) différents tests de cultures cellulaires ont été réalisés. Parmi ces tests, différents échantillons positifs au HEV ont été mis en culture sur des cellules PLC/PRF/5 d'hépatocarcinome humain.

D'autres tests ont été réalisés pour la culture du virus de l'hépatite E par Odile Py de l'Unité des Virus Emergents mais à ce jour aucune culture n'a abouti. Les difficultés rencontrées sont dues au fait que le HEV est présent dans les fèces avec de nombreux autres virus qui se multiplient rapidement en produisant des effets cytopathiques (ECP) alors que le HEV se multiplie très lentement sans ECP. Il est donc très difficile de l'obtenir en culture en l'absence de cellules spécifiquement sélectives. Différents types de cellules ont été testés : les Hep G2 (lignée d'hépatoblastome humain) et A 549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines) ont donné très peu de résultats et ont donc été abandonnées. Les tests actuellement en cours sont effectués avec un mélange de cellules PK1 qui sont des cellules de rein de porc et les PLC/PRF/5.

De façon inattendue, parmi les échantillons positifs au HEV testés sur des cellules PLC/PRF/5, un effet cytopathique important a été observé pour un échantillon sans que le HEV soit détecté dans le surnageant. Ce dernier provenait d'un porc de 3-4 mois, femelle, de race Nustrale, née et élevée en Corse. Par la suite, l'ARN viral du surnageant de culture a été extrait avec le minikit 2.0 EZ1 (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. La transcription inverse, l'amplification non spécifique et la construction de bibliothèques ont été effectuées comme décrit précédemment (Stang *et al.*, 2005). Par la suite, un séquençage utilisant la technologie Ion S5 (Thermo Fisher) a été réalisé et les données ont été traitées comme décrit précédemment (Piorkowski *et al.*, 2017) avec le logiciel CLC Genomics Workbench (Qiagen). Enfin, un arbre

phylogénétique à partir de différentes souches de référence du Sapelovirus a été réalisé avec le logiciel MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

L'analyse du surnageant de la culture cellulaire a donc permis d'identifier un Sapelovirus. La souche a été nommée PSV OPY-1-Corsica-2017 et mis à disposition dans la collection European Virus Archive (et sous GenBank numéro d'accession MH513612). Il s'agit de la première identification du virus Sapelovirus en France et cette souche présentait un pourcentage d'identité nucléotidique de 87% avec une souche allemande (Numéro d'accession GENBANK : LT900497.1).

En conclusion, nous avons identifié et caractérisé pour la première fois un Sapelovirus porcin en France, dans la région Corse. Fait important, le porcelet infecté par le PSV à partir duquel le PSV OPY-1-Corsica-2017 a été isolé est né et a grandi en Corse. Cela pourrait suggérer une transmission locale et une endémicité du virus.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Resource Announcements

GENOME SEQUENCES

First Identification and Genomic Characterization of a Porcine Sapelovirus from Corsica, France, 2017

Géraldine Piorkowski,[a] Lisandru Capai,[b] Alessandra Falchi,[b] François Casabianca,[c] Oscar Maestrini,[c] Pierre Gallian,[a,d] Karine Barthélémy,[a] Odile Py,[a] Rémi Charrel,[a] Xavier de Lamballerie[a]

[a]Unité des Virus Émergents, Marseille, France
[b]Laboratoire de Virologie, Université de Corse-INSERM, Corte, France
[c]INRA, UR045 LRDE, Corte, France
[d]Établissement Français du Sang Alpes Méditerranée, Marseille, France

ABSTRACT We report the isolation and genomic characterization of a *Sapelovirus A* strain, or porcine sapelovirus (PSV), from a diarrheic Corsican piglet in France. It shares 87% nucleotide identity with a 2014 German isolate.

Porcine sapelovirus (PSV; family *Picornaviridae*, genus *Sapelovirus*) is a 7.5- to 8.3-kb single-stranded, positive-sense polyadenylated and nonenveloped RNA virus. The genus is closely related to the genus *Enterovirus* and includes three species, *Avian sapelovirus*, *Sapelovirus A* (porcine sapelovirus), and *Sapelovirus B* (simian sapelovirus). It consists of a single serotype. PSV is transmitted by the fecal-oral route, and infection can be asymptomatic or associated with diarrhea, respiratory distress, encephalitis, skin lesions, and reproductive disorders (1–3). The virus has been detected worldwide in Asia (China [2], India [1], and South Korea [4, 5]), the Americas (United States [6, 7] and Brazil [8]), and Europe (Germany, United Kingdom [9], and Spain [10]).

During a campaign dedicated to identifying pigs infected by the hepatitis E virus (HEV), stool samples with positive reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR) detection of the HEV genome were inoculated onto cell cultures (PLC/PRF/5 cells). Unexpectedly, a gross cytopathic effect (CPE) was observed for one specimen. It was sampled in 2017 from a 3- to 4-month-old female Nustrale (Corsican breed) piglet in a farm located in the northeast of Corsica, France. While CPE was maintained after passaging the culture supernatant, HEV was not detected, suggesting isolation of a different virus. Viral RNA was extracted from the cell culture supernatant at passage 1, using the EZ1 device and EZ1 virus minikit 2.0 (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription, nonspecific amplification, and library building were performed as previously described (11), followed by sequencing using Ion S5 technology (Thermo Fisher).

Data were treated as previously reported (12). In brief, the 95,906 reads obtained were cleaned, using CLC Genomics Workbench software v11.0.1, according to quality score (limit, 0.01) and length (reads shorter than 100 bp were removed). *De novo* assembly (requirements included the following: map reads back to contigs, mismatch cost, 2 occurrences; insertion cost, 3 occurrences; deletion cost, 3 occurrences; length fraction, 50%; similarity fraction, 80%; and minimum contig length, 350 bp) was realized, and a 7,532-nucleotide (nt)-long PSV consensus sequence, including the complete open reading frame (ORF) (7,014 nt, determined from the CLC Genomics Workbench v11.0.1 software pipeline: start codon ATG, and standard genetic code), was identified from 49,761 reads. Partial 5′ and 3′ noncoding region sequences were obtained (423/480 and 95/106 nt long, respectively, with reference to previously published PSV sequences (GenBank accession no. KJ821019, KX574284, LC326555, JX286666, and KF539414). According to current knowledge (4, 6, 13), the ORF encodes

Received 26 July 2018 **Accepted** 24 August 2018 **Published** 20 September 2018

Citation Piorkowski G, Capai L, Falchi A, Casabianca F, Maestrini O, Gallian P, Barthélémy K, Py O, Charrel R, de Lamballerie X. 2018. First identification and genomic characterization of a porcine sapelovirus from Corsica, France, 2017. Microbiol Resour Announc 7:e01049-18. https://doi.org/10.1128/MRA.01049-18.

Editor Irene L. G. Newton, Indiana University Bloomington

Copyright © 2018 Piorkowski et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Géraldine Piorkowski, geraldine.piorkowski@gmail.com.

G.P. and L.C. contributed equally to this study.

Downloaded from http://mra.asm.org/ on September 26, 2018 by guest

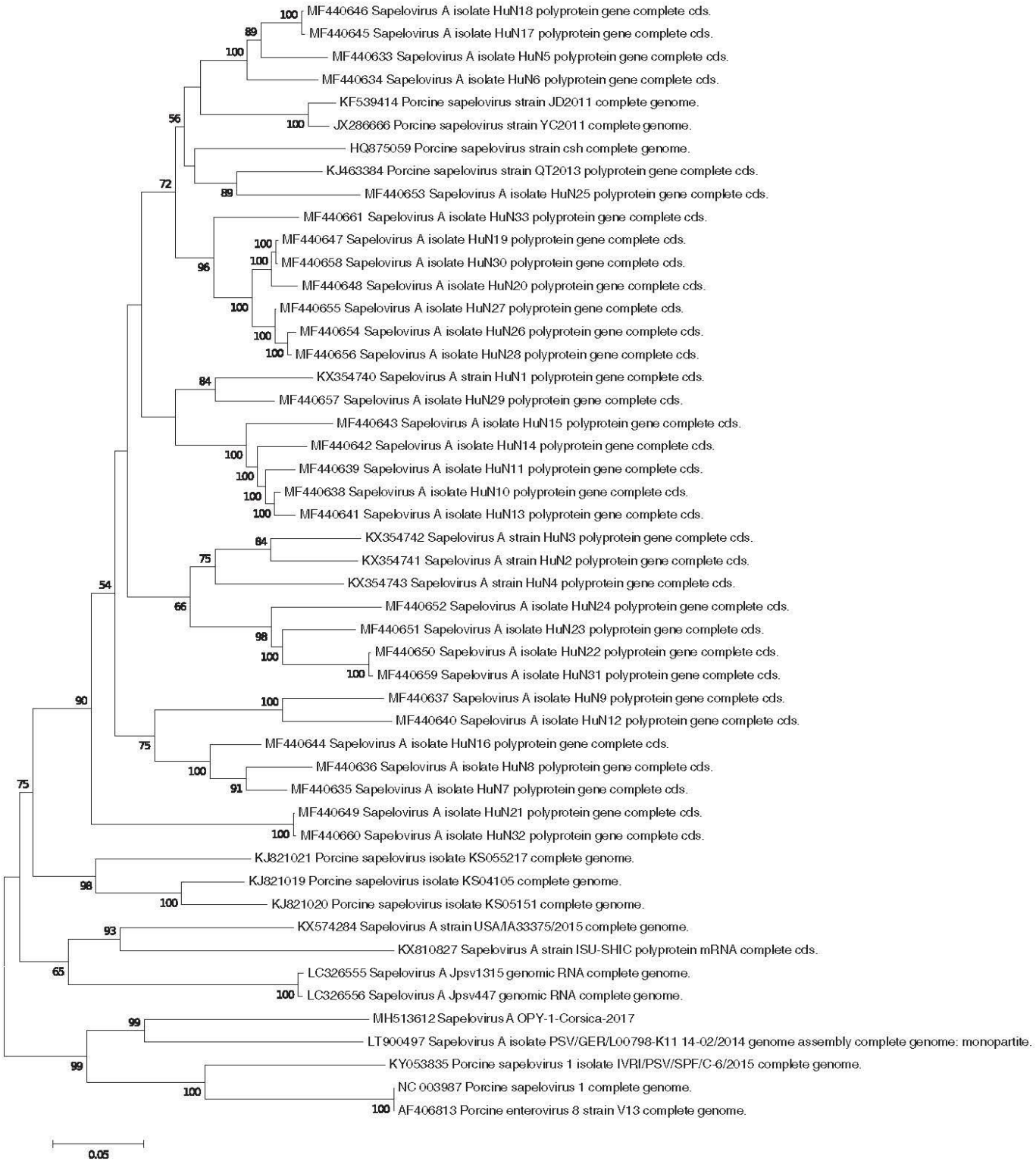


FIG 1 Phylogenetic tree reconstructed from PSV ORF nucleotide sequences using the maximum likelihood algorithm, 500 resampling bootstraps (GTR+G+I model, determined from the data set), and the MEGA 6.06 software.

four structural proteins (VP4, VP3, VP2, and VP1) and seven nonstructural proteins (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D). The strain was assigned the name PSV OPY-1-Corsica-2017 and made available in the European Virus Archive collection (and under GenBank accession no. MH513612).

Downloaded from http://mra.asm.org/ on September 26, 2018 by guest

A maximum likelihood phylogenetic reconstruction (GTR+G+I model chosen from the best model option on MEGA6 software, determined from the data set using the MEGA6 program [14]) was obtained using full ORF sequences and indicates that PSV OPY-1-Corsica-2017 is close to a 2014 German isolate (GenBank accession no. LT900497), with ca. 87% nt (6,561/7,527) and 96% amino acid (aa) (2,238/2,337) identities (Fig. 1). Phylogenetically, PSV OPY-1-Corsica-2017 clusters with Indian (KY053835) and German (LT900497, NC_003987, and AF406813) PSV isolates and is clearly separated from other strains isolated from China and the United States, among others.

In conclusion, we identified and characterized for the first time a porcine sapelovirus in France, on the Mediterranean island of Corsica. Importantly, the PSV-infected piglet from which PSV OPY-1-Corsica-2017 was isolated was born and farmed in Corsica. This is strongly suggestive of local transmission of the endemic virus.

Data availability. The genome sequence reported here has been deposited in the GenBank database under the accession no. MH513612.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the farmers who provided the samples used in the current study.

This study was supported by the Corsica territorial collectivity and by the European Virus Archive goes Global (EVAg) project (European Union–Horizon 2020 program) under grant agreement no. 653316.

REFERENCES

1. Ray PK, Desingu PA, Kumari S, John JK, Sethi M, Sharma GK, Pattnaik B, Singh RK, Saikumar G. 2018. Porcine sapelovirus among diarrhoeic piglets in India. Transbound Emerg Dis 65:261–263. https://doi.org/10.1111/tbed.12628.
2. Lan D, Ji W, Yang S, Cui L, Yang Z, Yuan C, Hua X. 2011. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain. Arch Virol 156:1567. https://doi.org/10.1007/s00705-011-1035-7.
3. Kim D-S, Son K-Y, Koo K-M, Kim J-Y, Alfajaro MM, Park J-G, Hosmillo M, Soliman M, Baek Y-B, Cho E-H, Lee J-H, Kang M-I, Goodfellow I, Cho K-O. 2016. Porcine sapelovirus uses α2,3-linked sialic acid on GD1a ganglioside as a receptor. J Virol 90:4067–4077. https://doi.org/10.1128/JVI.02449-15.
4. Bak G-Y, Kang M-I, Son K-Y, Park J-G, Kim D-S, Seo J-Y, Kim J-Y, Alfajaro MM, Soliman M, Baek Y-B, Cho E-H, Kwon J, Choi J-S, Park S-I, Cho K-O. 2017. Occurrence and molecular characterization of *Sapelovirus A* in diarrhea and non-diarrhea feces of different age group pigs in one Korean pig farm. J Vet Med Sci 78:1911–1914. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0237.
5. Kim D-S, Kang M-I, Son K-Y, Bak G-Y, Park J-G, Hosmillo M, Seo J-Y, Kim J-Y, Alfajaro MM, Soliman M, Baek Y-B, Cho E-H, Lee J-H, Kwon J, Choi J-S, Goodfellow I, Cho K-O. 2016. Pathogenesis of Korean *Sapelovirus A* in piglets and chicks. J Gen Virol 97:2566–2574. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000571.
6. Arruda PHE, Arruda BL, Schwartz KJ, Vannucci F, Resende T, Rovira A, Sundberg P, Nietfeld J, Hause BM. 2017. Detection of a novel sapelovirus in central nervous tissue of pigs with polioencephalomyelitis in the USA. Transbound Emerg Dis 64:311–315. https://doi.org/10.1111/tbed.12621.
7. Chen Q, Zheng Y, Guo B, Zhang J, Yoon K-J, Harmon KM, Main RG, Li G. 2016. Complete genome sequence of porcine sapelovirus strain USA/IA33375/2015 identified in the United States. Genome Announc 4:e01055-16. https://doi.org/10.1128/genomeA.01055-16.
8. Donin DG, de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alberton GC, Alfieri AA. 2014. First report of *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) in pig herds of Brazil. Trop Anim Health Prod 46:523–528. https://doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z.
9. Schock A, Gurrala R, Fuller H, Foyle L, Dauber M, Martelli F, Scholes S, Roberts L, Steinbach F, Dastjerdi A. 2014. Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom. Vet Microbiol 172:381–389. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.001.
10. Buitrago D, Cano-Gómez C, Agüero M, Fernandez-Pacheco P, Gómez-Tejedor C, Jiménez-Clavero MÁ. 2010. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. J Vet Diagn Invest 22:763–766. https://doi.org/10.1177/104063871002200519.
11. Stang A, Korn K, Wildner O, Überla K. 2005. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. J Clin Microbiol 43:716–720. https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.716-720.2005.
12. Piorkowski G, Jacquot F, Quérat G, Carbonnelle C, Pannetier D, Mentré F, Raoul H, de Lamballerie X. 2017. Implementation of a non-human primate model of Ebola disease: infection of Mauritian cynomolgus macaques and analysis of virus populations. Antiviral Res 140:95–105. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.01.017.
13. Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R. 2002. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. J Virol 76:5813–5821. https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5813-5821.2002.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Downloaded from http://mra.asm.org/ on September 26, 2018 by guest

Autres virus retrouvés dans les fèces de porcs

Au contraire des précédents travaux présentés, les résultats ci-dessous sont des résultats préliminaires et ne sont pas encore publiés. La forme et l'organisation de cette partie est donc différente des précédentes et présente des travaux annexent à la problématique de thèse.

Présentation synthétiques des différents virus d'intérêts de ce chapitre

De nombreux virus sont retrouvés au niveau des fèces de porcs, et peuvent avoir un impact en santé humaine et animale. Dans cette partie les différents virus étudiés (Sapelovirus, Kobuvirus, et Astrovirus) sont présentés.

Les Kobuvirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. Initialement, les membres du genre Kobuvirus ont été nommés en fonction de leur espèce hôte : Aichi virus pour l'Homme, Bovine Kobuvirus pour les bovins et Porcine Kobuvirus pour les porcs (Reuter *et al.*, 2011a). Cependant, la nouvelle taxonomie (ICTV) a renommé ces différents virus en 16 types répartis dans six espèces (Aichivirus A à F) (ICTV, 2019). Le génome du Kobuvirus est une molécule d'ARN simple brin d'environ 8,2 à 8,3 kb de long et contient un grand ORF qui code pour une polyprotéine (Reuter *et al.*, 2009a ; Yu *et al.*, 2011b). Ces différents types de Kobuvirus ont été retrouvés à travers le monde au sein de nombreuses espèces animales (porcins, bovins, ovins, caprins, chauve-souris, murins, félins, canins, etc.) et chez l'Homme. Ce virus est suspecté d'être un agent pathogène causant des troubles digestifs notamment les diarrhées chez l'Homme et l'animal par voie féco-orale (Khamrin *et al.*, 2014).

Le Sapelovirus porcin (PSV) (Famille *Picornaviridae,* genre *Sapelovirus*) est un petit virus à ARN simple brin à polarité positive de 7,5-8,3 kb, non enveloppé (Krumbholz *et al.*, 2002). Ce genre est très proche du genre *Enterovirus* et est constitué de trois espèces : *Avian Sapelovirus*, *Sapelovirus A* (porcine Sapelovirus) et *Sapelovirus B* (simian Sapelovirus), pour un seul sérotype (ICTV, Kobuvirus, 2019). Le PSV est transmis par la voie féco-orale et l'infection peut être asymptomatique ou associé avec des diarrhées, une détresse respiratoire, une encéphalite, des lésions de la peau ainsi que des troubles de l'appareil reproducteur (Lan *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2016 ; Ray *et al.*, 2018). Le PSV a été retrouvé en Chine, en Inde, en Corée, aux Etats-Unis, au Brésil, et en Europe (Allemagne, au Royaume Unis et Espagne) (Buitrago *et al.*, 2010 ; Lan *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012 ; Donin *et al.*, 2014 ; Schock *et al.*, 2014 ; Son *et al.*, 2014 ; Arruda *et al.*, 2017 ; Ray *et al.*, 2018).

Les Astrovirus appartiennent à la famille des *Astroviridae* qui inclus deux genres : les Mamastrovirus (mammifères) et les Avastrovirus (aviaire) (ICTV, Astroviridae, 2019). Ce sont des virus à ARN simple brin à polarité positive, non enveloppés avec une capside icosaédrique (Monroe *et al.*, 1993). Leur génome fait environ 6,4 à 7,7 kb et possède 3 ORFs (ORF1a ORF1b et ORF2) (Bosch *et al.*, 2014). Les Astrovirus sont capables d'infecter un spectre très large d'espèces animales (porcins, cervidés, mammifères marins, rongeurs, oiseaux, animaux de compagnie, etc.) mais également l'Homme (Johnson *et al.*, 2017). Les infections aux Astrovirus sont généralement associées à des signes gastro-intestinaux plus ou moins sévères chez les mammifères (Mendez and Arias, 2007), mais ont également été détectés chez des individus sains (Reuter *et al.*, 2011b). Chez l'Homme, ces virus ont causés des troubles intestinaux notamment chez les enfants et les personnes immunodéprimés (Holtz *et al.*, 2011 ; Wylie *et al.*, 2012).

Une étude de 2016, dans cinq pays européens a évalué la présence de différents virus entériques sur 419 porcs provenant de 49 élevages (Zhou *et al.*, 2016). Les prévalences observées les plus importantes concernaient les porcine Kobuvirus (PKoV) à 56,7%, les Astrovirus 4 (Porcine Astrovirus ; PAstV) à 70,4%, et à 42,2% pour les porcine Circovirus (PCV). Une autre étude récente a effectué une analyse métagénomique de 217 échantillons de fèces de porcs (Chen *et al.*, 2018). Les Mammastrovirus présentaient une prévalence de 52%, les Sapelovirus porcin 31% de positivité (PSV), et les PKoV 23%.

Méthodologie

Suite à la détection du Sapelovirus porcin (PSV) durant les travaux de cultures cellulaires, nous avons décidé de tester l'ensemble des échantillons de notre étude sur les porcs pour la détection du Sapelovirus par qRT-PCR. Nous avons utilisé le kit qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR (Quantabio, Bervely, USA). Les étapes de préparations des échantillons, d'extraction de l'ARN et de stockage sont les mêmes que celles présentées dans l'article « Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France (Capai *et al.*, 2019a) ». La seule différence méthodologique concerne les qRT-PCR réalisées.

Face aux fortes prévalences de certains virus chez le porc, nous avons également voulu tester, en plus des PSV, les virus suivants : le Kobuvirus (PKoV), les Circovirus (PCV), l'Astrovirus 1 et 4 (PAstV-1 et PAstV-4). Les systèmes utilisés ont fonctionné uniquement pour le Kob et le PAstV-1. Les amorces et sondes utilisées sont présentées dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 Détail des amorces utilisées pour Kobuvirus et Astrovirus 1

Virus	Nom des amorces et sondes	Séquences	Référence
PKoV	T-248-F-PKoV	TCTCTGACCTCTGAAGTGCACT	(Zhou *et al.*, 2016)
	T-249-R-PKoV	TGAAGAAGCCATGTGTCTTGTC	
	T-250-PKoV-FAM	GGTTGCGTGGCTGGGAATCCAC	
PAstV-1	T217-F- PAstV-1	CCAAAACCAGCAATCCGTCAA	
	T218-R- PAstV-1	GCCCCTAAAGCAACGATCGG	
	T-219- PAstV-1-VIC	TTCTTGTCAAGGATAATACGGGG	

Résultats

Nos résultats préliminaires montrent une prévalence de 62% (n=563/908) pour les PSV, de 44,9% (n=408/908) pour PKoV, et une prévalence plus faible a été déterminée pour les PAstV-1 avec 8,6% (n=78/908).

Comme pour l'étude HEV sur les porcs, les échantillons pour lesquels nous n'avons pas d'âge associé ont été exclus de l'analyse multivariée.

En prenant en compte les quatre virus détectés HEV, PSV, PAstV-1 et PKoV, parmi les 908 échantillons testés, 697 échantillons étaient positifs à au moins un virus (76,8%). Trois cent quarante-quatre échantillons étaient concernés par au moins une co-infection (37,9%). En ce qui concerne les coïnfections, 259 échantillons étaient à deux virus (28,5%), 78 échantillons positifs pour trois virus (8,6%) et sept échantillons positifs pour les quatre virus (0,8%). (Tableau 14).

Tableau 14 Récapitulatif du nombre d'échantillons en fonction des co-infections détectées

Aucune infection	211
Infection à 1 seul virus	353
Infection à 2 virus	259
Infection à 3 virus	78
Infection aux 4 virus	7

PKoV	PSV	PAstV-1	VHE
102	229	9	13

PKoV PAstV-1	PKoV VHE	PKoV PSV	PAstV-1 VHE	PAstV-1 PSV	VHE PSV
4	3	216	1	14	21

PKoV PAstV-1 PSV	PKoV PAstV-1 VHE	PKoV PSV VHE	VHE PAstV-1 PSV
39	2	35	2

Les prévalences par classe d'âge ont montré une forte diminution du taux de positifs après trois mois pour les PAstV-1 (30,6% vs 6,0%) et une diminution assez progressive entre les 1-3 mois (69,4%) et les adultes (28.9%). Pour les PSV, les séroprévalences observées par classe d'âge étaient assez homogènes (entre 61,0% et 77,5%).

Une analyse de régression logistique multivariée a été réalisée et les résultats préliminaires ont montré certaines associations entre les virus. Par exemple, une forte association entre PKoV et PSV a été estimée. Pour les porcs négatifs PSV il y avait 56,4% de positifs PKoV et lorsqu'ils étaient positifs en PSV le taux de positivité Kob augmentait à 81,2%. L'ensemble des résultats et des analyses obtenus pour les trois virus est présenté dans la figure 19 ci-dessous. Cette figure présente les prévalences totales et par type d'élevage. Un graphique des prévalences (%) par classe d'âge et les résultats significatifs de l'analyse multivariée (p-value < 0,05 et Odds Ratio correspondant).

Perspectives

Pour la suite de notre étude nous allons contrôler les résultats obtenus en testant les échantillons avec d'autres méthodes (PCR classique + gel et séquençage pour les PSV par exemple) et tester d'autres virus fréquemment retrouvés chez le porc dans la littérature : Teschovirus, Sapovirus, Mammastrovirus et les Posavirus par exemple.

Prévalences totales et par type d'élevage

Taux de positifs par âge

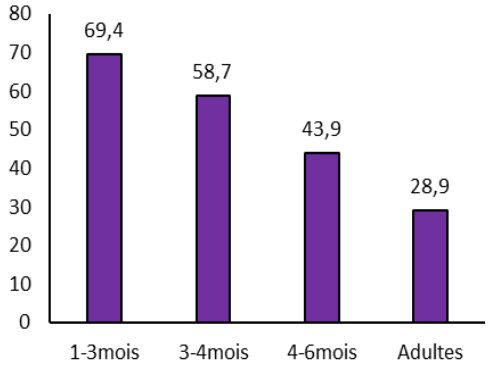
Analyses multivariées

Kobuvirus (PKoV)

44,9% prévalence totale (408/908)

47,4% prévalence sur porcs avec âge (287/606)

	Nb Positif	Nb éch	% positifs
Extensif	100	244	41,0
Fermé	92	202	45,5
Semi extensif	216	462	46,7
Total	408	908	44,9



	OR	5 %	95 %	p	
(Intercept)	0.22251	0.16164	0.3021	2.518e-15	***
res_sap	3.37921	2.45041	4.7000	7.451e-10	***
res_astro1	2.15502	1.29116	3.6828	0.0156	*
code_m4	3.08975	2.29654	4.1763	5.306e-10	***

56,4% de positifs PKoV quand PSV négatif

81,2% de positifs PKoV quand PSV positif

44,5% de positifs PKoV quand PAstV-1 négatif

71,9% de positifs PKoV quand PAstV-1 positif

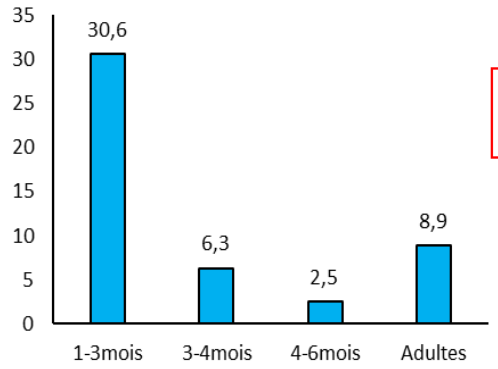
35,8% de positifs chez les plus de 4mois VS 63,4% positifs pour les moins de 4 mois

Astrovirus1 (PAstV-1)

8,6% prévalence totale (78/908)

10,6% prévalence sur porcs avec âge (64/606)

	Nb Positif	Nb éch	% positifs
Extensif	17	244	7,0
Fermé	34	202	16,8
Semi extensif	27	462	5,8
Total	78	908	8,6



	OR	5 %	95 %	p	
(Intercept)	0.023308	0.011944	0.0421	< 2.2e-16	***
res_sap	1.832688	0.995050	3.5742	0.11660	
res_kob	2.019259	1.194846	3.4818	0.03002	*
code_13	4.861320	2.981532	7.9394	1.019e-07	***
code_ferme	1.885408	1.169845	3.0356	0.02827	*

5,6% positifs PAstV-1 quand PKoV négatif

16,0% positifs PAstV-1 quand PKoV positif

7,4% VS 16,8% positifs PAstV-1 quand fermé

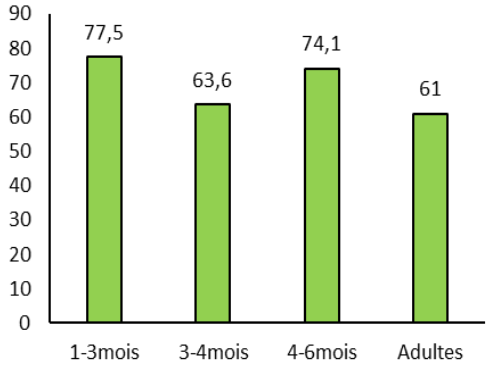
6,0% de positifs chez les plus de 3 mois VS 30,6% positifs pour les moins de 3 mois

Sapelovirus (PSV)

62,0% prévalence (totale 563/908)

68,2% prévalence sur porcs avec âge (413/606)

	Nb Positif	Nb éch	% positifs
Extensif	157	244	63,3
Fermé	144	202	71,3
Semi extensif	262	462	56,7
Total	563	908	62,0



	OR	5 %	95 %	p	
(Intercept)	1.30093	0.83537	2.0510	0.33382	
res_vhe	2.12517	1.21558	3.9043	0.03264	*
res_kob	3.23042	2.32852	4.5194	5.784e-09	***

66,5% de positifs PSV quand VHE négatif

81,8% de positifs PSV quand VHE positif

56,4% de positifs PSV quand PKoV négatif

81,2% de positifs PSV quand PKoV positif

Odd ratio avec p-value significatives < 0,05

Figure 19 Récapitulatif des résultats préliminaires obtenus pour les Kobuvirus, les Astrovirus 1 et les Sapelovirus

Discussion générale, conclusion et perspectives

Du fait de l'augmentation des cas d'hépatite E dans les pays industrialisés, de la situation hyperendémique de la Corse et de la pauvreté des données virologiques et épidémiologiques en Corse, les objectifs de ma thèse étaient : (i) d'établir une séroprévalence régionale des IgG anti-HEV de la population adulte Corse avec un échantillon de plus grande taille que dans les études précédentes, (ii) d'approfondir les connaissances sur les titres d'anticorps IgG anti-HEV au sein de cette population, (iii) de déterminer quels sont les facteurs associés à la détection d'anticorps IgG anti-HEV chez les adultes corses et tenter d'évaluer l'existence de modes d'acquisition alternatifs de l'infection, (iv) de détecter la présence du HEV au sein de la filière porcine traditionnelle en Corse, (v) d'étudier la filière porcine traditionnelle afin de voir quels facteurs influençaient l'infection des porcs et (vi) d'identifier génétiquement les souches circulant en Corse.

Des séroprévalences très élevées en Corse chez les donneurs de sang, confirmation d'une région hyper endémique

Afin de poursuivre les travaux de Mansuy *et al.* (2016) chez les donneurs de sang ayant montré que les taux de séroprévalence IgG anti-HEV étaient très hétérogènes selon les régions, nous avons mis en place l'étude SERO-QUANTI avec un grand nombre d'échantillon (N=2705). Un échantillonnage solide dans notre étude apparaissait comme indispensable car l'étude n'avait inclus que 92 échantillons sanguins pour la région Corse.

Afin de pouvoir comparer nos données à cette précédente étude et face à la grande hétérogénéité existant entre les différents kits commerciaux, nous avons choisi le même kit Wantai ELISA IgG que Mansuy *et al.* (2016). Le kit Wantai IgG anti-HEV est un des kits les plus utilisés dans les pays industrialisés et a une spécificité et une sensibilité de 97,96% et 99,6% respectivement (Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co. *;* Yan *et al.*, 2008).

Grâce à l'étude SERO-QUANTI nous avons pu déterminer une séroprévalence IgG anti-HEV de 56,1% [54,2-58,0] chez les donneurs de sang, et ainsi confirmer que la Corse est bien une région hyper endémique. La population des donneurs de sang de notre seconde étude SEROMED, présentait aussi une séroprévalence du même ordre, 54,4% [49,8-58,9] (N=254/467). La comparaison de la séroprévalence du HEV mesurée ici (56,1% et 54,4%) et des sérums EFS archivés collectés en 2000 dans les deux départements de Corse (53,3% ; n = 90 ; données non publiées) suggèrent que l'exposition au HEV est stable dans la population corse depuis au moins deux décennies (Tableau 15).

Tableau 15 Récapitulatif des différentes études de séroprévalences menées en Corse

	Nombre d'inclusions	Année de collecte	Séroprévalence
EFS non publiées	90	2000	53,3%
Mansuy *et al.* (2016)	92	2011-2012	62%
SERO-QUANTI	2705	2017	56,1%
SEROMED	467	2019	54,4%

D'autres régions de France (Midi-Pyrénées, (Mansuy *et al.*, 2011)) ou d'Europe (Italie, région Abruzzo (Lucarelli *et al.*, 2016)) présentent des séroprévalences très élevées confirmant les énormes différences existant au sein d'un même pays et l'existence de zones d'hyper endémie dans les pays industrialisés.

Notre étude SERO-QUANTI a montré pour la première fois que la séroprévalence était homogène sur l'île avec des valeurs variant entre 53,20% et 58,36% selon l'arrondissement (aucune de ces valeurs n'étaient significativement différentes les unes des autres). De plus, parmi les 2705 donneurs inclus dans notre étude, 1068 sont nés en Corse et les séroprévalences observées chez les natifs étaient significativement supérieures à celles observées chez les non natifs (60,58% *vs* 53,20%).

Grâce à la modélisation réalisée avec l'Institut Pasteur, nous avons pu déterminer un taux annuel d'infection chez les adultes natifs de Corse, de 1,4% chez les hommes et 1,3% chez les femmes. En utilisant le même test que celui utilisé dans notre étude, une étude récente portant sur des donneurs de sang d'Italie centrale a rapporté un taux de séroconversion au HEV de 2,1% par an, c'est-à-dire du même ordre que dans notre étude (Marcantonio *et al.*, 2019). Pour rappel, l'Italie centrale se caractérise aussi par des taux élevés de 49% en moyenne (Lucarelli *et al.*, 2016).

Globalement, les informations épidémiologiques semblent converger vers une exposition homogène et omniprésente de l'infection par le HEV chez les adultes vivant en Corse.

La quantification des anticorps IgG anti-HEV, donnée rare dans la littérature

A notre connaissance, la quantification du taux d'IgG anti-HEV est une analyse qui n'a jamais été réalisée dans les études de séroprévalence dans la littérature. De plus, le titre seuil immuno-protecteur des anticorps IgG n'est pas clairement défini.

Les 1518 échantillons IgG anti-HEV positifs de l'étude SERO-QUANTI ont été quantifiés, les valeurs obtenues allaient de 0,25 UI/mL à 153 UI/mL. Le titre moyen était de 2,91 UI/mL et le titre médian de 0,46 UI/mL. Plus de 70% des échantillons quantifiés avaient un titre inférieur à 3 UI/mL et 85.9% étaient inférieurs à 10 UI/mL. Les femmes présentaient un titre moyen d'anticorps supérieur à ceux des hommes (6,35 vs 4,17 UI/mL) et les titres supérieurs à 10 UI/mL étaient également plus présents chez les femmes. Nous avons pu également voir que les titres d'anticorps inférieurs à 3UI/mL étaient significativement plus retrouvés chez les personnes âgées de plus de 38 ans (environ 73%) que chez les plus jeunes (64,2%). Concernant le pourcentage des titres d'anticorps supérieur à 10 UI/mL la principale différence observée était entre les deux classes d'âge (18-27 ans et 28-37 ans) (18,6%) et le groupe le plus âgé (8,1%) (plus de 70 ans).

Pour une hépatite à prévention vaccinale comme l'hépatite B, le seuil protecteur fixé est à 10 UI/mL (Jack *et al.*, 1999). Au vu des titres majoritairement faibles déterminés, on pourrait donc penser que le seuil protecteur pour le HEV est plus bas, mais cela n'est qu'une hypothèse. En effet, si cela n'était pas le cas plus de 85% des donneurs avec une sérologie positive n'auraient pas une immunité protectrice vis-à-vis du virus, ce qui semblerait assez surprenant. Des études antérieures ont montré que les taux d'anticorps diminuaient avec le temps et que chez certains sujets, les IgG anti-HEV pouvaient disparaître après une période allant de 1 à 22 ans (Servant-Delmas *et al.*, 2016). La majorité des études analysant la quantité d'IgG sont les études concernant le vaccin HEV (Zhang *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2015). Ces études ont rapporté des titres d'anticorps après une infection naturelle aux alentours de 0,6 WU/mL (unité standard OMS). Une autre étude a également montré que les personnes ayant un titre supérieur à 1 Wu/mL étaient mieux protégées que celles qui avaient des titres marginaux (Zhang *et al.*, 2014). Cette étude reporte également une différence de niveau d'anticorps entre les formes asymptomatiques (2,06 ± 6,30 Wu/mL) et les formes cliniques (80.91 ± 2.97 Wu/mL). De plus, les personnes déjà immunisées avant vaccination avaient des taux d'anticorps plus élevés après vaccination que les personnes vaccinées n'ayant pas eu d'immunité acquise avant la vaccination.

Cette absence de données durant les études de séroprévalence peut demeurer problématique notamment pour la compréhension des cas cliniques chez des hommes âgés de plus de 55ans (Dalton *et al.*, 2008b). Proviennent-ils de réinfections ? Comment le titre d'anticorps varie dans le temps ? Comment le titre évolue après une réinfection ? Autant de questions importantes pour la compréhension de l'épidémiologie de l'hépatite E notamment dans les régions hyper endémiques. Il serait donc intéressant de doser les anticorps de façon plus fréquente afin de mieux appréhender le statut immunitaire de la population, et non pas de juste savoir s'ils sont positifs ou non à la détection des IgG.

La situation épidémiologique du HEV chez les enfants peu référencée

Très peu d'études épidémiologiques ont été réalisées chez les enfants dans les pays industrialisés à travers le monde. Les séroprévalences suivantes ont été déterminées : < 5% aux Etats Unis, 4,2% en Turquie, 4,6% en Espagne, 1,4% en Russie et 1,1% au Portugal (Buti *et al.*, 2008 ; Kuniholm *et al.*, 2009 ; Potemkin *et al.*, 2015 ; Bayhan *et al.*, 2016 ; Oliveira *et al.*, 2017). Cette catégorie d'âge représente un gros manque pour la compréhension de l'épidémiologie de l'hépatite E. Un des objectifs initiaux de notre étude en médecine générale afin de combler ce manque, étaient d'inclure des enfants. Cependant face à de grosses difficultés logistiques, nous n'avons pu inclure que très peu de patients de façon générale dans cette population et donc également très peu d'enfants (N=4).

Des séroprévalences déjà très élevées ont été estimées sur nos classes d'âges les plus jeunes au cours de nos deux études (18-27 ans) : 45,95% et 42,78%. De plus, le taux de positivité chez les personnes ayant entre 18 et 19 ans était de 40% Cette séroprévalence déjà très forte chez les jeunes adultes prouve que les enfants sont surement fortement exposés en Corse. En ne tenant compte que des natifs de Corse, la séroprévalence des 18-27 ans montait jusqu'à 50,1%.

Nous avons pu estimer l'évolution de la séroprévalence chez les enfants grâce à la modélisation (réalisée par l'Institut Pasteur dans notre article soumis à Eurosurveillance). Avec le modèle âge-dépendant, un taux d'infection probable annuel de 3,9 et 3,7% a été déterminé chez les moins de 18 ans. Ces chiffres correspondent à la probabilité annuelle d'infection chez un enfant masculin natif ou féminin natif respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celles des adultes, car plus les années passent, plus les personnes ont déjà été infectées et sont donc immunisées. Cette augmentation de la séroprévalence avec l'âge devrait sous-estimer la probabilité annuelle d'infection chez les individus sensibles (c'est-à-dire la force de l'infection) car elle ne tient pas compte du fait que seule une proportion d'un groupe d'âge est susceptible

d’être infectée. Par exemple, si la force d'infection est de 2% mais que seulement 50% du groupe d'âge est susceptible d’être infecté, l'augmentation de la séroprévalence sera donc de 1%, mais sous-estimera considérablement la force de l'infection 2%. Ces chiffres issus du modèle confirment les hypothèses de la forte exposition des enfants au HEV dès le plus jeune âge, mais la mise en place d’une étude épidémiologique chez les enfants apparait comme primordiale afin de mieux comprendre la forte exposition des corses au HEV.

L’âge, témoin d’un effet cumulatif de l’exposition de la population

L’un des facteurs majeurs influançant la positivité aux IgG anti-HEV est l’âge. Dans nos deux études de séroprévalences ce facteur est ressorti comme signficativement associé à la séropsitivité. Les valeurs passaient de 45,95% et 42,80% chez les 18-27 ans à plus de 60% chez les 58-70 ans, et 72,2% chez les plus de 70 ans. Cet impact de l‘âge croissant reflète un effet cumulatif de l’exposition de la population en adéquation avec de nombreuses études européennes (Christensen *et al.*, 2008 ; Slot *et al.*, 2013 ; Lapa *et al.*, 2015 ; Mansuy *et al.*, 2016 ; Olsoy *et al.*, 2019). Les séroprévalences plus faibles chez les jeunes pourraient être expliquées par différents points : des habitudes alimentaires différentes, c’est-à-dire une consommation faible ou minime de produits à risque (viande crue, à base de foie, etc.), un temps d’exposition plus court et d’autres facteurs de risque tels que la chasse et la manipulation des animaux. L'augmentation cumulative de la séropositivité IgG anti-HEV pourrait être due à une infection / une réinfection tout au long de la vie, même chez les personnes âgées présentant une réponse immunitaire plus sénescente.

Le sexe comme facteur de risque ? Un effet controversé

Les hommes ont souvent présenté des séroprévalences plus élevées que les femmes dans les études de séroprévalence IgG anti-HEV. Cependant, après une prise en compte de l’âge ou une analyse multivariée les séroprévalences élevées chez les hommes n’étaient plus liées significativement au sexe lui-même, mais à d‘autres variables (Mansuy *et al.*, 2011 ; Slot *et al.*, 2013 ; Petrovic *et al.*, 2014 ; Pittaras *et al.*, 2014 ; Mansuy *et al.*, 2016). C’est également le cas pour nos deux études de séroprévalences. Bien que nous ayons observé des séroprévalences supérieures chez les hommes 60,0% / 59.8% versus 52,19% / 46,9% chez les femmes, la variable sexe n’était plus significativement associée à la positivité IgG après l’analyse multivariée sur la population globale. Cela pourrait peut-être être expliqué par le fait que ce n’est pas le sexe qui est directement responsable des séroprévalences plus élevées, mais plutôt les activités que les hommes pratiquent de façon majoritaire en comparaison avec les femmes

(consommation d'aliments à risque, chasse, élevage etc.). Une étude épidémiologique désignée de façon spécifique sur les questions autour des activités à risque et du genre pourrait répondre aux interrogations liées au sexe.

Les activités liées au réservoir animal de nouveau fortement associées

En France, différentes études de séroprévalences ont été menées chez les donneurs de sang et différents facteurs de risques ont été déterminés (Izopet *et al.*, 2015 ; Mansuy *et al.*, 2015a ; Mansuy *et al.*, 2016). La présence d'anticorps IgG anti-HEV était associée avec la chasse, la consommation de produits à base de foie de porc, de viande de gibiers et d'huîtres.

Afin de déterminer les facteurs de risque associés à la détection d'IgG anti-HEV en Corse, nous avons mis en place la seconde étude SEROMED où chaque sérologie était associée à un questionnaire spécifique. Il s'agit de la première étude du genre, en Corse.

Le *ficatellu* est le facteur de risque majeur mis en avant dans l'ensemble des études de séroprévalences françaises. De plus, ce produit a souvent été étudié, et il a clairement été identifié comme aliment à risque pour une transmission alimentaire (Colson *et al.*, 2010) et associé à des cas groupés (Renou *et al.*, 2014 ; Pavio *et al.*, 2016) . Un tiers des *ficatelli* testés dans une étude analysant des produits alimentaires, était positifs à la détection d'ARN viral HEV (Pavio *et al.*, 2014). Notre étude a confirmé l'association de la consommation du *ficatellu* avec la détection des anticorps. En effet, nous avons calculé des AOR de 2,22 et 1,77 selon le modèle utilisé, avec des p-value significatives en analyse multivariées ($p = 0,00023$ et 0,035. De plus, des séroprévalences augmentant jusqu'à + 33% entre les personnes consommant ou ne consommant pas de *ficatellu* ont été observées.

Parmi les autres variables étudiées dans notre étude, la cuisson des aliments n'a montré aucune association significative avec la détection d'IgG anti-HEV. Pourtant, l'impact de la température sur l'inactivation du virus a été rapporté dans la littérature. Une cuisson de 71°C pendant 20 minutes inactive le virus (Emerson *et al.*, 2005b ; Barnaud *et al.*, 2012a). De plus, le virus peut rester stable après une cuisson à 56°C pendant une heure et reste infectieux au-dessus de 60°c (Emerson *et al.*, 2005b ; Yugo et Meng, 2013). Bien que le *ficatellu* soit consommé habituellement grillé aucune des cuissons déclarées par les participants n'impactait la positivité. Cela pourrait suggérer que les temps de cuisson et températures conseillées ne sont pas respectées. Cela ne semble pas surprenant, car traditionnellement le *ficatellu* est rarement très bien cuit pour une question de goût et saveur. De plus, même en cas d'inactivation par la cuisson, le virus peut également infecter l'homme par la manipulation du produit, la préparation

des plats avant cuisson (Wichmann *et al.*, 2008). En tenant compte de ce dernier point, le bon lavage des mains ou le port de gants doit être fortement recommandé en plus des temps de cuisson lors de contact avec ce produit à risque.

Notre étude a été la première à étudier l'effet de la consommation d'une autre saucisse à base de foie de porc consommée fréquemment sur l'île, le *fittonu*. Au contraire du *ficatellu*, le *fittonu* est consommé cru et sec. Au Pays-Bas, des saucisses séchées consommées crues traditionnellement dans le pays ont également été associées avec des séroprévalences plus élevées (Mooij *et al.*, 2018). La consommation du *fittonu* dans notre étude apparait comme le facteur de risque majeur. En effet, cet aliment a été significativement associé avec la détection des IgG au sein des trois populations étudiées et également sur la population totale avec des AOR toujours supérieurs à 1,95 et des p-value très basses (de 0,00183 à 0,00001). Les séroprévalences augmentaient en moyenne de plus de 20% selon consommation ou non du produit.

L'autre activité à risque fortement associée aux séropositifs dans notre étude a été la pratique du dépeçage et de l'éviscération. En Corse, de façon traditionnelle, les membres de la famille des chasseurs ou des éleveurs pratiquent fréquemment des activités les exposant au HEV. C'est le cas de l'éviscération et du dépeçage. Une augmentation de plus de 25% des séroprévalences a été déterminée chez les personnes pratiquant cette activité. Comme pour le *fittonu*, cette activité a été significativement associée après analyse multivariée pour l'ensemble des populations étudiées (AOR de plus de 2,40 et p-value allant de 0,034 à 0,00077). L'infection au HEV peut exister durant l'éviscération d'animaux infectés, ou à travers le contact du sang ou des fèces. Les bouchers et le personnel d'abattoirs ont d'ailleurs été répertoriés comme des activités professionnelles à risque, confirmant ainsi que la manipulation de carcasses ou l'abattage étaient des facteurs de risques pour l'infection au HEV (Teixeira *et al.*, 2017). Au niveau local, cette tendance est appuyée par le fait que l'ARN viral a été retrouvé dans la bile, le sang, le foie, et les fèces de porcs ou sangliers en Corse (Jori *et al.*, 2016 ; Pavio *et al.*, 2016 ; Capai *et al.*, 2019a). Enfin, tous ces éléments renforcent le fait que le port d'accessoires de protections comme une combinaison, des gants, ou un masque doivent être utilisés comme moyen de prévention chez les personnes exposées (Schielke *et al.*, 2015).

La consommation de différentes viandes (gibiers, abats, foie, porc) n'était pas associée significativement en analyse multivariée avec la séropositivité IgG anti-HEV mais des séroprévalences plus élevées ont été observées >55%. Ces produits carnés ont fréquemment été

associés avec des séroprévalences plus élevées ou la détection d'ARN viral (Bouwknegt *et al.*, 2007 ; Szabo *et al.*, 2015 ; Cossaboom *et al.*, 2016 ; Giannini *et al.*, 2018).

Les variables liées au réservoir animal (alimentation ou contact) apparaissent donc de nouveau comme les facteurs de risques majeurs associés à la détection IgG anti-HEV, confirmant ainsi le fort caractère zoonotique de la transmission du HEV.

Séroprévalences, facteurs de risques, une certaine homogénéité entre les populations étudiées

Durant notre seconde étude de séroprévalence SEROMED, nous nous sommes intéressés à d'autres populations adultes en plus de celle des donneurs de sang. En effet, la grande majorité des études de séroprévalence sont réalisées chez les donneurs de sang, et nous avons voulu voir si d'autres types de populations adultes étaient également fortement exposées au HEV. Nous avons choisi la population de médecine générale qui est également régulièrement étudiée dans les études épidémiologiques et la population de l'Université de Corse (étudiants et personnel universitaire). Les séroprévalences IgG anti-HEV suivantes ont été déterminées : 47,6% au sein de la population universitaire, 54,4% chez les donneurs de sang et 64,3% sur les patients de médecine générale. Sur la population totale la séroprévalence était de 52,3%. En comparant les donneurs de sang de cette étude à ceux de la première, on peut de nouveau observer une séroprévalence élevée et en adéquation avec les deux précédentes. Après stratification par âge, facteur qui est très déterminant sur les valeurs de séroprévalences, les trois séroprévalences déterminées n'étaient pas significativement différentes les unes des autres.

Bien que les différentes populations soient différentes en termes d'âge, de sexe et de données sociodémographiques, elles semblent être assez homogènes en ce qui concerne le HEV. En effet, pour un groupe d'âge donné, aucune différence significative de séroprévalence n'a été observée entre les populations. De plus, deux principaux facteurs de risque déterminés dans notre étude ont été identifiés dans chaque population et au niveau de la population globale (dépeçage / éviscération et consommation de *fittonu*), appuyant également cette homogénéité de l'exposition.

Une dimension environnementale à prendre en compte

Le virus de l'hépatite E est de plus en plus retrouvé au niveau environnemental (Alfonsi *et al.*, 2018). Dans notre étude, des séroprévalences IgG anti-HEV plus élevées ont été observées pour la consommation des eaux de fontaines de villages, des eaux de sources en montagne, des baies

sauvages et des fruits de mer. Toutes ces variables peuvent être témoins d'une contamination environnementale et donc par la suite une voie de transmission possible à l'homme. En Corse, une étude récente de l'Agence Régionale de la Santé a analysé la qualité de l'eau de consommation sur l'ensemble de l'île (Agence Régionale de la Santé, 2017). Les résultats de cette étude ont montré que de nombreuses petites communes présentaient une qualité de l'eau très moyenne. Des informations antérieures provenant de l'étude nationale française (Mansuy *et al.*, 2016) indiquaient que la consommation d'eau de bouteilles était un facteur de protection contre l'infection et, dans la région rurale auvergnate (centre de la France métropolitaine), l'eau du réseau public a été la source commune à l'origine de cas d'hépatite E groupés. Cela concernait sept cas humains, et l'ARN du HEV a été détecté dans un puits privé ayant contaminé accidentellement le réseau d'eau public (Spaccaferri, 2015).

Pour un virus résistant dans l'eau comme le HEV (grandes épidémies par l'eau dans les pays en développement), cette voie de transmission ne doit pas être négligée notamment dans les petits villages corses où le traitement de l'eau semble ne pas être optimal selon les rapports de l'Agence Régionale de la Santé).

De nombreuses études ont détecté le virus dans l'eau et de façon indirecte dans les fruits de mer. Le HEV a été identifié dans les eaux de rivières en Italie (Iaconelli *et al.*, 2015a). L'eau d'irrigation a également été ciblée comme source potentielle. En effet, le virus a été retrouvé sur des fruits et légumes (Brassard *et al.*, 2012 ; Kokkinos *et al.*, 2012 ; Maunula *et al.*, 2013 ; Kokkinos *et al.*, 2017a) ou lié à des séroprévalences plus grandes en Turquie (Ceylan *et al.*, 2003). Au Royaume-Uni, en Espagne et au Japon l'ARN viral a été trouvé dans les fruits de mer (Li *et al.*, 2007 ; Crossan *et al.*, 2012 ; O'Hara *et al.*, 2018 ; Rivadulla *et al.*, 2019) et en France, la consommation de cet aliment montrait une association avec la séroprévalence (Mansuy *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, les souches retrouvées étaient génétiquement très proches de celles retrouvées chez l'Homme et le porc (génotype 3), montrant un cycle épidémiologique possible entre les réservoirs animaux, l'Homme et l'environnement. En Corse, une forte production locale de fruits de mer existe et pourrait être une voie de transmission supplémentaire dans cette région hyper endémique (Préfecture de Corse, 2015).

L'ensemble de ces éléments fait que le rôle potentiel de l'eau de consommation, des eaux de surfaces et des fruits de mer (témoin indirect de la contamination des eaux) devra réellement être investigué afin de déterminer son impact réel sur l'épidémiologie de l'hépatite E. Nous avons d'ailleurs comme projet dans les prochains mois d'étudier la présence du virus sur les huîtres et moules issues des deux points de production majeurs corses, l'étang de Diana et

Urbinu. De plus, un partenariat avec les équipes de Stella Mare de l'Université de Corse, qui étudient régulièrement les animaux filtreurs, sera peut-être mis en place. Nous avions déjà établi des contacts durant les travaux de thèse, mais le comité de suivi individuel avait conseillé de se concentrer sur les études présentées dans ce manuscrit. Avec ce futur projet, nous pourrons ainsi estimer l'importance de cette voie de transmission à l'Homme en fonction du taux de positifs déterminé mais également savoir si les eaux de surface dans les zones de conchyliculture sont contaminées.

L'hépatite E, maladie sous diagnostiquée et majoritairement asymptomatique

Un autre résultat intéressant de notre étude a été la réponse des personnes inclues à la question « Avez-vous déjà eu une hépatite E dans votre vie ? ». Aucun des 463 participants et plus spécifiquement aucun des 232 participants (50,2%) ayant une sérologie positive n'a répondu oui à cette question. Cela suggère que les cas asymptomatiques ou les infections bégnines de personnes ne consultant pas un médecin pourraient être supérieurs au 50-80% communément rapportés dans la littérature (De Keukeleire et Reynders, 2015 ; Xin et Xiao, 2016 ; EASL, 2018).

Ceci est particulièrement important dans les régions hyper endémiques où des efforts doivent être faits pour mieux faire connaître l'hépatite E et pour une stratégie de dépistage plus systématique par rapport à ce qui est actuellement pratiqué. Les facteurs de risque décrits dans notre étude ainsi que ceux rapportés dans la littérature scientifique doivent être utilisés pour définir "la population à risque" qui mérite d'être testée pour la présence d'ARN viral et pour la recherche d'IgM anti-HEV lorsque les manifestations cliniques sont cohérentes avec une infection aiguë par le HEV.

Au cours de notre étude du réservoir porcin, notre objectif était de décrire les facteurs de risque associés à l'infection par le HEV chez le porc afin de mieux comprendre le risque associé à la consommation de viande de porc et de ses produits dérivés en Corse. Nous voulions également identifier les souches circulant sur l'île.

Les génotypes 3 et 4 du HEV sont responsables de la majorité des cas dans les pays industrialisés, et sont surtout liés à la consommation d'aliments contaminés. Le rôle des produits à base de viande de porc insuffisamment cuits ou consommés crus a été particulièrement rapporté (Dalton *et al.*, 2008a ; Kamar *et al.*, 2012a ; Berto *et al.*, 2013 ; Renou *et al.*, 2014). En tant que virus zoonotique, le HEV ne semble pas causer de symptômes chez les suidés (Pavio *et al.*, 2017). Il n'y aucun indicateur suggérant des hépatites aigues ou chronique chez les porcs, ce qui fait que la circulation du virus au sein des élevages peut passer totalement inaperçu pour les éleveurs. Le problème intervient donc au niveau de la consommation par l'Homme de ces produits carnés potentiellement contaminés. Des cas d'infections aigües ont d'ailleurs été associés à la consommation de produits à base de foie de porc et notamment le *ficatellu* (Colson *et al.*, 2010 ; Pavio *et al.*, 2014 ; Renou *et al.*, 2014).

Dans l'élevage intensif français, qui est le type d'élevage largement majoritaire, les porcs élevés sont généralement abattus entre 6 et 7 mois. La plupart de ces porcs appartiennent aux races classiques utilisées pour la reproduction telles que "Large White" et "Landrace Français". En Corse et dans le sud-ouest de la France, plusieurs races anciennes locales, telle que la race « Nustrale » (Corse) ont été conservée afin de garder une production locale identitaire et spécifique du terroir corse. Ces porcs Nustrale sont abattus plus tardivement (12 à 18 mois) et possèdent des caractéristiques génétiques qui font qu'ils prennent beaucoup moins rapidement en masse que les races utilisées sur le continent. De plus le type d'élevage traditionnel extensif nourri les porcs avec des ressources majoritairement naturelles comme les châtaignes et les glands. Ainsi, l'existence d'une relation entre l'âge d'abattage du porc et le risque de transmission du HEV mérite de retenir l'attention, car elle pourrait guider les mesures de sécurité appliquées pour prévenir la contamination liée à la consommation de produits dérivés du foie de porc tels que le *ficatellu*.

Hyper endémicité également confirmée chez les porcs

Notre étude au sein de la filière porcine traditionnelle corse nous a permis de confirmer la forte présence du virus dans les élevages. Parmi les 16 élevages dans lesquels nous avons prélevé les fèces de porcs, 12 présentaient au moins un porc positif à la détection d'ARN viral.

Cette détection est synonyme d'infection en cours pour le porc. Les élevages « positifs » étaient répartis sur l'ensemble des différentes zones étudiées et non concentrés sur une seule micro région. Et bien que les 16 élevages n'étaient pas répartis dans toute la Corse, cette répartition montre quand même que le HEV est présent au sein de différentes zones de façon assez homogène. Cela est d'ailleurs en adéquation avec les résultats de nos études chez l'Homme, où chaque arrondissement était exposé de façon identique.

Bien que le taux d'infection des porcs prélevés dans notre étude n'était que de 10% ce chiffre est à mettre en perspective avec différents paramètres. Premièrement, notre stratégie de collecte était de prélever 1000 porcs environ sur différents élevages en ne faisant qu'un prélèvement « one shot » sans suivi dans le temps. Les résultats de qRT-PCR négatifs pouvaient donc être également dus à des prélèvements précédant une éventuelle infection ou des prélèvements chez des porcs déjà immunisés. La durée d'excrétion a été très peu caractérisée et les résultats des études varient de quelques jours (Andraud *et al.*, 2013) à plus de 40 jours (Bouwknegt *et al.*, 2008). Le timing de prélèvement est donc un élément majeur pour la détection du virus. Si l'on avait effectué un étude longitudinale en suivant les porcs et en prélevant les fèces plusieurs fois dans le temps on aurait eu des taux de positivité beaucoup plus élevés. C'est d'ailleurs ce qu'ont observé des chercheurs en Finlande avec 80% de positivité ARN HEV chez des jeunes porcs prélevés plusieurs fois après le sevrage (Kantala *et al.*, 2015)

Cinétique d'infection et organisation de l'élevage

Notre étude a permis de déterminer deux paramètres majeurs influençant l'infection des porcs par le HEV : l'âge du porc et le type d'élevage.

Nous avons pu établir durant notre étude des taux d'infection par classe d'âge en accord avec la littérature. En effet, le taux d'infection le plus élevé était chez les 3-4 mois (22%), puis chutait à 1,4% chez les plus de 6 mois. Le même type de cinétique a été mise en avant dans une revue se basant sur de nombreuses études dans l'élevage intensif (Salines *et al.*, 2017). Le cinétique d'infection ne semble donc pas être influencée par le type d'élevage vu qu'il est identique à celle déterminée dans la revue et que nous avons étudié des élevages majoritairement extensif/semi-extensif. Malgré un âge de sevrage plus tardif dans les élevages corses, le pic d'infection est maintenu à 3-4 mois. Cela confirme que l'immunité passive du porcelet est due au colostrum et non à l'allaitement (Bourne et Curtis, 1973). En effet, les taux d'immunoglobulines A, G et M diminuent après la mise bas (Klobasa et Butler, 1987).

Le très fort déclin du taux d'infection chez les porcs à partir de 6 mois également dans l'élevage traditionnel corse est le résultat majeur de notre étude. Autre point qui renforce ce taux d'infection très bas chez les adultes est que les rares porcs positifs adultes étaient âgés de moins de 9 mois. Après 9 mois, aucun porc prélevé n'était excréteur du virus. La même tendance a été observée dans l'étude de séroprévalence chez les porcs en Corse, avec des taux de détection IgG anti-HEV augmentant fortement avec l'âge (Jori *et al.*, 2016). Il est donc probable que les porcs infectés par le HEV à l'âge de 2/4 mois développent une forte réponse immunitaire, ce qui entraîne l'élimination du virus à l'âge de 6/8 mois, comme en témoigne le très faible taux d'infection chez les adultes également retrouvé dans la littérature (Salines *et al.*, 2017).

Le type d'élevage pourrait également impacter les taux d'infection. Le type d'élevage semi-extensif présentait une prévalence plus élevée que les élevages extensifs et fermés (11,62% *vs.* 7% ; $P < 0,05$). Ceci peut s'expliquer par des différences d'organisation de l'élevage (voir schéma Figure 1 de l'article). En effet, au sein des élevages semi-extensif, les porcs post sevrages quittent les box des truies et rejoignent des porcs plus âgés sur une autre parcelle. Durant cette période, les porcs sont dits « sensibles » à l'infection car non immunisés et ayant perdu l'immunité passive du colostrum. Ils poursuivent leur croissance sur une parcelle où des porcs potentiellement en cours d'infection sont excréteurs. Ainsi, ils s'infectent par la voie féco-orale, lors de leur contact avec le sol, l'alimentation et l'eau contaminés par les urines et les fèces des porcs infectés (Banks *et al.*, 2004 ; Fernandez-Barredo *et al.*, 2006 ; Bouwknegt *et al.*, 2009 ; Salines *et al.*, 2017). Ce type de contamination est commun à l'ensemble des élevages mais la différence du semi-extensif est que les parcelles sont plus petites que l'extensif et qu'il pourrait y avoir un effet de concentration élevée du virus sur les points d'alimentation et d'abreuvement. A l'inverse, les porcs d'élevages extensifs se déplacent sur des parcelles beaucoup plus grandes en dehors de l'élevage pour trouver des glands et des châtaignes et un effet de dilution pourrait diminuer le risque de contact avec le virus. Cet impact de l'élevage a d'ailleurs déjà été décrit dans la littérature en Corse et en Espagne (Jori *et al.*, 2016 ; Lopez-Lopez *et al.*, 2018). Dans ces études, les élevages fermés semblaient plus protégés grâce à des salles couvertes régulièrement nettoyées, des porcs souvent élevés de façon synchrone et qui donc croisent moins de porcs plus âgés possiblement excréteur et n'ayant pas de contact avec l'environnement extérieur (pas de contact avec des sangliers ou une autre source de contamination extérieure potentielle). Cependant lors de notre analyse de régression logistique prenant en compte l'aspect indépendant de chaque élevage, l'effet de l'élevage n'était plus

significatif. Il faudrait donc réaliser une étude avec un échantillonnage différent afin de vérifier cette tendance.

Le sous-type 3c largement majoritaire

La très grande majorité des échantillons positifs à la détection d'ARN viral HEV (83/85) correspondait à des souches appartenant au sous-type 3c, pour les deux autres échantillons positifs le génotype 3f a été caractérisé. Nous avons donc eu sans surprise 100% de nos souches de génotype 3. Le sous-type 3c a été associé à différentes infections humaines (Koot *et al.*, 2015 ; Lhomme *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2018), et retrouvés fréquemment chez les sangliers (Pavio *et al.*, 2016), les porcs domestiques, et les produits à base de viande de porc (Boxman *et al.*, 2017). Les deux autres souches appartenaient au génotype 3f qui a également été rapporté pour des infections humaines en Europe (Fogeda *et al.*, 2009 ; La Rosa *et al.*, 2011 ; Lhomme *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2018). Notre arbre phylogénétique montre différents petits clusters parmi les 83 souches 3c, incluant des séquences correspondant à des cas humains ou retrouvés dans le *ficatellu* (Pavio *et al.*, 2014). Nos séquences étaient également proches de souches provenant de sanglier ce qui confirme les échanges fréquents entre les deux espèces. La forme de notre arbre phylogénétique ne présentait pas de clonalité attendue pour des cas épidémiques mais correspond plus à l'hypothèse d'un échange continu des souches entre les espèces domestiques, sauvages et l'environnement.

La distribution des sous-types observée chez les porcs corses apparait comme clairement différente de celle de l'Homme. Bien que le génotype 3c est majoritaire dans notre étude, les cas humains sont plus fréquemment dues aux souches appartenant au génotype 3f (Nicot *et al.*, 2018 ; Suin *et al.*, 2019). On peut cependant noter que les cas humains liés au génotype 3c sont en augmentation (Lhomme *et al.*, 2015). Cette différence de répartition peut résulter de différentes situations. Bien que les deux génotypes ne présentent pas de pathogénicité différente (Smith *et al.*, 2015), cela pourrait suggérer qu'en Corse, les infections humaines ne sont pas dues aux produits issus de la filière porcine traditionnelle. Une situation similaire a été observée en Estonie, où les auteurs suggéraient que les infections au HEV étaient plus liés au voyage ou à la consommation de produits carnés/viandes importés (Kuznetsova *et al.*, 2018). Une autre hypothèse possible, est que nos résultats sont témoins d'une évolution de l'épidémiologie locale du HEV avec un passage du génotype 3f au génotype 3c. Dans ce cas le réservoir porcin pourrait apparaitre comme un indicateur des futures souches infectant l'Homme.

La filière traditionnelle, paradoxe entre forte exposition et produits moins à risque ?

Si l'on synthétise les résultats de la littérature et nos résultats concernant les élevages en Corse, on fait face à une situation assez paradoxale. D'un côté, comme pour l'Homme, les porcs corses sont beaucoup plus exposés au HEV en Corse que sur le continent. En effet, les précédentes études ont d'ailleurs montré des taux d'exposition de 100% à l'échelle de l'élevage (au moins un porc séropositif, contre 65% sur le continent) et de 88% au niveau individuel en ce qui concerne les anticorps IgG anti-HEV (Jori *et al.*, 2016). De l'autre, l'organisation et le type d'élevage pourrait « effacer » cette hyper exposition des animaux par un âge d'abattage très tardif (12 à18 mois) à un moment où les porcs sont déjà immunisés contre le virus, et n'ayant donc pas de virus dans le foie. Bien que notre étude ne soit pas designée pour déterminer la cinétique d'infection chez les porcs Nustrale en Corse, notamment sur les classes d'âges après 6 mois, nos résultats suggèrent que les produits issus de cette filière sont moins à risque concernant le HEV. A l'inverse, les porcs provenant de l'élevage intensif sont abattus à un âge ou des porcs peuvent encore être excréteurs (6mois). Il reste cependant la question d'une possible réinfection des adultes déjà immunisés. Des baisses du système immunitaire chez les truies en période de gestation ou des porcs ayant une co-infection ne sont pas à exclure et la faiblesse du système immunitaire des porcs très vieux, notamment des truies a déjà été décrit dans la littérature (Casas *et al.*, 2011).

Pour lever les doutes liés à ces réinfections éventuelles et confirmer nos hypothèses sur l'élevage traditionnel, une étude de suivi est actuellement en cours en partenariat avec l'INRA et l'ANSES Maison Alfort afin de suivre les porcs, du sevrage jusqu'à l'abattage dans les élevages traditionnels corses. L'INRA a également analysé de nombreux foies de porcs abattus et issus de l'élevage traditionnel afin de voir quelle part des produits issus de cette filière pourrait être à risque pour l'Homme.

Se pose donc la question suivante : Comment pourrait-on avoir autant de *ficatelli* contaminés ou de cas liés à sa consommation, si notre hypothèse sur les élevages traditionnels est vérifiée ? Comme expliqué précédemment en introduction, la production de charcuterie issue de l'élevage traditionnel ne représente qu'une petite minorité de la production totale de charcuterie en Corse (10%). Les 90% restant sont issus de productions industrielles où les porcs utilisés ne sont pas forcément Nustrale, sont souvent importés et proviennent d'autres systèmes d'élevage ne présentant pas l'aspect protecteur de l'abattage tardif, par exemple. Notre hypothèse ne serait donc pas en contradiction avec le rôle majeur du *ficatellu* dans la

transmission à l'Homme, mais l'origine de ses produits (si l'hypothèse est vérifiée) serait donc plutôt au niveau des productions industrielles.

Conclusion

En conclusion, l'ensemble des études réalisées durant ce travail de thèse a permis de confirmer l'hyper endémicité et la spécificité de la Corse concernant le virus de l'hépatite E que ce soit en population humaine ou animale.

Nos résultats ont permis de démontrer une exposition assez homogène sur l'île, que ce soit en ce qui concerne la détection d'ARN viral dans les élevages porcins traditionnels, la détection des IgG anti-HEV en population humaine à travers les différents arrondissements corses mais aussi au niveau des séroprévalences stratifiées par âge au sein de différentes populations adultes corses. Cette répartition homogène de l'exposition, cumulée aux très fort taux de détection des marqueurs d'infections au HEV et à l'impact de la nativité en Corse, renforcent et confirment l'hyper endémicité de l'île.

Nos études ont également permis d'identifier des nouveaux facteurs de risque tels que la consommation de *fittonu* et la pratique du dépeçage/éviscération des animaux. Ces derniers s'ajoutaient à la consommation de *ficatellu* et à l'effet cumulatif de l'exposition avec l'âge croissant déjà bien décrits dans la littérature. Des tendances ont également été observées concernant une possible association entre des pratiques liées à l'environnement et le taux de séropositivité IgG anti-HEV (consommation de baies sauvages, d'eaux de sources en montagne ou d'eaux de fontaines dans les villages).

Les travaux réalisés au sein de la filière porcine traditionnelle ont permis de confirmer que la cinétique d'infection au HEV avec un pic à 3-4 mois restait identique à celle établie dans la littérature malgré un type d'élevage spécifique. Bien que la cinétique soit similaire, des tendances sur l'impact du type d'élevage semi-extensif ont également été mises en avant et pourraient s'expliquer par l'organisation et la structure de ces élevages. Les souches majoritaires de génotype 3c circulant sur l'île ont également pu être identifiées et l'analyse phylogénétique confirme les échanges entre faunes sauvages et domestiques et également le caractère zoonotique du HEV pour l'Homme. De plus, l'absence de porcs excréteurs du HEV chez les porcs de plus de 9 mois cumulé à un âge d'abattage tardif, pourrait faire de l'élevage traditionnel corse, une filière beaucoup moins à risque en ce qui concerne la transmission du HEV à l'Homme.

Nos résultats pourraient être utilisé dans une optique de prévention et d'information de la population corse afin de limiter la transmission du virus : port de gants et protections pour les pratiques à risque, non consommation de produits à risque pour les personnes très sensibles et gestion des pratiques d'élevages en connaissance des problématiques par exemple.

Enfin, nos futurs travaux en Corse doivent à présent réellement prendre en compte l'aspect environnemental de ce virus et étudier les eaux de surfaces et d'irrigation, d'autres animaux sauvages et les animaux filtreurs afin de mieux comprendre l'épidémiologie du virus de l'hépatite E.

Références bibliographiques

Abid S. and A. H. Khan (2002). *Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E.* Am J Gastroenterol 97(6): 1544-1547.
Abravanel F., S. Chapuy-Regaud, S. Lhomme, M. Miedouge, J. M. Peron, L. Alric, L. Rostaing, N. Kamar and J. Izopet (2013). *Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients.* J Clin Virol 58(4): 624-628.
Abravanel F., S. Lhomme, H. El Costa, B. Schvartz, J. M. Peron, N. Kamar and J. Izopet (2017). *Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France.* Emerg Infect Dis 23(7): 1191-1193.
Abravanel F., J. Pique, E. Couturier, F. Nicot, C. Dimeglio, S. Lhomme, J. Chiabrando, K. Saune, J. M. Peron, N. Kamar, S. Evrard, H. de Valk, P. Cintas, J. Izopet and H. E. V. s. group (2018). *Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations.* J Infect 77(3): 220-226.
Agence Régionale de la Santé (2017). Bilan 2016 de la qualité de l'eau potable en Corse.
Aggarwal R. (2011). *Clinical presentation of hepatitis E.* Virus Res 161(1): 15-22.
Aggarwal R. and S. Jameel (2011). *Hepatitis E.* Hepatology 54(6): 2218-2226.
Aggarwal R., D. Kini, S. Sofat, S. R. Naik and K. Krawczynski (2000). *Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E.* Lancet 356(9235): 1081-1082.
Ahmed A., I. A. Ali, H. Ghazal, J. Fazili and S. Nusrat (2015). *Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management.* Int J Hepatol 2015: 872431.
Ahmed Z., P. Holla, I. Ahmad and S. Jameel (2016). *The ATP synthase subunit β (ATP5B) is an entry factor for the hepatitis E virus.* bioRxiv.
Alberts C. J., M. F. Schim van der Loeff, S. Sadik, F. R. Zuure, E. Beune, M. Prins, M. B. Snijder and S. M. Bruisten (2018). *Hepatitis E virus seroprevalence and determinants in various study populations in the Netherlands.* PLoS One 13(12): e0208522.
Alfonsi V., L. Romano, A. R. Ciccaglione, G. La Rosa, R. Bruni, A. Zanetti, S. Della Libera, M. Iaconelli, P. Bagnarelli, M. R. Capobianchi, A. R. Garbuglia, F. Riccardo, M. E. Tosti and G. Collaborating (2018). *Hepatitis E in Italy: 5 years of national epidemiological, virological and environmental surveillance, 2012 to 2016.* Euro Surveill 23(41).
Alric L., D. Bonnet, G. Laurent, N. Kamar and J. Izopet (2010). *Chronic hepatitis E virus infection: successful virologic response to pegylated interferon-alpha therapy.* Ann Intern Med 153(2): 135-136.
Andonov A., M. Robbins, J. Borlang, J. Cao, T. Hatchette, A. Stueck, Y. Deschambault, K. Murnaghan, J. Varga and L. Johnston (2019). *Rat Hepatitis E Virus Linked to Severe Acute Hepatitis in an Immunocompetent Patient.* J Infect Dis 220(6): 951-955.
Andraud M., M. Dumarest, R. Cariolet, B. Aylaj, E. Barnaud, F. Eono, N. Pavio and N. Rose (2013). *Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs.* Vet Res 44: 102.
Anheyer-Behmenburg H. E., K. Szabo, U. Schotte, A. Binder, G. Klein and R. Johne (2017). *Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013-2015.* Emerg Infect Dis 23(1): 130-133.
Anty R., L. Ollier, J. M. Peron, E. Nicand, I. Cannavo, A. Bongain, V. Giordanengo and A. Tran (2012). *First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France.* J Clin Virol 54(1): 76-78.
Arankalle V. A. and L. P. Chobe (2000). *Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E.* Vox Sang 79(2): 72-74.
Arankalle V. A., M. V. Joshi, A. M. Kulkarni, S. S. Gandhe, L. P. Chobe, S. S. Rautmare, A. C. Mishra and V. S. Padbidri (2001). *Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species.* J Viral Hepat 8(3): 223-227.
Arruda P. H., B. L. Arruda, K. J. Schwartz, F. Vannucci, T. Resende, A. Rovira, P. Sundberg, J. Nietfeld and B. M. Hause (2017). *Detection of a novel sapelovirus in central nervous tissue of pigs with polioencephalomyelitis in the USA.* Transbound Emerg Dis 64(2): 311-315.
Arya R., B. Antonisamy and S. Kumar (2012). *Sample size estimation in prevalence studies.* Indian J Pediatr 79(11): 1482-1488.

Aspinall E. J., E. Couturier, M. Faber, B. Said, S. Ijaz, L. Tavoschi, J. Takkinen, C. Adlhoch and e. country (2016). *Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015.* Euro Surveill 22(26).

Aspinall E. J., E. Couturier, M. Faber, B. Said, S. Ijaz, L. Tavoschi, J. Takkinen, C. Adlhoch and E. On Behalf Of The Country (2017). *Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015.* Euro Surveill 22(26).

Assemblée de Corse (2006). Plan de relance de la filière porcine Corse, Collectivité Territoriale de Corse.

Avellon A., L. Morago, M. Garcia-Galera del Carmen, M. Munoz and J. M. Echevarria (2015). *Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection.* J Med Virol 87(11): 1934-1939.

Backer J. A., A. Berto, C. McCreary, F. Martelli and W. H. van der Poel (2012). *Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: estimation from field data and effect of vaccination.* Epidemics 4(2): 86-92.

Bajpai M. and E. Gupta (2011). *Transfusion-transmitted hepatitis E: is screening warranted?* Indian J Med Microbiol 29(4): 353-358.

Balayan M. S., A. G. Andjaparidze, S. S. Savinskaya, E. S. Ketiladze, D. M. Braginsky, A. P. Savinov and V. F. Poleschuk (1983). *Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route.* Intervirology 20(1): 23-31.

Balayan M. S., O. E. Fedorova, M. I. Mikhailov, P. G. Rytick, V. F. Eremin, T. I. Danilova, B. I. Shevelev, E. C. Gorbacheva and G. Y. Pankova (1997). *Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients.* J Viral Hepat 4(4): 279-283.

Banks M., G. S. Heath, S. S. Grierson, D. P. King, A. Gresham, R. Girones, F. Widen and T. J. Harrison (2004). *Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom.* Vet Rec 154(8): 223-227.

Barnaud E., S. Rogee, P. Garry, N. Rose and N. Pavio (2012a). *Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food.* Appl Environ Microbiol 78(15): 5153-5159.

Barnaud E., S. Rogée, P. Garry, N. Rose and N. Pavio (2012b). *Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food.* Appl Environ Microbiol 78(15): 5153-5159.

Barrett A. D. (2001). *Current status of flavivirus vaccines.* Ann N Y Acad Sci 951: 262-271.

Bassal R., M. Wax, R. Shirazi, T. Shohat, D. Cohen, D. David, S. Abu-Mouch, Y. Abu-Ghanem, E. Mendelson, Z. Ben-Ari and O. Mor (2019). *Seroprevalence of hepatitis E virus in dromedary camels, Bedouins, Muslim Arabs and Jews in Israel, 2009-2017.* Epidemiol Infect 147: e92.

Bayhan G. I., K. Demioren and H. Guducuoglu (2016). *Epidemiology of hepatitis E virus in children in the province of Van, Turkey.* Turk Pediatri Ars 51(3): 148-151.

Baylis S. A., T. Gartner, S. Nick, J. Ovemyr and J. Blumel (2012). *Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States.* Vox Sang 103(1): 89-90.

Beale M. A., K. Tettmar, R. Szypulska, R. S. Tedder and S. Ijaz (2011). *Is there evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors?* Vox Sang 100(3): 340-342.

Behrendt P., E. Steinmann, M. P. Manns and H. Wedemeyer (2014). *The impact of hepatitis E in the liver transplant setting.* J Hepatol 61(6): 1418-1429.

Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co. L. Wantai HEV-IgM ELISA.

Bendall R., V. Ellis, S. Ijaz, R. Ali and H. Dalton (2010). *A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries.* J Med Virol 82(5): 799-805.

Berto A., S. Grierson, R. Hakze-van der Honing, F. Martelli, R. Johne, J. Reetz, R. G. Ulrich, N. Pavio, W. H. Van der Poel and M. Banks (2013). *Hepatitis E virus in pork liver sausage, France.* Emerg Infect Dis 19(2): 264-266.

Berto A., J. R. Mesquita, R. Hakze-van der Honing, M. S. Nascimento and W. H. van der Poel (2012). *Detection and characterization of hepatitis E virus in domestic pigs of different ages in Portugal.* Zoonoses Public Health 59(7): 477-481.

Bigot. M (1887). Paysans bergers en communautés: porchers bergers des montagnes de Bastelica. L. o. d. d. mondes.

Bilic I., B. Jaskulska, A. Basic, C. J. Morrow and M. Hess (2009). *Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes.* J Gen Virol 90(Pt 4): 863-873.
Boadella M., M. Casas, M. Martin, J. Vicente, J. Segales, J. de la Fuente and C. Gortazar (2010). *Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain.* Emerg Infect Dis 16(12): 1994-1996.
Borgen K., T. Herremans, E. Duizer, H. Vennema, S. Rutjes, A. Bosman, A. M. de Roda Husman and M. Koopmans (2008). *Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006.* BMC Infect Dis 8: 61.
Bosch A., R. M. Pinto and S. Guix (2014). *Human astroviruses.* Clin Microbiol Rev 27(4): 1048-1074.
Bourne F. J. and J. Curtis (1973). *The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow.* Immunology 24(1): 157-162.
Boutrouille A., L. Bakkali-Kassimi, C. Cruciere and N. Pavio (2007). *Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors.* J Clin Microbiol 45(6): 2009-2010.
Bouwknegt M., K. Frankena, S. A. Rutjes, G. J. Wellenberg, A. M. de Roda Husman, W. H. van der Poel and M. C. de Jong (2008). *Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure.* Vet Res 39(5): 40.
Bouwknegt M., F. Lodder-Verschoor, W. H. van der Poel, S. A. Rutjes and A. M. de Roda Husman (2007). *Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands.* J Food Prot 70(12): 2889-2895.
Bouwknegt M., S. A. Rutjes, C. B. Reusken, N. Stockhofe-Zurwieden, K. Frankena, M. C. de Jong, A. M. de Roda Husman and W. H. Poel (2009). *The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation.* BMC Vet Res 5: 7.
Boxman I. L. A., C. C. C. Jansen, G. Hagele, A. Zwartkruis-Nahuis, J. Cremer, H. Vennema and A. S. L. Tijsma (2017). *Porcine blood used as ingredient in meat productions may serve as a vehicle for hepatitis E virus transmission.* Int J Food Microbiol 257: 225-231.
Bradley D. W. (1990). *Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis.* Br Med Bull 46(2): 442-461.
Bradley D. W., K. Krawczynski, E. H. Cook, Jr., K. A. McCaustland, C. D. Humphrey, J. E. Spelbring, H. Myint and J. E. Maynard (1987). *Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles.* Proc Natl Acad Sci U S A 84(17): 6277-6281.
Brassard J., M. J. Gagne, M. Genereux and C. Cote (2012). *Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries.* Appl Environ Microbiol 78(10): 3763-3766.
Breum S. O., C. K. Hjulsager, N. de Deus, J. Segales and L. E. Larsen (2010). *Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population.* Vet Microbiol 146(1-2): 144-149.
Buitrago D., C. Cano-Gomez, M. Aguero, P. Fernandez-Pacheco, C. Gomez-Tejedor and M. A. Jimenez-Clavero (2010). *A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain.* J Vet Diagn Invest 22(5): 763-766.
Bura M., M. Lagiedo, M. Michalak, J. Sikora and I. Mozer-Lisewska (2017). *Hepatitis E virus IgG seroprevalence in HIV patients and blood donors, west-central Poland.* Int J Infect Dis.
Burri C., F. Vial, M. P. Ryser-Degiorgis, H. Schwermer, K. Darling, M. Reist, N. Wu, O. Beerli, J. Schöning, M. Cavassini and A. Waldvogel (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic pigs and wild boars in Switzerland.* Zoonoses and Public Health 61(8): 537-544.
Buti M., P. Plans, A. Dominguez, R. Jardi, F. Rodriguez Frias, R. Esteban, L. Salleras and A. Plasencia (2008). *Prevalence of hepatitis E virus infection in children in the northeast of Spain.* Clin Vaccine Immunol 15(4): 732-734.
Caballero-Gomez J., A. Rivero-Juarez, D. Cano-Terriza, M. A. Risalde, P. Lopez-Lopez, M. Frias, S. Jimenez-Ruiz, A. Rivero and I. Garcia-Bocanegra (2019). *Survey for Hepatitis E virus infection in non-human primates in zoos in Spain.* Transbound Emerg Dis 66(4): 1771-1775.
Capai L., R. Charrel and A. Falchi (2018). *Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps?* Viruses 10(6).

Capai L., C. F., O. Maestrini, N. Villechenaud, S. Masse, F. Bosseur, X. De Lamballerie, R. Charrel and A. Falchi (2019a). *Drastic decline of hepatitis E virus detection in domestic pigs after the age of 6 months, Corsica, France.* Transbound Emerg Dis.
Capai L., A. Falchi and R. Charrel (2019b). *Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature.* Viruses 11(1).
Cardi F.-X. (2018). *La chasse en Corse.* Fédération Departementale des Chasseurs de la Corse du Sud.
Carpentier A., H. Chaussade, E. Rigaud, J. Rodriguez, C. Berthault, F. Boue, M. Tognon, A. Touze, N. Garcia-Bonnet, P. Choutet and P. Coursaget (2012). *High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France.* J Clin Microbiol 50(9): 2888-2893.
Caruso C., P. Modesto, S. Bertolini, S. Peletto, P. L. Acutis, A. Dondo, S. Robetto, W. Mignone, R. Orusa, G. Ru and L. Masoero (2015). *Serological and virological survey of hepatitis E virus in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f.* Arch Virol 160(1): 153-160.
Caruso C., S. Peletto, A. Rosamilia, P. Modesto, L. Chiavacci, B. Sona, F. Balsamelli, V. Ghisetti, P. L. Acutis, G. Pezzoni, E. Brocchi, N. Vitale and L. Masoero (2016). *Hepatitis E Virus: A Cross-Sectional Serological and Virological Study in Pigs and Humans at Zoonotic Risk within a High-Density Pig Farming Area.* Transbound Emerg Dis.
Caruso C., S. Peletto, A. Rosamilia, P. Modesto, L. Chiavacci, B. Sona, F. Balsamelli, V. Ghisetti, P. L. Acutis, G. Pezzoni, E. Brocchi, N. Vitale and L. Masoero (2017). *Hepatitis E Virus: A Cross-Sectional Serological and Virological Study in Pigs and Humans at Zoonotic Risk within a High-Density Pig Farming Area.* Transbound Emerg Dis 64(5): 1443-1453.
Casabianca. F (2004). Elevage sylvo-pastoral du porc en Corse. Porchi è cignali. Saveurs et mystères des suidés. M. d. l. Corse and Albiana**:** 73-91.
Casabianca. F F. A. (1994). Avenir de l'élevage porcin méditerrannéen extensif et coordination des filières de production. Orientation des activités d'élevage par la qualité des produits tranformés. The study of livestock farming systems in a research and development framework., EAAP. 63**:** 61-73.
Casas M., R. Cortes, S. Pina, B. Peralta, A. Allepuz, M. Cortey, J. Casal and M. Martin (2011). *Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds.* Vet Microbiol 148(1): 27-34.
Centre National de Référence HEV. (2019). *Virus de l'hépatite E.* Retrieved November 2017, from http://www.cnrvha-vhe.org/?cat=7.
Ceylan A., M. Ertem, E. Ilcin and T. Ozekinci (2003). *A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation.* Epidemiol Infect 131(1): 753-756.
Chapuy-Regaud S., M. Dubois, C. Plisson-Chastang, T. Bonnefois, S. Lhomme, J. Bertrand-Michel, B. You, S. Simoneau, P. E. Gleizes, B. Flan, F. Abravanel and J. Izopet (2017). *Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response.* Biochimie 141: 70-79.
Charrier F., S. Rossi, F. Jori, O. Maestrini, C. Richomme, F. Casabianca, C. Ducrot, J. Jouve, N. Pavio and M. F. Le Potier (2018). *Aujeszky's Disease and Hepatitis E Viruses Transmission between Domestic Pigs and Wild Boars in Corsica: Evaluating the Importance of Wild/Domestic Interactions and the Efficacy of Management Measures.* Front Vet Sci 5: 1.
Chaussade H., E. Rigaud, A. Allix, A. Carpentier, A. Touze, D. Delzescaux, P. Choutet, N. Garcia-Bonnet and P. Coursaget (2013). *Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals.* J Clin Virol 58(3): 504-508.
Chen J., F. Chen, Q. Zhou, W. Li, Y. Song, Y. Pan, X. Zhang, C. Xue, Y. Bi and Y. Cao (2012). *Complete genome sequence of a novel porcine Sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea.* J Virol 86(19): 10898.
Chen Q., L. Wang, Y. Zheng, J. Zhang, B. Guo, K. J. Yoon, P. C. Gauger, K. M. Harmon, R. G. Main and G. Li (2018). *Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States.* Virol J 15(1): 95.
Christensen P. B., R. E. Engle, C. Hjort, K. M. Homburg, W. Vach, J. Georgsen and R. H. Purcell (2008). *Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark.* Clin Infect Dis 47(8): 1026-1031.

Christensen P. B., R. E. Engle, S. E. Jacobsen, H. B. Krarup, J. Georgsen and R. H. Purcell (2002). *High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users.* J Med Virol 66(1): 49-55.
Cleland A., L. Smith, C. Crossan, O. Blatchford, H. R. Dalton, L. Scobie and J. Petrik (2013). *Hepatitis E virus in Scottish blood donors.* Vox Sang 105(4): 283-289.
Colson P., P. Borentain, B. Queyriaux, M. Kaba, V. Moal, P. Gallian, L. Heyries, D. Raoult and R. Gerolami (2010). *Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans.* J Infect Dis 202(6): 825-834.
Colson P., C. Dhiver and R. Gerolami (2008). *Hepatitis E virus as a newly identified cause of acute viral hepatitis during human immunodeficiency virus infection.* Clin Microbiol Infect 14(12): 1176-1180.
Cossaboom C. M., L. Córdoba, B. A. Dryman and X.-J. Meng (2011). *Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA.* Emerging Infectious Diseases 17(11): 2047-2049.
Cossaboom C. M., C. L. Heffron, D. Cao, D. M. Yugo, A. E. Houk-Miles, D. S. Lindsay, A. M. Zajac, A. S. Bertke, F. Elvinger and X. J. Meng (2016). *Risk factors and sources of foodborne hepatitis E virus infection in the United States.* J Med Virol 88(9): 1641-1645.
Costanzo N., E. Sarno, V. Peretti, L. Ciambrone, F. Casalinuovo and A. Santoro (2015). *Serological and Molecular Investigation of Swine Hepatitis E Virus in Pigs Raised in Southern Italy.* Journal of Food Protection 78(11): 2099-2102.
Couturier E., F. Abravanel, J. Figoni, D. Van Cauteren, A. Septfons, S. Lhomme, J. Durand, J. Izopet and H. De Valk (2018). SURVEILLANCE DE L'HÉPATITE E EN FRANCE, 2002-2016 / HEPATITIS E SURVEILLANCE IN FRANCE, 2002-2016. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire**:** 9.
Crossan C., P. J. Baker, J. Craft, Y. Takeuchi, H. R. Dalton and L. Scobie (2012). *Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom.* Emerging Infectious Diseases 18(12): 2085-2087.
Crossan C., S. Grierson, J. Thomson, A. Ward, J. Nunez-Garcia, M. Banks and L. Scobie (2015). *Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland.* Epidemiology and Infection 143(10): 2237-2240.
Dahiya M., A. Kumar, P. Kar and R. K. Gupta (2005). *Acute viral hepatitis in third trimester of pregnancy.* Indian J Gastroenterol 24(3): 128-129.
Dahnert L., F. J. Conraths, N. Reimer, M. H. Groschup and M. Eiden (2018). *Molecular and serological surveillance of Hepatitis E virus in wild and domestic carnivores in Brandenburg, Germany.* Transbound Emerg Dis.
Dalton H. R., R. Bendall, S. Ijaz and M. Banks (2008a). *Hepatitis E: an emerging infection in developed countries.* Lancet Infect Dis 8(11): 698-709.
Dalton H. R., R. P. Bendall, F. E. Keane, R. S. Tedder and S. Ijaz (2009). *Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection.* N Engl J Med 361(10): 1025-1027.
Dalton H. R., H. J. Fellows, E. J. Gane, P. Wong, S. Gerred, B. Schroeder, M. C. Croxson and O. Garkavenko (2007a). *Hepatitis E in new zealand.* J Gastroenterol Hepatol 22(8): 1236-1240.
Dalton H. R., S. Hazeldine, M. Banks, S. Ijaz and R. Bendall (2007b). *Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease.* Lancet 369(9569): 1260.
Dalton H. R., N. Kamar, S. A. Baylis, D. Moradpour, H. Wedemeyer and F. Negro (2018). *EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection.* Journal of Hepatology 68(6): 1256-1271.
Dalton H. R., N. Kamar, J. J. van Eijk, B. N. McLean, P. Cintas, R. P. Bendall and B. C. Jacobs (2016). *Hepatitis E virus and neurological injury.* Nat Rev Neurol 12(2): 77-85.
Dalton H. R., F. E. Keane, R. Bendall, J. Mathew and S. Ijaz (2011). *Treatment of chronic hepatitis E in a patient with HIV infection.* Ann Intern Med 155(7): 479-480.
Dalton H. R., W. Stableforth, P. Thurairajah, S. Hazeldine, R. Remnarace, W. Usama, L. Farrington, N. Hamad, C. Sieberhagen, V. Ellis, J. Mitchell, S. H. Hussaini, M. Banks, S. Ijaz and R. P. Bendall (2008b). *Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease.* Eur J Gastroenterol Hepatol 20(8): 784-790.
Das A., W. Maury and S. M. Lemon (2019). *TIM1 (HAVCR1): an Essential "Receptor" or an "Accessory Attachment Factor" for Hepatitis A Virus?* J Virol 93(11).

de Carvalho L. G., R. S. Marchevsky, D. R. dos Santos, J. M. de Oliveira, V. S. de Paula, L. M. Lopes, W. H. Van der Poel, J. E. Gonzalez, M. S. Munne, J. Moran, A. C. Cajaraville, M. Pelajo-Machado, O. G. Cruz and M. A. Pinto (2013). *Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in Macaca fascicularis.* BMC Infect Dis 13: 495.

De Keukeleire S. and M. Reynders (2015). *Hepatitis E: An Underdiagnosed, Emerging Infection in Nonendemic Regions.* J Clin Transl Hepatol 3(4): 288-291.

de Niet A., H. L. Zaaijer, I. ten Berge, C. J. Weegink, H. W. Reesink and U. Beuers (2012). *Chronic hepatitis E after solid organ transplantation.* Neth J Med 70(6): 261-266.

De Pedro. E (1987). *Estudio de lors factores sexo y peso de sacrificio sobre la caracteristicas de la canal de cerdo iberico.*, Cordoba.

De Sabato L., I. Di Bartolo, E. Montomoli, C. Trombetta, F. M. Ruggeri and F. Ostanello (2017). *Retrospective Study Evaluating Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Blood Donors and in Swine Veterinarians in Italy (2004).* Zoonoses Public Health 64(4): 308-312.

Debing Y., D. Moradpour, J. Neyts and J. Gouttenoire (2016a). *Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice.* Journal of hepatology 65(1): 200-212.

Debing Y., D. Moradpour, J. Neyts and J. Gouttenoire (2016b). *Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice.* J Hepatol 65(1): 200-212.

Demirci M., A. Yigin, O. Unlu and S. Kilic Altun (2019). *[Detection of HEV RNA amounts and genotypes in raw milks obtained from different animals].* Mikrobiyol Bul 53(1): 43-52.

Denzin N. and J. Borgwardt (2013). *[Occurrence and geographical distribution of antibodies to hepatitis E virus in wild boars of Saxony-Anhalt, Germany (2011)].* Berl Munch Tierarztl Wochenschr 126(5-6): 230-235.

Deroux A., J. P. Brion, L. Hyerle, A. Belbezier, M. Vaillant, E. Mosnier, S. Larrat, P. Morand and P. Pavese (2014). *Association between hepatitis E and neurological disorders: two case studies and literature review.* J Clin Virol 60(1): 60-62.

Di Bartolo I., L. De Sabato, A. Marata, N. Martinelli, C. F. Magistrali, M. Monini, E. Ponterio, F. Ostanello and F. M. Ruggeri (2016). *Serological survey of hepatitis E virus infection in farmed and pet rabbits in Italy.* Archives of Virology 161(5): 1343-1346.

Di Bartolo I., F. Martelli, N. Inglese, M. Pourshaban, A. Caprioli, F. Ostanello and F. M. Ruggeri (2008). *Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy.* Vet Microbiol 132(1-2): 47-55.

Di Bartolo I., E. Ponterio, G. Angeloni, F. Morandi, F. Ostanello, S. Nicoloso and F. M. Ruggeri (2017). *Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (Cervus elaphus) Population in Central Italy.* Transbound Emerg Dis 64(1): 137-143.

Di Bartolo I., E. Ponterio, L. Castellini, F. Ostanello and F. M. Ruggeri (2011). *Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy.* Vet Microbiol 149(3-4): 330-338.

Di Martino B., F. Di Profio, V. Martella, E. Di Felice, C. E. Di Francesco, C. Ceci and F. Marsilio (2010). *Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy.* Arch Virol 155(1): 103-106.

Di Martino B., F. Di Profio, I. Melegari, V. Sarchese, S. Robetto, F. Marsilio and V. Martella (2016). *Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats.* Virus Res 225: 69-72.

Ding Q., B. Heller, J. M. Capuccino, B. Song, I. Nimgaonkar, G. Hrebikova, J. E. Contreras and A. Ploss (2017). *Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles.* Proc Natl Acad Sci U S A 114(5): 1147-1152.

Direction régionale de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt de Corse. (2017). *Chiffres clés de l'agriculture corse - Edition 2017 - bilan de campagne 2016.*

Doceul V., E. Bagdassarian, A. Demange and N. Pavio (2016). *Zoonotic Hepatitis E Virus: Classi fi cation, Animal Reservoirs and Transmission Routes.* Viruses 8(10).

Dogadov D. I., L. I. Korzaya, K. K. Kyuregyan, A. A. Karlsen, V. S. Kichatova, I. A. Potemkin, A. M. Goncharenko, M. I. Mikhailov and B. A. Lapin (2019). *Natural infection of captive cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) with hepatitis E virus genotype 4.* Arch Virol.

Dong C., M. Zafrullah, T. Mixson-Hayden, X. Dai, J. Liang, J. Meng and S. Kamili (2012). *Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus.* Hepatology 55(5): 1324-1332.

Donia D., M. C. Dell'Amico, A. R. Petrinca, I. Martinucci, M. Mazzei, F. Tolari and M. Divizia (2012). *Presence of hepatitis E RNA in mussels used as bio-monitors of viral marine pollution.* J Virol Methods 186(1-2): 198-202.

Donin D. G., R. de Arruda Leme, A. F. Alfieri, G. C. Alberton and A. A. Alfieri (2014). *First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil.* Trop Anim Health Prod 46(3): 523-528.

Doudier B., H. Vencatassin, S. Aherfi and P. Colson (2014). *Fatal fulminant hepatitis E associated with autoimmune hepatitis and excessive paracetamol intake in Southeastern France.* J Clin Microbiol 52(4): 1294-1297.

Doudier B., D. Verrot, C. Serratrice, C. Poucel, R. Auguste and P. Colson (2015). *Fatal outcome of autochthonous hepatitis E in a patient with B cell lymphoma in Southeastern France.* J Clin Microbiol 53(1): 339-342.

DRAAF. D. R. d. l. A. d. l. A. e. d. l. F. (2017). Panorama de l'agriculture en Corse.

Dremsek P., S. Joel, C. Baechlein, N. Pavio, A. Schielke, M. Ziller, R. Durrwald, C. Renner, M. H. Groschup, R. Johne, A. Krumbholz and R. G. Ulrich (2013). *Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs.* J Virol Methods 190(1-2): 11-16.

Dremsek P., J. J. Wenzel, R. Johne, M. Ziller, J. Hofmann, M. H. Groschup, S. Werdermann, U. Mohn, S. Dorn, M. Motz, M. Mertens, W. Jilg and R. G. Ulrich (2012). *Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs.* Med Microbiol Immunol 201(2): 189-200.

Drexler J. F., A. Seelen, V. M. Corman, A. Fumie Tateno, V. Cottontail, R. Melim Zerbinati, F. Gloza-Rausch, S. M. Klose, Y. Adu-Sarkodie, S. K. Oppong, E. K. Kalko, A. Osterman, A. Rasche, A. Adam, M. A. Muller, R. G. Ulrich, E. M. Leroy, A. N. Lukashev and C. Drosten (2012). *Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae.* J Virol 86(17): 9134-9147.

EASL (2018). *EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection.* J Hepatol 68(6): 1256-1271.

ECDC (2017). Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015 Baseline assessment of testing, diagnosis, surveillance and epidemiology. Stockolm, European Center Disease for Prevention and Control

Echevarria J. M. (2014). *Light and Darkness: Prevalence of Hepatitis E Virus Infection among the General Population.* Scientifica (Cairo) 2014: 481016.

Eiden M., A. Vina-Rodriguez, J. Schlosser, H. Schirrmeier and M. H. Groschup (2016). *Detection of Hepatitis E Virus in Archived Rabbit Serum Samples, Germany 1989.* Food and Environmental Virology 8(1): 105-107.

El-Tras W. F., A. A. Tayel and N. N. El-Kady (2013). *Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt.* Zoonoses Public Health 60(3): 244-251.

Emerson S. U., V. A. Arankalle and R. H. Purcell (2005a). *Thermal stability of hepatitis E virus.* J Infect Dis 192(5): 930-933.

Emerson S. U., V. A. Arankalle and R. H. Purcell (2005b). *Thermal stability of hepatitis E virus.* J Infect Dis 192(5): 930-933.

Emerson S. U., H. Nguyen, U. Torian and R. H. Purcell (2006). *ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro.* J Virol 80(21): 10457-10464.

Emerson S. U. and R. H. Purcell (2003). *Hepatitis E virus.* Rev Med Virol 13(3): 145-154.

Favorov M. O., M. Y. Kosoy, S. A. Tsarev, J. E. Childs and H. S. Margolis (2000). *Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States.* J Infect Dis 181(2): 449-455.

Fearon M. A., S. F. O'Brien, G. Delage, V. Scalia, F. Bernier, M. Bigham, S. Weger, S. Prabhu and A. Andonov (2017). *Hepatitis E in Canadian blood donors.* Transfusion 57(6): 1420-1425.

Feng R., C. Zhao, M. Li, T. J. Harrison, Z. Qiao, Y. Feng, Z. Ma and Y. Wang (2011). *Infection dynamics of hepatitis E virus in naturally infected pigs in a Chinese farrow-to-finish farm.* Infect Genet Evol 11(7): 1727-1731.

Feng Z., L. Hensley, K. L. McKnight, F. Hu, V. Madden, L. Ping, S. H. Jeong, C. Walker, R. E. Lanford and S. M. Lemon (2013). *A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes.* Nature 496(7445): 367-371.

Fernandez-Barredo S., C. Galiana, A. Garcia, M. T. Gomez-Munoz, S. Vega, M. A. Rodriguez-Iglesias and M. T. Perez-Gracia (2007). *Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs.* Can J Vet Res 71(3): 236-240.

Fernandez-Barredo S., C. Galiana, A. Garcia, S. Vega, M. T. Gomez and M. T. Perez-Gracia (2006). *Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction.* J Vet Diagn Invest 18(5): 462-465.

Fernandez-Cassi X., N. Timoneda, E. Gonzales-Gustavson, J. F. Abril, S. Bofill-Mas and R. Girones (2017). *A metagenomic assessment of viral contamination on fresh parsley plants irrigated with fecally tainted river water.* Int J Food Microbiol 257: 80-90.

Festa S., A. R. Garbuglia, F. Baccini, F. Panzuto, M. R. Capobianchi, I. Santino, F. Purchiaroni, G. Orgera, G. Delle Fave and M. Marignani (2014). *Acute fulminant hepatitis E virus genotype 3e infection: description of the first case in Europe.* Scand J Infect Dis 46(10): 727-731.

Feurer C., A. Le Roux, R. Rossel, E. Barnaud, M. Dumarest, P. Garry and N. Pavio (2018). *High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses.* Int J Food Microbiol 264: 25-30.

Fischer C., M. Hofmann, M. Danzer, K. Hofer, J. Kaar and C. Gabriel (2015). *Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria.* PLoS One 10(3): e0119576.

Fogeda M., A. Avellon, C. G. Cilla and J. M. Echevarria (2009). *Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain.* J Med Virol 81(10): 1743-1749.

Forgach P., N. Nowotny, K. Erdelyi, A. Boncz, J. Zentai, G. Szucs, G. Reuter and T. Bakonyi (2010). *Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary.* Vet Microbiol 143(2-4): 106-116.

Fourquet E., J. M. Mansuy, C. Bureau, C. Recher, J. P. Vinel, J. Izopet and J. M. Peron (2010). *Severe thrombocytopenia associated with acute autochthonous hepatitis E.* J Clin Virol 48(1): 73-74.

Franci. O, Maestrini. O, Casabianca. F and G. G (2000). Importanza delle razze suine locali per i prodotti tipici : caratterizzazzione della cinta senese e del suino corso per la produzione di carne di qualità. Environnement et identité en méditerrannée. , Université de Corse. 3**:** 145-152.

Galli C., L. Fomiatti, C. Tagliacarne, C. Velati, A. R. Zanetti, S. Castaldi and L. Romano (2017). *Seroprevalence of hepatitis E virus among blood donors in northern Italy (Sondrio, Lombardy) determined by three different assays.* Blood Transfus 15(6): 502-505.

Gallian P., A. Couchouron, I. Dupont, C. Fabra, Y. Piquet, R. Djoudi, A. Assal and P. Tiberghien (2017). *Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors.* Transfusion 57(1): 223-224.

Gallian P., S. Lhomme, Y. Piquet, K. Saune, F. Abravanel, A. Assal, P. Tiberghien and J. Izopet (2014). *Hepatitis E virus infections in blood donors, France.* Emerg Infect Dis 20(11): 1914-1917.

Garbuglia A. R., P. Scognamiglio, N. Petrosillo, C. M. Mastroianni, P. Sordillo, D. Gentile, P. La Scala, E. Girardi and M. R. Capobianchi (2013). *Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011.* Emerg Infect Dis 19(1): 110-114.

Garcia-Bocanegra I., A. Rivero, J. Caballero-Gomez, P. Lopez-Lopez, D. Cano-Terriza, M. Frias, S. Jimenez-Ruiz, M. A. Risalde, J. C. Gomez-Villamandos and A. Rivero-Juarez (2019). *Hepatitis E virus infection in equines in Spain.* Transbound Emerg Dis 66(1): 66-71.

Garkavenko O., A. Obriadina, J. Meng, D. A. Anderson, H. J. Benard, B. A. Schroeder, Y. E. Khudyakov, H. A. Fields and M. C. Croxson (2001). *Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand.* J Med Virol 65(3): 525-529.

Garson J. A., R. B. Ferns, P. R. Grant, S. Ijaz, E. Nastouli, R. Szypulska and R. S. Tedder (2012). *Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results.* J Virol Methods 186(1-2): 157-160.

Gauss A., J. J. Wenzel, C. Flechtenmacher, M. H. Navid, C. Eisenbach, W. Jilg, W. Stremmel and P. Schnitzler (2012). *Chronic hepatitis E virus infection in a patient with leukemia and elevated transaminases: a case report.* J Med Case Rep 6: 334.
Geng Y., H. Zhang, W. Huang, J. H. T, K. Geng, Z. Li and Y. Wang (2014). *Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia.* Hepat Mon 14(1): e15618.
Gerber P. F., D. W. Trampel, E. M. Willinghan, P. Billam, X. J. Meng and T. Opriessnig (2015). *Subclinical avian hepatitis E virus infection in layer flocks in the United States.* Vet J 206(3): 304-311.
Gerolami R., P. Borentain, F. Raissouni, A. Motte, C. Solas and P. Colson (2011). *Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin.* J Clin Virol 52(1): 60-62.
Gerolami R., V. Moal and P. Colson (2008). *Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient.* N Engl J Med 358(8): 859-860.
Giannini P., M. Jermini, L. Leggeri, M. Nuesch-Inderbinen and R. Stephan (2018). *Detection of Hepatitis E Virus RNA in Raw Cured Sausages and Raw Cured Sausages Containing Pig Liver at Retail Stores in Switzerland.* J Food Prot 81(1): 43-45.
GoogleMap (2019). Vue satellite de la Corse.
Grabarczyk P., E. Sulkowska, J. Gdowska, A. Kopacz, G. Liszewski, D. Kubicka-Russel, S. A. Baylis, V. M. Corman, E. Nocen, D. Piotrowski, J. Antoniewicz-Papis and M. Letowska (2018). *Molecular and serological infection marker screening in blood donors indicates high endemicity of hepatitis E virus in Poland.* Transfusion.
Graff J., H. Nguyen, C. Yu, W. R. Elkins, M. St Claire, R. H. Purcell and S. U. Emerson (2005). *The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques.* J Virol 79(11): 6680-6689.
Graff J., U. Torian, H. Nguyen and S. U. Emerson (2006). *A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus.* J Virol 80(12): 5919-5926.
Grierson S., J. Heaney, T. Cheney, D. Morgan, S. Wyllie, L. Powell, D. Smith, S. Ijaz, F. Steinbach, B. Choudhury and R. S. Tedder (2015). *Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Pigs at the Time of Slaughter, United Kingdom, 2013.* Emerging Infectious Diseases 21(8): 1396-1401.
Grierson S., A. Rabie, M. Lambert, B. Choudhury and R. P. Smith (2018). *HEV infection not evident in rodents on English pig farms.* Vet Rec 182(3): 81.
Grodzki M., J. Schaeffer, J. C. Piquet, J. C. Le Saux, J. Cheve, J. Ollivier, J. Le Pendu and F. S. Le Guyader (2014). *Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France.* Appl Environ Microbiol 80(14): 4269-4276.
Guillois Y., F. Abravanel, T. Miura, N. Pavio, V. Vaillant, S. Lhomme, F. S. Le Guyader, N. Rose, J. C. Le Saux, L. A. King, J. Izopet and E. Couturier (2016). *High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013.* Clin Infect Dis 62(3): 351-357.
Guinault D., D. Ribes, A. Delas, D. Milongo, F. Abravanel, B. Puissant-Lubrano, J. Izopet and N. Kamar (2016). *Hepatitis E Virus-Induced Cryoglobulinemic Glomerulonephritis in a Nonimmunocompromised Person.* Am J Kidney Dis 67(4): 660-663.
Gupta H., Y. K. Joshi, A. Varma, S. Shenoy, S. Sriramchari, B. Iyenger and B. N. Tandon (1990). *Transmission of enteric non-A, non-B hepatitis virus in Macaca mulatta monkeys by intraportal route: subsequent passages of HEV virus.* J Gastroenterol Hepatol 5(6): 608-615.
Haagsma E. B., A. Riezebos-Brilman, A. P. van den Berg, R. J. Porte and H. G. Niesters (2010). *Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b.* Liver Transpl 16(4): 474-477.
Hakze-van der Honing R. W., E. van Coillie, A. F. Antonis and W. H. van der Poel (2011). *First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium.* PLoS One 6(8): e22673.
Hammerschmidt F., K. Schwaiger, L. Dähnert, A. Vina-Rodriguez, D. Höper, M. Gareis, M. H. Groschup and M. Eiden (2017). *Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany.* Zoonoses and Public Health.

Haqshenas G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read and X. J. Meng (2001). *Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States.* J Gen Virol 82(Pt 10): 2449-2462.
Harritshoj L. H., D. K. Holm, S. G. Saekmose, B. A. Jensen, B. M. Hogema, T. K. Fischer, S. E. Midgley, J. S. Krog, C. Erikstrup and H. Ullum (2016). *Low transfusion transmission of hepatitis E among 25,637 single-donation, nucleic acid-tested blood donors.* Transfusion 56(9): 2225-2232.
Hartl J., B. Otto, R. G. Madden, G. Webb, K. L. Woolson, L. Kriston, E. Vettorazzi, A. W. Lohse, H. R. Dalton and S. Pischke (2016). *Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis.* Viruses 8(8).
Heil J., C. Hoebe, I. Loo, J. W. L. Cals, G. van Liere and N. Dukers-Muijrers (2018). *Hepatitis E prevalence in a sexual high-risk population compared to the general population.* PLoS One 13(1): e0191798.
Hewitt J., D. Harte, M. Sutherland, D. Croucher, L. Fouche, P. Flanagan and D. Williamson (2018). *Prevalence of hepatitis E virus antibodies and infection in New Zealand blood donors.* N Z Med J 131(1469): 38-43.
Hewitt P. E., S. Ijaz, S. R. Brailsford, R. Brett, S. Dicks, B. Haywood, I. T. R. Kennedy, A. Kitchen, P. Patel, J. Poh, K. Russell, K. I. Tettmar, J. Tossell, I. Ushiro-Lumb and R. S. Tedder (2014). *Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England.* Lancet (London, England) 384(9956): 1766-1773.
Himmelsbach K., D. Bender and E. Hildt (2018). *Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus.* Emerg Microbes Infect 7(1): 196.
Hirano M., X. Ding, T. C. Li, N. Takeda, H. Kawabata, N. Koizumi, T. Kadosaka, I. Goto, T. Masuzawa, M. Nakamura, K. Taira, T. Kuroki, T. Tanikawa, H. Watanabe and K. Abe (2003). *Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan.* Hepatol Res 27(1): 1-5.
HKU Li Ka Shing Faculty of Medicine. (2018). *HKU discovers that rat hepatitis E virus can cause hepatitis in humans.* News & Events, from https://www.med.hku.hk/news/press/HKU_discovers_that_rat_hepatitis_E_virus_can_cause_hepatitis_in_humans.
Hoad V. C., T. Gibbs, M. Ravikumara, M. Nash, A. Levy, S. L. Tracy, C. Mews, Z. Perkowska-Guse, H. M. Faddy and S. Bowden (2017a). *First confirmed case of transfusion-transmitted hepatitis E in Australia.* Med J Aust 206(7): 289-290.
Hoad V. C., C. R. Seed, J. J. Fryk, R. Harley, R. L. P. Flower, B. M. Hogema, P. Kiely and H. M. Faddy (2017b). *Hepatitis E virus RNA in Australian blood donors: prevalence and risk assessment.* Vox Sang.
Hogema B. M., M. Molier, M. Sjerps, M. de Waal, P. van Swieten, T. van de Laar, M. Molenaar-de Backer and H. L. Zaaijer (2016). *Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors.* Transfusion 56(3): 722-728.
Holla P., I. Ahmad, Z. Ahmed and S. Jameel (2015). *Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway.* Traffic 16(4): 398-416.
Holla R. P., I. Ahmad, Z. Ahmad and S. Jameel (2013). *Molecular virology of hepatitis E virus.* Semin Liver Dis 33(1): 3-14.
Holm D. K., B. K. Moessner, R. E. Engle, H. L. Zaaijer, J. Georgsen, R. H. Purcell and P. B. Christensen (2015). *Declining prevalence of hepatitis E antibodies among Danish blood donors.* Transfusion 55(7): 1662-1667.
Holtz L. R., K. M. Wylie, E. Sodergren, Y. Jiang, C. J. Franz, G. M. Weinstock, G. A. Storch and D. Wang (2011). *Astrovirus MLB2 viremia in febrile child.* Emerg Infect Dis 17(11): 2050-2052.
Hoofnagle J. H., K. E. Nelson and R. H. Purcell (2012). *Hepatitis E.* N Engl J Med 367(13): 1237-1244.
Horvatits T., J. Schulze Zur Wiesch, M. Lutgehetmann, A. W. Lohse and S. Pischke (2019). *The Clinical Perspective on Hepatitis E.* Viruses 11(7).
Huang C. C., D. Nguyen, J. Fernandez, K. Y. Yun, K. E. Fry, D. W. Bradley, A. W. Tam and G. R. Reyes (1992). *Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV).* Virology 191(2): 550-558.

Huang F., Y. Li, W. Yu, S. Jing, J. Wang, F. Long, Z. He, C. Yang, Y. Bi, W. Cao, C. Liu, X. Hua and Q. Pan (2016). *Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis.* Hepatology 64(2): 350-359.
Huang F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth and X. J. Meng (2002a). *Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States.* J Clin Microbiol 40(4): 1326-1332.
Huang F. F., G. Haqshenas, H. L. Shivaprasad, D. K. Guenette, P. R. Woolcock, C. T. Larsen, F. W. Pierson, F. Elvinger, T. E. Toth and X. J. Meng (2002b). *Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States.* J Clin Microbiol 40(11): 4197-4202.
Huang S., X. Zhang, H. Jiang, Q. Yan, X. Ai, Y. Wang, J. Cai, L. Jiang, T. Wu, Z. Wang, L. Guan, J. W. Shih, M. H. Ng, F. Zhu, J. Zhang and N. Xia (2010). *Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E.* PLoS One 5(10): e13560.
Iaconelli M., G. Purpari, S. Della Libera, S. Petricca, A. Guercio, A. R. Ciccaglione, R. Bruni, S. Taffon, M. Equestre, M. Fratini, M. Muscillo and G. La Rosa (2015a). *Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy.* Food Environ Virol 7(4): 316-324.
Iaconelli M., G. Purpari, S. Della Libera, S. Petricca, A. Guercio, A. R. Ciccaglione, R. Bruni, S. Taffon, M. Equestre, M. Fratini, M. Muscillo and G. La Rosa (2015b). *Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy.* Food and Environmental Virology 7(4): 316-324.
ICTV I. C. o. T. o. V. (2019). *Genus: Kobuvirus.* from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/686/genus-kobuvirus.
Ijaz S., R. Szypulska, K. I. Tettmar, A. Kitchen and R. S. Tedder (2012). *Detection of hepatitis E virus RNA in plasma mini-pools from blood donors in England.* Vox Sang 102(3): 272.
INSEE. (2018). *Bilan annuel du tourisme - 2017 - Insee Dossier Corse - 9.* from https://www.insee.fr/fr/statistiques/3545896

files/28/3545896.html.
INSEE. (2019). *Estimation de la population corse en 2019.* from https://www.insee.fr/fr/statistiques/1893198.
Irshad M. (1999). *Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics.* . Intervirology.
Ishida S., K. Matsuura, S. Yoshizumi, M. Miyoshi, T. Sugisawa, M. Tanida and M. Okano (2018). *Hepatitis E outbreak at a nursing home for aged people in Hokkaido, Japan, between February and March 2016.* J Clin Virol 101: 23-28.
Ivanova A., V. Tefanova, I. Reshetnjak, T. Kuznetsova, J. Geller, A. Lundkvist, M. Janson, K. Neare, K. Velstrom, P. Jokelainen, B. Lassen, P. Hutt, T. Saar, A. Viltrop and I. Golovljova (2015). *Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia.* Food Environ Virol 7(4): 403-412.
Izopet J., M. Dubois, S. Bertagnoli, S. Lhomme, S. Marchandeau, S. Boucher, N. Kamar, F. Abravanel and J.-L. Guérin (2012). *Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France.* Emerging Infectious Diseases 18(8): 1274-1281.
Izopet J., A. B. Labrique, B. Basnyat, H. R. Dalton, B. Kmush, C. D. Heaney, K. E. Nelson, Z. B. Ahmed, K. Zaman, J. M. Mansuy, R. Bendall, K. Saune, N. Kamar, A. Arjyal, A. Karkey, S. Dongol, K. G. Prajapati and D. Adhikary (2015). *Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France.* J Clin Virol 70: 39-42.
Izopet J., S. Lhomme, S. Chapuy-Regaud, J. M. Mansuy, N. Kamar and F. Abravanel (2017). *HEV and transfusion-recipient risk.* Transfus Clin Biol.
Jack A. D., A. J. Hall, N. Maine, M. Mendy and H. C. Whittle (1999). *What level of hepatitis B antibody is protective?* J Infect Dis 179(2): 489-492.
Jagjit Singh G. K., S. Ijaz, N. Rockwood, S. P. Farnworth, E. Devitt, M. Atkins, R. Tedder and M. Nelson (2013). *Chronic Hepatitis E as a cause for cryptogenic cirrhosis in HIV.* J Infect 66(1): 103-106.

Jaiswal S. P., A. K. Jain, G. Naik, N. Soni and D. S. Chitnis (2001). *Viral hepatitis during pregnancy.* Int J Gynaecol Obstet 72(2): 103-108.
Jameel S., M. Zafrullah, M. H. Ozdener and S. K. Panda (1996). *Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins.* J Virol 70(1): 207-216.
Jeblaoui A., S. Haim-Boukobza, E. Marchadier, C. Mokhtari and A. M. Roque-Afonso (2013). *Genotype 4 hepatitis e virus in france: an autochthonous infection with a more severe presentation.* Clin Infect Dis 57(4): e122-126.
Jemersic L., J. Prpic, D. Brnic, T. Keros, N. Pandak and O. Dakovic Rode (2019). *Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017.* BMC Infect Dis 19(1): 269.
Jemielity S., J. J. Wang, Y. K. Chan, A. A. Ahmed, W. Li, S. Monahan, X. Bu, M. Farzan, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff and H. Choe (2013). *TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine.* PLoS Pathog 9(3): e1003232.
Jilani N., B. C. Das, S. A. Husain, U. K. Baweja, D. Chattopadhya, R. K. Gupta, S. Sardana and P. Kar (2007). *Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy.* J Gastroenterol Hepatol 22(5): 676-682.
Jimenez de Oya N., I. de Blas, A. B. Blazquez, M. A. Martin-Acebes, N. Halaihel, O. Girones, J. C. Saiz and E. Escribano-Romero (2011). *Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds.* BMC Res Notes 4: 412.
Johnson C., V. Hargest, V. Cortez, V. A. Meliopoulos and S. Schultz-Cherry (2017). *Astrovirus Pathogenesis.* Viruses 9(1).
Jori F., M. Laval, O. Maestrini, F. Casabianca, F. Charrier and N. Pavio (2016). *Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France.* Viruses 8(8).
Kalia M., V. Chandra, S. A. Rahman, D. Sehgal and S. Jameel (2009). *Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection.* J Virol 83(24): 12714-12724.
Kamar N., F. Abravanel, C. Garrouste, I. Cardeau-Desangles, J. M. Mansuy, H. Weclawiak, J. Izopet and L. Rostaing (2010a). *Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient.* Nephrol Dial Transplant 25(8): 2792-2795.
Kamar N., F. Abravanel, S. Lhomme, L. Rostaing and J. Izopet (2015a). *Hepatitis E virus: chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment.* Clin Res Hepatol Gastroenterol 39(1): 20-27.
Kamar N., F. Abravanel, J. Selves, C. Garrouste, L. Esposito, L. Lavayssiere, O. Cointault, D. Ribes, I. Cardeau, M. B. Nogier, J. M. Mansuy, F. Muscari, J. M. Peron, J. Izopet and L. Rostaing (2010b). *Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation.* Transplantation 89(3): 353-360.
Kamar N., R. Bendall, F. Legrand-Abravanel, N. Xia, S. Ijaz, J. Izopet and H. Dalton (2012a). *Hepatitis E.* The Lancet 379(9835): 2477-2488.
Kamar N., R. Bendall, F. Legrand-Abravanel, N. S. Xia, S. Ijaz, J. Izopet and H. R. Dalton (2012b). *Hepatitis E.* Lancet 379(9835): 2477-2488.
Kamar N., H. R. Dalton, F. Abravanel and J. Izopet (2014a). *Hepatitis E virus infection.* Clin Microbiol Rev 27(1): 116-138.
Kamar N., C. Garrouste, E. B. Haagsma, V. Garrigue, S. Pischke, C. Chauvet, J. Dumortier, A. Cannesson, E. Cassuto-Viguier, E. Thervet, F. Conti, P. Lebray, H. R. Dalton, R. Santella, N. Kanaan, M. Essig, C. Mousson, S. Radenne, A. M. Roque-Afonso, J. Izopet and L. Rostaing (2011). *Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants.* Gastroenterology 140(5): 1481-1489.
Kamar N., J. Izopet, P. Cintas, C. Garrouste, E. Uro-Coste, O. Cointault and L. Rostaing (2010c). *Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis.* Am J Transplant 10(5): 1321-1324.
Kamar N., J. Izopet, N. Pavio, R. Aggarwal, A. Labrique, H. Wedemeyer and H. R. Dalton (2017). *Hepatitis E virus infection.* Nat Rev Dis Primers 3: 17086.

Kamar N., J. Izopet, S. Tripon, M. Bismuth, S. Hillaire, J. Dumortier, S. Radenne, A. Coilly, V. Garrigue, L. D'Alteroche, M. Buchler, L. Couzi, P. Lebray, S. Dharancy, A. Minello, M. Hourmant, A. M. Roque-Afonso, F. Abravanel, S. Pol, L. Rostaing and V. Mallet (2014b). *Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients.* N Engl J Med 370(12): 1111-1120.

Kamar N., S. Lhomme, F. Abravanel, O. Cointault, L. Esposito, I. Cardeau-Desangles, A. Del Bello, G. Dorr, L. Lavayssiere, M. B. Nogier, J. Guitard, D. Ribes, A. L. Goin, P. Broue, D. Metsu, K. Saune, L. Rostaing and J. Izopet (2015b). *An Early Viral Response Predicts the Virological Response to Ribavirin in Hepatitis E Virus Organ Transplant Patients.* Transplantation 99(10): 2124-2131.

Kamar N., O. Marion, F. Abravanel, J. Izopet and H. R. Dalton (2016). *Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus.* Liver Int 36(4): 467-472.

Kamar N., L. Rostaing, F. Abravanel, C. Garrouste, L. Esposito, I. Cardeau-Desangles, J. M. Mansuy, J. Selves, J. M. Peron, P. Otal, F. Muscari and J. Izopet (2010d). *Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation.* Clin Infect Dis 50(5): e30-33.

Kamar N., J. Selves, J.-M. Mansuy, L. Ouezzani, J.-M. Péron, J. Guitard, O. Cointault, L. Esposito, F. Abravanel, M. Danjoux, D. Durand, J.-P. Vinel, J. Izopet and L. Rostaing (2008a). *Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients.* N Engl J Med 358(8): 811-817.

Kamar N., J. Selves, J. M. Mansuy, L. Ouezzani, J. M. Peron, J. Guitard, O. Cointault, L. Esposito, F. Abravanel, M. Danjoux, D. Durand, J. P. Vinel, J. Izopet and L. Rostaing (2008b). *Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients.* N Engl J Med 358(8): 811-817.

Kanai Y., S. Miyasaka, S. Uyama, S. Kawami, Y. Kato-Mori, M. Tsujikawa, M. Yunoki, S. Nishiyama, K. Ikuta and K. Hagiwara (2012). *Hepatitis E virus in Norway rats (Rattus norvegicus) captured around a pig farm.* BMC Res Notes 5: 4.

Kantala T., M. Heinonen, S. Oristo, C. H. von Bonsdorff and L. Maunula (2015). *Hepatitis E virus in young pigs in Finland and characterization of the isolated partial genomic sequences of genotype 3 HEV.* Foodborne Pathog Dis 12(3): 253-260.

Kantala T., P. M. Kinnunen, S. Oristo, P. Jokelainen, O. Vapalahti and L. Maunula (2017). *Hepatitis E Virus Antibodies in Finnish Veterinarians.* Zoonoses Public Health 64(3): 232-238.

Kantala T., S. Oristo, M. Heinonen, C. H. von Bonsdorff and L. Maunula (2013). *A longitudinal study revealing hepatitis E virus infection and transmission at a swine test station.* Res Vet Sci 95(3): 1255-1261.

Kapur N., D. Thakral, H. Durgapal and S. K. Panda (2012). *Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis.* J Viral Hepat 19(6): 436-448.

Kaur M., K. C. Hyams, M. A. Purdy, K. Krawczynski, W. M. Ching, K. E. Fry, G. R. Reyes, D. W. Bradley and M. Carl (1992). *Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase.* Proc Natl Acad Sci U S A 89(9): 3855-3858.

Keane F., M. Gompels, R. Bendall, R. Drayton, L. Jennings, J. Black, G. Baragwanath, N. Lin, W. Henley, S. L. Ngui, S. Ijaz and H. Dalton (2012). *Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection.* HIV Med 13(1): 83-88.

Khamrin P., N. Maneekarn, S. Okitsu and H. Ushijima (2014). *Epidemiology of human and animal kobuviruses.* Virusdisease 25(2): 195-200.

Khuroo M. S. (1980). *Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type.* Am J Med 68(6): 818-824.

Khuroo M. S. (2011). *Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane.* Virus Research 161(1): 3-14.

Khuroo M. S., S. Kamili, M. Y. Dar, R. Moecklii and S. Jameel (1993). *Hepatitis E and long-term antibody status.* Lancet (London, England) 341(8856): 1355.

Khuroo M. S., S. Kamili and M. S. Khuroo (2009). *Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers.* J Viral Hepat 16(7): 519-523.

Khuroo M. S., S. Kamili and G. N. Yattoo (2004). *Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area.* J Gastroenterol Hepatol 19(7): 778-784.

Kim D. S., K. Y. Son, K. M. Koo, J. Y. Kim, M. M. Alfajaro, J. G. Park, M. Hosmillo, M. Soliman, Y. B. Baek, E. H. Cho, J. H. Lee, M. I. Kang, I. Goodfellow and K. O. Cho (2016). *Porcine Sapelovirus Uses alpha2,3-Linked Sialic Acid on GD1a Ganglioside as a Receptor.* J Virol 90(8): 4067-4077.
Klobasa F. and J. E. Butler (1987). *Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers.* Am J Vet Res 48(2): 176-182.
Kokkinos P., I. Kozyra, S. Lazic, M. Bouwknegt, S. Rutjes, K. Willems, R. Moloney, A. M. de Roda Husman, A. Kaupke, E. Legaki, M. D'Agostino, N. Cook, A. Rzezutka, T. Petrovic and A. Vantarakis (2012). *Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries.* Food Environ Virol 4(4): 179-191.
Kokkinos P., I. Kozyra, S. Lazic, K. Soderberg, P. Vasickova, M. Bouwknegt, S. Rutjes, K. Willems, R. Moloney, A. M. de Roda Husman, A. Kaupke, E. Legaki, M. D'Agostino, N. Cook, C. H. von Bonsdorff, A. Rzezutka, T. Petrovic, L. Maunula, I. Pavlik and A. Vantarakis (2017a). *Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains.* Food Environ Virol 9(1): 72-78.
Kokkinos P., I. Kozyra, S. Lazic, K. Soderberg, P. Vasickova, M. Bouwknegt, S. Rutjes, K. Willems, R. Moloney, A. M. de Roda Husman, A. Kaupke, E. Legaki, M. D'Agostino, N. Cook, C. H. von Bonsdorff, A. Rzezutka, T. Petrovic, L. Maunula, I. Pavlik and A. Vantarakis (2017b). *Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains.* Food and Environmental Virology 9(1): 72-78.
Koonin E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes and D. W. Bradley (1992). *Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses.* Proc Natl Acad Sci U S A 89(17): 8259-8263.
Koot H., B. M. Hogema, M. Koot, M. Molier and H. L. Zaaijer (2015). *Frequent hepatitis E in the Netherlands without traveling or immunosuppression.* J Clin Virol 62: 38-40.
Krawczynski K., X. J. Meng and J. Rybczynska (2011). *Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection.* Virus Res 161(1): 78-83.
Krumbholz A., M. Dauber, A. Henke, E. Birch-Hirschfeld, N. J. Knowles, A. Stelzner and R. Zell (2002). *Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups.* J Virol 76(11): 5813-5821.
Krumbholz A., S. Joel, P. Dremsek, A. Neubert, R. Johne, R. Durrwald, M. Walther, T. H. Muller, D. Kuhnel, J. Lange, P. Wutzler, A. Sauerbrei, R. G. Ulrich and R. Zell (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany.* Med Microbiol Immunol 203(4): 273-282.
Krumbholz A., S. Joel, A. Neubert, P. Dremsek, R. Durrwald, R. Johne, A. Hlinak, M. Walther, J. Lange, P. Wutzler, A. Sauerbrei, R. G. Ulrich and R. Zell (2013). *Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany.* Vet Microbiol 167(3-4): 394-402.
Kubankova M., P. Kralik, J. Lamka, V. Zakovcik, M. Dolansky and P. Vasickova (2015). *Prevalence of Hepatitis E Virus in Populations of Wild Animals in Comparison with Animals Bred in Game Enclosures.* Food Environ Virol.
Kukielka D., V. Rodriguez-Prieto, J. Vicente and J. M. Sanchez-Vizcaino (2016). *Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission.* Transbound Emerg Dis 63(5): e360-368.
Kumar A., M. Beniwal, P. Kar, J. B. Sharma and N. S. Murthy (2004). *Hepatitis E in pregnancy.* Int J Gynaecol Obstet 85(3): 240-244.
Kumar S., S. K. Pujhari, Y. K. Chawla, A. Chakraborti and R. K. Ratho (2011). *Molecular detection and sequence analysis of hepatitis E virus in patients with viral hepatitis from North India.* Diagn Microbiol Infect Dis 71(2): 110-117.
Kuniholm M. H., R. H. Purcell, G. M. McQuillan, R. E. Engle, A. Wasley and K. E. Nelson (2009). *Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.* J Infect Dis 200(1): 48-56.

Kuznetsova T. V., A. Ivanova-Pozdejeva, I. Reshetnjak, J. Geller, K. Varv, R. Rumvolt, M. Vikentjeva, E. V. Trubnikova, N. V. Pozdniakova, A. B. Shevelev and I. Golovljova (2018). *Hepatitis E virus infection in different groups of Estonian patients and people who inject drugs.* J Clin Virol 104: 5-10.
La Rosa G., M. Muscillo, V. S. Vennarucci, A. R. Garbuglia, P. La Scala and M. R. Capobianchi (2011). *Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases.* J Gen Virol 92(Pt 7): 1617-1626.
Lachish T., O. Erez, N. Daudi, D. Shouval and E. Schwartz (2015). *Acute hepatitis E virus in pregnant women in Israel and in other industrialized countries.* J Clin Virol 73: 20-24.
Lack J. B., K. Volk and R. A. Van Den Bussche (2012). *Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States.* Emerg Infect Dis 18(8): 1268-1273.
Lan D., W. Ji, S. Yang, L. Cui, Z. Yang, C. Yuan and X. Hua (2011). *Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain.* Arch Virol 156(9): 1567-1574.
Lange H., J. Overbo, K. Borgen, S. Dudman, G. Hoddevik, A. M. Urdahl, L. Vold and S. K. Sjurseth (2017). *Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine.* Epidemiol Infect 145(1): 181-186.
Lapa D., M. R. Capobianchi and A. R. Garbuglia (2015). *Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries.* Int J Mol Sci 16(10): 25711-25743.
Legrand-Abravanel F., N. Kamar, K. Sandres-Saune, C. Garrouste, M. Dubois, J. M. Mansuy, F. Muscari, F. Sallusto, L. Rostaing and J. Izopet (2010). *Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France.* J Infect Dis 202(6): 835-844.
Lenggenhager D., J. Gouttenoire, M. Malehmir, M. Bawohl, H. Honcharova-Biletska, S. Kreutzer, D. Semela, J. Neuweiler, S. Hurlimann, P. Aepli, M. Fraga, R. Sahli, L. Terracciano, L. Rubbia-Brandt, B. Mullhaupt, C. Sempoux, D. Moradpour and A. Weber (2017). *Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver.* J Hepatol 67(3): 471-479.
Lhomme S., F. Abravanel, M. Dubois, S. Chapuy-Regaud, K. Sandres-Saune, J. M. Mansuy, L. Rostaing, N. Kamar and J. Izopet (2015). *Temporal evolution of the distribution of hepatitis E virus genotypes in Southwestern France.* Infect Genet Evol 35: 50-55.
Lhomme S., M. Dubois, F. Abravanel, S. Top, S. Bertagnoli, J. L. Guerin and J. Izopet (2013). *Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits.* J Clin Virol 58(2): 357-362.
Lhomme S., O. Marion, F. Abravanel, S. Chapuy-Regaud, N. Kamar and J. Izopet (2016). *Hepatitis E Pathogenesis.* Viruses 8(8).
Li S. W., Q. Zhao, T. Wu, S. Chen, J. Zhang and N. S. Xia (2015). *The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239.* Hum Vaccin Immunother 11(4): 908-914.
Li T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda and T. Miyamura (2005). *Hepatitis E virus transmission from wild boar meat.* Emerg Infect Dis 11(12): 1958-1960.
Li T. C., T. Miyamura and N. Takeda (2007). *Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (Corbicula japonica) in Japan.* Am J Trop Med Hyg 76(1): 170-172.
Li T. C., S. Yoshizaki, X. Zhou, H. Sentsui, K. Shirato, S. Matsuyama, S. K. Melaku, B. Bazartseren, N. Takeda and T. Wakita (2017). *Serological evidence of hepatitis E virus infection in dromedary camels in Ethiopia.* J Virol Methods 246: 34-37.
Liang H., J. Chen, J. Xie, L. Sun, F. Ji, S. He, Y. Zheng, C. Liang, G. Zhang, S. Su and S. Li (2014). *Hepatitis E virus serosurvey among pet dogs and cats in several developed cities in China.* PLoS One 9(6): e98068.
Lindemann M. L., G. Gabilondo, B. Romero, O. M. de la Maza and M. T. Perez-Gracia (2010). *Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain.* J Med Virol 82(10): 1666-1668.
Lipej Z., D. Novosel, L. Vojta, B. Roic, M. Simpraga and A. Vojta (2013). *Detection and characterisation of hepatitis E virus in naturally infected swine in Croatia.* Acta Vet Hung 61(4): 517-528.
Long F., W. Yu, C. Yang, J. Wang, Y. Li, Y. Li and F. Huang (2017a). *High prevalence of hepatitis E virus infection in goats.* J Med Virol 89(11): 1981-1987.
Long F., W. Yu, C. Yang, J. Wang, Y. Li, Y. Li and F. Huang (2017b). *High prevalence of Hepatitis E virus infection in goats.* J Med Virol.

Lopez-Lopez P., M. L. A. Risalde, M. Frias, I. Garcia-Bocanegra, T. Brieva, J. Caballero-Gomez, A. Camacho, V. Fernandez-Molera, I. Machuca, J. C. Gomez-Villamandos, A. Rivero and A. Rivero-Juarez (2018). *Risk factors associated with hepatitis E virus in pigs from different production systems.* Vet Microbiol 224: 88-92.

Lucarelli C., E. Spada, G. Taliani, P. Chionne, E. Madonna, C. Marcantonio, P. Pezzotti, R. Bruni, G. La Rosa, G. Pisani, L. Dell'Orso, K. Ragone, C. Tomei and A. R. Ciccaglione (2016). *High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014.* Euro Surveill 21(30).

Machnowska P., L. Ellerbroek and R. Johne (2014). *Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany.* Vet Microbiol 168(1): 60-68.

Mansuy J. M., R. Bendall, F. Legrand-Abravanel, K. Saune, M. Miedouge, V. Ellis, H. Rech, F. Destruel, N. Kamar, H. R. Dalton and J. Izopet (2011). *Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France.* Emerg Infect Dis 17(12): 2309-2312.

Mansuy J. M., P. Gallian, C. Dimeglio, K. Saune, C. Arnaud, B. Pelletier, P. Morel, D. Legrand, P. Tiberghien and J. Izopet (2016). *A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors.* Hepatology 63(4): 1145-1154.

Mansuy J. M., A. Huynh, F. Abravanel, C. Recher, J. M. Peron and J. Izopet (2009a). *Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward.* Clin Infect Dis 48(3): 373-374.

Mansuy J. M., C. Mengelle, M. Miedouge, F. Abravanel and J. Izopet (2009b). *Viral hepatitis E.* Arch Pediatr 16(6): 717-720.

Mansuy J. M., K. Saune, H. Rech, F. Abravanel, C. Mengelle, S. L Homme, F. Destruel, N. Kamar and J. Izopet (2015a). *Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011.* Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin 20(19): 27-34.

Mansuy J. M., K. Saune, H. Rech, F. Abravanel, C. Mengelle, L. H. S, F. Destruel, N. Kamar and J. Izopet (2015b). *Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011.* Euro Surveill 20(19): 27-34.

Marcantonio C., P. Pezzotti, R. Bruni, G. Taliani, P. Chionne, E. Madonna, U. Villano, G. Pisani, M. Equestre, L. Dell'Orso, K. Ragone, A. R. Ciccaglione and E. Spada (2019). *Incidence of hepatitis E virus infection among blood donors in a high endemic area of Central Italy.* J Viral Hepat 26(4): 506-512.

Marion O., N. Capelli, S. Lhomme, M. Dubois, M. Pucelle, F. Abravanel, N. Kamar and J. Izopet (2019). *Hepatitis E virus genotype 3 and capsid protein in the blood and urine of immunocompromised patients.* J Infect 78(3): 232-240.

Martelli F., A. Caprioli, M. Zengarini, A. Marata, C. Fiegna, I. Di Bartolo, F. M. Ruggeri, M. Delogu and F. Ostanello (2008). *Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (Sus scrofa scrofa) population in Italy.* Vet Microbiol 126(1-3): 74-81.

Martinelli N., E. Pavoni, D. Filogari, N. Ferrari, M. Chiari, E. Canelli and G. Lombardi (2015). *Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy.* Transbound Emerg Dis 62(2): 217-222.

Masia G., G. Orru, M. Liciardi, G. Desogus, R. C. Coppola, V. Murru and M. Argiolas (2009). *Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy.* J Prev Med Hyg 50(4): 227-231.

Matczuk A. K., K. Cwiek and A. Wieliczko (2019). *Avian hepatitis E virus is widespread among chickens in Poland and belongs to genotype 2.* Arch Virol 164(2): 595-599.

Mateos-Lindemann M. L., M. Diez-Aguilar, A. Gonzalez-Galdamez, J. Graus-Morales, A. Moreno-Zamora and M. T. Perez-Gracia (2013). *[Acute, chronic and fulminant hepatitisE: seven years of experience (2004-2011)].* Enferm Infecc Microbiol Clin 31(9): 595-598.

Mateos Lindemann M. L., J. G. Morales, S. Fernandez-Barredo, M. R. Dominguez, F. Garcia de la Hoz, P. Halfon and M. T. Perez Gracia (2010). *Fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication.* Am J Trop Med Hyg 82(1): 12-15.

Mateos M. L., A. Molina, J. L. Patier and V. Moreira (2005). *[Sporadic hepatitis E in Spain: study of 9 autochthonous and 3 imported cases].* Med Clin (Barc) 125(3): 118-119.

Matsubayashi K., J. H. Kang, H. Sakata, K. Takahashi, M. Shindo, M. Kato, S. Sato, T. Kato, H. Nishimori, K. Tsuji, H. Maguchi, J. Yoshida, H. Maekubo, S. Mishiro and H. Ikeda (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(7): 1368-1375.

Maunula L., A. Kaupke, P. Vasickova, K. Soderberg, I. Kozyra, S. Lazic, W. H. van der Poel, M. Bouwknegt, S. Rutjes, K. A. Willems, R. Moloney, M. D'Agostino, A. M. de Roda Husman, C. H. von Bonsdorff, A. Rzezutka, I. Pavlik, T. Petrovic and N. Cook (2013). *Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain.* Int J Food Microbiol 167(2): 177-185.

Mazzei M., R. Nardini, R. Verin, M. Forzan, A. Poli and F. Tolari (2015). *Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in wild boar (Sus scrofa) in Central Italy.* New Microbes New Infect 7: 41-47.

McCaustland K. A., K. Krawczynski, J. W. Ebert, M. S. Balayan, A. G. Andjaparidze, J. E. Spelbring, E. H. Cook, C. Humphrey, P. O. Yarbough, M. O. Favorov, D. Carson, D. W. Bradley and B. H. Robertson (2000). *Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis.* Arch Virol 145(9): 1909-1918.

McCreary C., F. Martelli, S. Grierson, F. Ostanello, A. Nevel and M. Banks (2008). *Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom.* Vet Rec 163(9): 261-265.

McElroy A., R. Hiraide, N. Bexfield, H. Jalal, J. Brownlie, I. Goodfellow and S. L. Caddy (2015). *Detection of Hepatitis E Virus Antibodies in Dogs in the United Kingdom.* PLoS One 10(6): e0128703.

Medrano C., M. Boadella, H. Barrios, A. Cantu, Z. Garcia, J. de la Fuente and C. Gortazar (2012). *Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004-2009.* Emerg Infect Dis 18(8): 1372-1374.

Meng X. J. and P. G. Halbur (2006). Swine hepatitis E virus. Diseases of Swine. . S. D'Allaire, Taylor, D. . Iowa, 438USA, Blackwell Publishing**:** 537-545.

Meng X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker and S. U. Emerson (1997). *A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus.* Proc Natl Acad Sci U S A 94(18): 9860-9865.

Meng X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson and R. H. Purcell (2002). *Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries.* J Clin Microbiol 40(1): 117-122.

Mesquita J. R., D. Oliveira, E. Rivadulla, J. Abreu-Silva, M. F. Varela, J. L. Romalde and M. S. Nascimento (2016). *Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (Mytilus galloprovinciallis), Spain.* Food Microbiol 58: 13-15.

Michitaka K., K. Takahashi, S. Furukawa, G. Inoue, Y. Hiasa, N. Horiike, M. Onji, N. Abe and S. Mishiro (2007). *Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan.* Hepatol Res 37(3): 214-220.

Minagi T., H. Okamoto, M. Ikegawa, S. Ideno, K. Takahashi, K. Sakai, K. Hagiwara, M. Yunoki and A. Wakisaka (2016). *Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan.* Vox Sang 111(3): 242-246.

Mitsui T., Y. Tsukamoto, C. Yamazaki, K. Masuko, F. Tsuda, M. Takahashi, T. Nishizawa and H. Okamoto (2004). *Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion.* J Med Virol 74(4): 563-572.

Modiyinji A. F., M. Amougou Atsama, G. Monamele Chavely, M. Nola and R. Njouom (2019). *Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon.* J Med Primatol.

Monini M., I. Di Bartolo, G. Ianiro, G. Angeloni, C. F. Magistrali, F. Ostanello and F. M. Ruggeri (2015). *Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds.* Arch Virol 160(10): 2547-2556.

Monroe S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans and R. I. Glass (1993). *Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses.* J Virol 67(6): 3611-3614.

Montalvo Villalba M. C., D. Cruz Martinez, I. Ahmad, L. A. Rodriguez Lay, M. Bello Corredor, C. Guevara March, L. S. Martinez, L. S. Martinez-Campo and S. Jameel (2017). *Hepatitis E virus in bottlenose dolphins Tursiops truncatus.* Dis Aquat Organ 123(1): 13-18.
Montella F., G. Rezza, F. Di Sora, P. Pezzotti and O. Recchia (1994). *Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men.* Lancet 344(8934): 1433.
Montpellier C., C. Wychowski, I. M. Sayed, J. C. Meunier, J. M. Saliou, M. Ankavay, A. Bull, A. Pillez, F. Abravanel, F. Helle, E. Brochot, H. Drobecq, R. Farhat, C. M. Aliouat-Denis, J. G. Haddad, J. Izopet, P. Meuleman, A. Goffard, J. Dubuisson and L. Cocquerel (2018). *Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein.* Gastroenterology 154(1): 211-223 e218.
Mooij S. H., B. M. Hogema, A. D. Tulen, W. van Pelt, E. Franz, H. L. Zaaijer, M. Molier and A. Hofhuis (2018). *Risk factors for hepatitis E virus seropositivity in Dutch blood donors.* BMC Infect Dis 18(1): 173.
Moon H. W., B. W. Lee, H. W. Sung, B. I. Yoon and H. M. Kwon (2016). *Identification and characterization of avian hepatitis E virus genotype 2 from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in Korea.* Virus Genes 52(5): 738-742.
Moor D., M. Liniger, A. Baumgartner and R. Felleisen (2018). *Screening of Ready-to-Eat Meat Products for Hepatitis E Virus in Switzerland.* Food Environ Virol.
Muller A., L. Collineau, R. Stephan, A. Muller and K. D. Stark (2017). *Assessment of the risk of foodborne transmission and burden of hepatitis E in Switzerland.* Int J Food Microbiol 242: 107-115.
Murali A. R., V. Kotwal and S. Chawla (2015). *Chronic hepatitis E: A brief review.* World J Hepatol 7(19): 2194-2201.
Murphy E. G., N. J. Williams, D. Jennings, J. Chantrey, R. Verin, S. Grierson, L. M. McElhinney and M. Bennett (2019). *First detection of Hepatitis E virus (Orthohepevirus C) in wild brown rats (Rattus norvegicus) from Great Britain.* Zoonoses Public Health.
Nagashima S., S. Jirintai, M. Takahashi, T. Kobayashi, Tanggis, T. Nishizawa, T. Kouki, T. Yashiro and H. Okamoto (2014). *Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies.* J Gen Virol 95(Pt 10): 2166-2175.
Nagashima S., M. Takahashi, S. Jirintai, T. Tanaka, T. Nishizawa, J. Yasuda and H. Okamoto (2011). *Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions.* J Gen Virol 92(Pt 12): 2838-2848.
Nagashima S., M. Takahashi, T. Kobayashi, T. Nishizawa, T. Nishiyama, P. P. Primadharsini and H. Okamoto (2017). *Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway.* J Virol 91(22).
Naik S. R., R. Aggarwal, P. N. Salunke and N. N. Mehrotra (1992). *A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India.* Bull World Health Organ 70(5): 597-604.
Nair V. P., S. Anang, C. Subramani, A. Madhvi, K. Bakshi, A. Srivastava, Shalimar, B. Nayak, C. T. Ranjith Kumar and M. Surjit (2016). *Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus.* PLoS Pathog 12(4): e1005521.
Nakamura M., K. Takahashi, K. Taira, M. Taira, A. Ohno, H. Sakugawa, M. Arai and S. Mishiro (2006). *Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence.* Hepatol Res 34(3): 137-140.
Nan Y., Z. Ma, R. Wang, Y. Yu, H. Kannan, B. Fredericksen and Y. J. Zhang (2014). *Enhancement of interferon induction by ORF3 product of hepatitis E virus.* J Virol 88(15): 8696-8705.
Nascimento M. S. J., S. S. Pereira, J. Teixeira, J. Abreu-Silva, R. M. S. Oliveira, M. Myrmel, K. Stene-Johansen, J. Overbo, G. Goncalves and J. R. Mesquita (2018). *A nationwide serosurvey of hepatitis E virus antibodies in the general population of Portugal.* Eur J Public Health 28(4): 720-724.
Nemecek V., P. Butovicova, M. Maly, P. Dite, M. Vertatova, I. Vodickova and B. Kriz (2017). *[The prevalence of antibodies against Hepatitis E Virus in the Czech Republic: serological survey].* Epidemiol Mikrobiol Imunol 66(1): 3-7.
Neumann S., S. S. Hackl, M. Piepenschneider, A. Vina-Rodriguez, P. Dremsek, R. G. Ulrich, M. H. Groschup and M. Eiden (2016). *Serologic and Molecular Survey of Hepatitis E Virus in German Deer Populations.* J Wildl Dis 52(1): 106-113.
Nicand E., C. Bigaillon and S. Tesse (2009). *Hepatitis E : an emerging disease ?* Pathol Biol 57: 203-221.

Nicot F., N. Jeanne, A. Roulet, C. Lefebvre, R. Carcenac, M. Manno, M. Dubois, N. Kamar, S. Lhomme, F. Abravanel and J. Izopet (2018). *Diversity of hepatitis E virus genotype 3.* Rev Med Virol 28(5): e1987.
O'Connor M., S. J. Roche and D. Sammin (2015). *Seroprevalence of Hepatitis E virus infection in the Irish pig population.* Ir Vet J 68(1): 8.
O'Hara Z., C. Crossan, J. Craft and L. Scobie (2018). *First Report of the Presence of Hepatitis E Virus in Scottish-Harvested Shellfish Purchased at Retail Level.* Food Environ Virol.
O'Riordan J., F. Boland, P. Williams, J. Donnellan, B. M. Hogema, S. Ijaz and W. G. Murphy (2016). *Hepatitis E virus infection in the Irish blood donor population.* Transfusion 56(11): 2868-2876.
Okamoto H., M. Takahashi, T. Nishizawa, R. Usui and E. Kobayashi (2004). *Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats.* Infection 32(1): 57-58.
Oliveira R., J. R. Mesquita, S. Pereira, J. Abreu-Silva, J. Teixeira and M. S. J. Nascimento (2017). *Seroprevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Portuguese Children.* Pediatr Infect Dis J 36(7): 623-626.
Olsoy I. B., S. Henriksen, F. H. Weissbach, M. Larsen, K. Borgen, F. Abravanel, N. Kamar, E. J. Paulssen, H. H. Hirsch and C. H. Rinaldo (2019). *Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in a general adult population in Northern Norway: the Tromso study.* Med Microbiol Immunol.
Osterman A., T. Stellberger, A. Gebhardt, M. Kurz, C. C. Friedel, P. Uetz, H. Nitschko, A. Baiker and M. G. Vizoso-Pinto (2015). *The Hepatitis E virus intraviral interactome.* Sci Rep 5: 13872.
Panda S. K., D. Thakral and S. Rehman (2007). *Hepatitis E virus.* Reviews in Medical Virology 17(3): 151-180.
Park H. K., S. H. Jeong, J. W. Kim, B. H. Woo, D. H. Lee, H. Y. Kim and S. Ahn (2012). *Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays.* BMC Infect Dis 12: 142.
Pavio N., V. Doceul, E. Bagdassarian and R. Johne (2017). *Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human.* Vet Res 48(1): 78.
Pavio N., M. Laval, O. Maestrini, F. Casabianca, F. Charrier and F. Jori (2016). *Possible Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus from Domestic Pigs and Wild Boars from Corsica.* Emerg Infect Dis 22(12): 2197-2199.
Pavio N., X. J. Meng and C. Renou (2010). *Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks.* Vet Res 41(6): 46.
Pavio N., T. Merbah and A. Thebault (2014). *Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France.* Emerg Infect Dis 20(11): 1925-1927.
Payne B. A., M. Medhi, S. Ijaz, M. Valappil, E. J. Savage, O. N. Gill, R. Tedder and U. Schwab (2013). *Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom.* Emerg Infect Dis 19(2): 333-335.
Peralta B., M. Biarnes, G. Ordonez, R. Porta, M. Martin, E. Mateu, S. Pina and X. J. Meng (2009). *Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain.* Vet Microbiol 137(1-2): 31-36.
Péron J.-M., J.-M. Mansuy, C. Récher, C. Bureau, H. Poirson, L. Alric, J. Izopet and J.-P. Vinel (2006). *Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient.* Journal of Gastroenterology and Hepatology 21(7): 1223-1224.
Peron J. M., F. Abravanel, M. Guillaume, R. Gerolami, J. Nana, R. Anty, A. Pariente, C. Renou, C. Bureau, M. A. Robic, L. Alric, J. P. Vinel, J. Izopet and N. Kamar (2016). *Treatment of autochthonous acute hepatitis E with short-term ribavirin: a multicenter retrospective study.* Liver Int 36(3): 328-333.
Peron J. M., H. Dalton, J. Izopet and N. Kamar (2011). *Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin?* J Hepatol 54(6): 1323-1324; author reply 1324-1325.
Petrovic T., D. Lupulovic, N. Jimenez de Oya, S. Vojvodic, A. B. Blazquez, E. Escribano-Romero, M. A. Martin-Acebes, A. Potkonjak, V. Milosevic, S. Lazic and J. C. Saiz (2014). *Prevalence of hepatitis E virus (HEV) antibodies in Serbian blood donors.* J Infect Dev Ctries 8(10): 1322-1327.

Piorkowski G., L. Capai, A. Falchi, F. Casabianca, O. Maestrini, P. Gallian, K. Barthelemy, O. Py, R. Charrel and X. de Lamballerie (2018). *First Identification and Genomic Characterization of a Porcine Sapelovirus from Corsica, France, 2017.* Microbiol Resour Announc 7(11).
Piorkowski G., F. Jacquot, G. Querat, C. Carbonnelle, D. Pannetier, F. Mentre, H. Raoul and X. de Lamballerie (2017). *Implementation of a non-human primate model of Ebola disease: Infection of Mauritian cynomolgus macaques and analysis of virus populations.* Antiviral Res 140: 95-105.
Pischke S., J. Hartl, S. D. Pas, A. W. Lohse, B. C. Jacobs and A. A. Van der Eijk (2017). *Hepatitis E virus: Infection beyond the liver?* J Hepatol 66(5): 1082-1095.
Pittaras T., S. Valsami, M. Mavrouli, V. Kapsimali, A. Tsakris and M. Politou (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus in blood donors in Greece.* Vox Sang 106(4): 387.
PNRC P. N. R. d. C. (1995). *La chasse en Corse*. Ajaccio
Politou M., S. Boti, T. Androutsakos, S. Valsami, T. Pittaras and V. Kapsimali (2015). *Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece.* J Med Virol 87(9): 1517-1520.
Ponterio E., I. Di Bartolo, G. Orru, M. Liciardi, F. Ostanello and F. M. Ruggeri (2014). *Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein.* BMC Vet Res 10: 133.
Potemkin I. A., M. A. Lopatukhina, O. A. Gadzhieva, E. L. Prokhorova, A. Diyarrassuba, O. A. Isaeva, T. V. Kozhanova, O. E. Ivanova, O. V. Silenova, N. Setdikova, K. K. Kyuregyan and M. I. Mikhailov (2015). *[Prevalence of hepatitis E markers in children].* Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(2): 38-46.
Prasad G. S., S. Prasad, A. Bhupali, A. N. Patil and K. Parashar (2016). *A Study of Hepatitis E in Pregnancy: Maternal and Fetal Outcome.* J Obstet Gynaecol India 66(Suppl 1): 18-23.
Préfecture de Corse (2015). Schéma régionalde développement de l'aquaculture marineCorse.
Purcell R. H. and S. U. Emerson (2008). *Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease.* J Hepatol 48(3): 494-503.
Purcell R. H., R. E. Engle, S. Govindarajan, R. Herbert, M. St Claire, W. R. Elkins, A. Cook, C. Shaver, M. Beauregard, J. Swerczek and S. U. Emerson (2013). *Pathobiology of hepatitis E: lessons learned from primate models.* Emerg Microbes Infect 2(3): e9.
Purcell R. H., R. E. Engle, M. P. Rood, Y. Kabrane-Lazizi, H. T. Nguyen, S. Govindarajan, M. St Claire and S. U. Emerson (2011). *Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA.* Emerg Infect Dis 17(12): 2216-2222.
Purdy M. A., T. J. Harrison, S. Jameel, X. J. Meng, H. Okamoto, W. H. M. Van der Poel, D. B. Smith and C. Ictv Report (2017). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae.* The Journal of General Virology 98(11): 2645-2646.
Purdy M. T., A.; Huang, C.; Yarbough P.; Reyes, G. (1993). *Hepatitis E virus : a nonenveloped member of the alpha- like RNA virus supergroup.* Seminar Virology: 319-326.
Raj V. S., S. L. Smits, S. D. Pas, L. B. Provacia, H. Moorman-Roest, A. D. Osterhaus and B. L. Haagmans (2012). *Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands.* Emerg Infect Dis 18(8): 1369-1370.
Ray P. K., P. A. Desingu, S. Kumari, J. K. John, M. Sethi, G. K. Sharma, B. Pattnaik, R. K. Singh and G. Saikumar (2018). *Porcine sapelovirus among diarrhoeic piglets in India.* Transbound Emerg Dis 65(1): 261-263.
Rehman S., N. Kapur, H. Durgapal and S. K. Panda (2008). *Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase.* Virology 370(1): 77-92.
Relun A., F. Charrier, B. Trabucco, O. Maestrini, S. Molia, D. Chavernac, V. Grosbois, F. Casabianca, E. Etter and F. Jori (2015). *Multivariate analysis of traditional pig management practices and their potential impact on the spread of infectious diseases in Corsica.* Prev Vet Med 121(3-4): 246-256.
Renou C., A. Lafeuillade, J. F. Cadranel, N. Pavio, A. Pariente, T. Allegre, C. Poggi, G. Penaranda, F. Cordier and E. Nicand (2010). *Hepatitis E virus in HIV-infected patients.* AIDS 24(10): 1493-1499.
Renou C., A. M. Roque-Afonso and N. Pavio (2014). *Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France.* Emerg Infect Dis 20(11): 1945-1947.
Reuter G., A. Boldizsar and P. Pankovics (2009a). *Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae.* Arch Virol 154(1): 101-108.

Reuter G., A. Boros, R. Matics, B. Kapusinszky, E. Delwart and P. Pankovics (2016). *A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (Egretta garzetta), in Hungary.* Infect Genet Evol.
Reuter G., A. Boros and P. Pankovics (2011a). *Kobuviruses - a comprehensive review.* Rev Med Virol 21(1): 32-41.
Reuter G., D. Fodor, P. Forgach, A. Katai and G. Szucs (2009b). *Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary.* J Clin Virol 44(4): 277-281.
Reuter G., P. Pankovics and A. Boros (2011b). *Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary.* Arch Virol 156(1): 125-128.
Reyes G. R., M. A. Purdy, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, K. E. Fry and D. W. Bradley (1990). *Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.* Science 247(4948): 1335-1339.
Ricci A., A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, R. Davies, P. S. F. Escamez, L. Herman, K. Koutsoumanis, R. Lindqvist, B. Nørrung, L. Robertson, G. Ru, M. Sanaa, M. Simmons, P. Skandamis, E. Snary, N. Speybroeck, B. T. Kuile, J. Threlfall, H. Wahlström, I. D. Bartolo, R. Johne, N. Pavio, S. Rutjes, W. v. d. Poel, P. Vasickova, M. Hempen, W. Messens, V. Rizzi, F. Latronico and R. Girones (2017). *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen.* EFSA Journal 15(7): e04886.
Rivadulla E., M. F. Varela, J. R. Mesquita, M. S. J. Nascimento and J. L. Romalde (2019). *Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish Harvesting Areas from Galicia (Northwestern Spain).* Viruses 11(7).
Rivero-Juarez A., M. Frias, A. Martinez-Peinado, M. A. Risalde, D. Rodriguez-Cano, A. Camacho, I. Garcia-Bocanegra, F. Cuenca-Lopez, J. C. Gomez-Villamandos and A. Rivero (2017). *Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption.* Zoonoses Public Health.
Rivero-Juarez A., M. Frias, D. Rodriguez-Cano, F. Cuenca-Lopez and A. Rivero (2016). *Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection.* Clin Infect Dis 62(11): 1464.
Rivero-Juarez A., M. A. Risalde, M. Frias, I. Garcia-Bocanegra, P. Lopez-Lopez, D. Cano-Terriza, A. Camacho, S. Jimenez-Ruiz, J. C. Gomez-Villamandos and A. Rivero (2018). *Prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: a possible seasonal pattern?* BMC Vet Res 14(1): 54.
Rose N., A. Lunazzi, V. Dorenlor, T. Merbah, F. Eono, M. Eloit, F. Madec and N. Pavio (2011). *High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis 34(5): 419-427.
Rossi-Tamisier M., V. Moal, R. Gerolami and P. Colson (2013). *Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients.* J Clin Virol 56(1): 62-64.
Rutjes S. A., M. Bouwknegt, J. W. van der Giessen, A. M. de Roda Husman and C. B. E. M. Reusken (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in The Netherlands.* Journal of Food Protection 77(4): 640-642.
Rutjes S. A., F. Lodder-Verschoor, W. J. Lodder, J. van der Giessen, H. Reesink, M. Bouwknegt and A. M. de Roda Husman (2010). *Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands.* J Virol Methods 168(1-2): 197-206.
Rutjes S. A., W. J. Lodder, F. Lodder-Verschoor, H. H. van den Berg, H. Vennema, E. Duizer, M. Koopmans and A. M. de Roda Husman (2009). *Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands.* Emerg Infect Dis 15(3): 381-387.
Ryll R., S. Bernstein, E. Heuser, M. Schlegel, P. Dremsek, M. Zumpe, S. Wolf, M. Pepin, D. Bajomi, G. Muller, A. C. Heiberg, C. Spahr, J. Lang, M. H. Groschup, H. Ansorge, J. Freise, S. Guenther, K. Baert, F. Ruiz-Fons, J. Pikula, N. Knap, I. Tsakmakidis, C. Dovas, S. Zanet, C. Imholt, G. Heckel, R. Johne and R. G. Ulrich (2017). *Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (Rattus norvegicus) and Black rats (Rattus rattus) from 11 European countries.* Vet Microbiol 208: 58-68.
Ryll R., M. Eiden, E. Heuser, M. Weinhardt, M. Ziege, D. Hoper, M. H. Groschup, G. Heckel, R. Johne and R. G. Ulrich (2018). *Hepatitis E virus in feral rabbits along a rural-urban transect in Central Germany.* Infect Genet Evol 61: 155-159.

Saad M. D., H. A. Hussein, M. M. Bashandy, H. H. Kamel, K. C. Earhart, D. J. Fryauff, M. Younan and A. H. Mohamed (2007). *Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt.* Infect Genet Evol 7(3): 368-373.
Said B., S. Ijaz, G. Kafatos, L. Booth, H. L. Thomas, A. Walsh, M. Ramsay, D. Morgan and E. I. I. T. Hepatitis (2009). *Hepatitis E outbreak on cruise ship.* Emerg Infect Dis 15(11): 1738-1744.
Sainokami S., K. Abe, I. Kumagai, A. Miyasaka, R. Endo, Y. Takikawa, K. Suzuki, H. Mizuo, Y. Sugai, Y. Akahane, Y. Koizumi, Y. Yajima and H. Okamoto (2004). *Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A.* J Gastroenterol 39(7): 640-648.
Sakano C., Y. Morita, M. Shiono, Y. Yokota, T. Mokudai, Y. Sato-Motoi, A. Noda, T. Nobusawa, H. Sakaniwa, A. Nagai, H. Kabeya, S. Maruyama, S. Yamamoto, H. Sato and H. Kimura (2009). *Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (Sus scrofa leucomystax) and pigs in Gunma Prefecture, Japan.* J Vet Med Sci 71(1): 21-25.
Salameria Corsa. (2018). *Charcuterie de Corse AOC.* from https://www.charcuteriedecorse.com/.
Salines M., M. Andraud and N. Rose (2017). *From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review.* Vet Res 48(1): 31.
Salines M., A. Demange, G. Stephant, P. Renson, O. Bourry, M. Andraud, N. Rose and N. Pavio (2019). *Persistent viremia and presence of hepatitis E virus RNA in pig muscle meat after experimental co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Int J Food Microbiol 292: 144-149.
Sanford B. J., S. U. Emerson, R. H. Purcell, R. E. Engle, B. A. Dryman, T. E. Cecere, V. Buechner-Maxwell, D. P. Sponenberg and X. J. Meng (2013). *Serological evidence for a hepatitis e virus-related agent in goats in the United States.* Transbound Emerg Dis 60(6): 538-545.
Sarchese V., F. Di Profio, I. Melegari, A. Palombieri, S. Bermudez Sanchez, A. Arbuatti, M. Ciuffetelli, F. Marsilio, V. Martella and B. Di Martino (2019). *Hepatitis E virus in sheep in Italy.* Transbound Emerg Dis.
Sasaki Y., M. Haruna, M. Uema, M. Noda and Y. Yamada (2018). *Prevalence and Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Virus among Pigs in Japan.* Jpn J Infect Dis 71(1): 75-78.
Sauleda S., E. Ong, M. Bes, A. Janssen, R. Cory, M. Babizki, T. Shin, A. Lindquist, A. Hoang, L. Vang, M. Piron, N. Casamitjana, M. Koppelman, L. Danzig and J. M. Linnen (2015). *Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain).* Transfusion 55(5): 972-979.
Sayed I. M., L. Verhoye, C. Montpellier, F. Abravanel, J. Izopet, L. Cocquerel and P. Meuleman (2019). *Hepatitis E Virus (HEV) Open Reading Frame 2 Antigen Kinetics in Human-Liver Chimeric Mice and Its Impact on HEV Diagnosis.* J Infect Dis 220(5): 811-819.
Schielke A., V. Ibrahim, I. Czogiel, M. Faber, C. Schrader, P. Dremsek, R. G. Ulrich and R. Johne (2015). *Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars.* BMC Infect Dis 15: 440.
Schielke A., K. Sachs, M. Lierz, B. Appel, A. Jansen and R. Johne (2009). *Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain.* Virol J 6: 58.
Schock A., R. Gurrala, H. Fuller, L. Foyle, M. Dauber, F. Martelli, S. Scholes, L. Roberts, F. Steinbach and A. Dastjerdi (2014). *Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom.* Vet Microbiol 172(3-4): 381-389.
Sehgal D., S. Thomas, M. Chakraborty and S. Jameel (2006). *Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein.* Virol J 3: 38.
Servant-Delmas A., F. Abravanel, J. J. Lefrere, F. Lionnet, C. Hamon, J. Izopet and S. Laperche (2016). *New insights into the natural history of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused immunocompetent patients in France.* J Viral Hepat 23(7): 569-575.
Shaikh A. and C. Nelson-Piercy (2006). *Fulminant liver failure following hepatitis E in pregnancy.* J Obstet Gynaecol 26(2): 159-160.

Sharma S., A. Kumar, P. Kar, S. Agarwal, S. Ramji, S. A. Husain, S. Prasad and S. Sharma (2017). *Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection.* J Viral Hepat.
Shiota T., T.-C. Li, Y. Nishimura, S. Yoshizaki, R. Sugiyama, M. Shimojima, M. Saijo, H. Shimizu, R. Suzuki, T. Wakita, M. Muramatsu and K. Ishii (2019). *Integrin α3 is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection.* Virology 536: 119-124.
Shirazi R., P. Pozzi, M. Wax, I. Bar-Or, E. Asulin, Y. Lustig, E. Mendelson, Z. Ben-Ari, E. Schwartz and O. Mor (2018). *Hepatitis E in pigs in Israel: seroprevalence, molecular characterisation and potential impact on humans.* Euro Surveill 23(49).
Shrestha A. C., R. L. Flower, C. R. Seed, A. J. Keller, R. Harley, H. T. Chan, V. Hoad, D. Warrilow, J. Northill, J. A. Holmberg and H. M. Faddy (2016a). *Hepatitis E virus RNA in Australian blood donations.* Transfusion 56(12): 3086-3093.
Shrestha A. C., R. L. Flower, C. R. Seed, S. L. Stramer and H. M. Faddy (2016b). *A Comparative Study of Assay Performance of Commercial Hepatitis E Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits in Australian Blood Donor Samples.* J Blood Transfus 2016: 9647675.
Shrestha A. C., C. R. Seed, R. L. Flower, K. M. Rooks, A. J. Keller, R. J. Harley, H. T. Chan, J. A. Holmberg and H. M. Faddy (2014). *Hepatitis E virus and implications for blood supply safety, Australia.* Emerg Infect Dis 20(11): 1940-1942.
Shrestha M. P., R. M. Scott, D. M. Joshi, M. P. Mammen, Jr., G. B. Thapa, N. Thapa, K. S. Myint, M. Fourneau, R. A. Kuschner, S. K. Shrestha, M. P. David, J. Seriwatana, D. W. Vaughn, A. Safary, T. P. Endy and B. L. Innis (2007). *Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine.* N Engl J Med 356(9): 895-903.
Shrestha P., D. Bhandari, D. Sharma and B. P. Bhandari (2009). *A study of viral hepatitis during pregnancy in Nepal Medical College Teaching Hospital.* Nepal Med Coll J 11(3): 192-194.
Slot E., B. M. Hogema, A. Riezebos-Brilman, T. M. Kok, M. Molier and H. L. Zaaijer (2013). *Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012.* Euro Surveill 18(31).
Smith D. B., S. Ijaz, R. S. Tedder, B. Hogema, H. L. Zaaijer, J. Izopet, A. Bradley-Stewart, R. Gunson, H. Harvala, I. Kokki and P. Simmonds (2015). *Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants.* J Gen Virol 96(11): 3255-3264.
Smith D. B., P. Simmonds, J. Izopet, E. F. Oliveira-Filho, R. G. Ulrich, R. Johne, M. Koenig, S. Jameel, T. J. Harrison, X.-J. Meng, H. Okamoto, W. H. M. Van der Poel and M. A. Purdy (2016a). *Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes.* The Journal of General Virology 97(3): 537-542.
Smith D. B., P. Simmonds, J. Izopet, E. F. Oliveira-Filho, R. G. Ulrich, R. Johne, M. Koenig, S. Jameel, T. J. Harrison, X. J. Meng, H. Okamoto, W. H. Van der Poel and M. A. Purdy (2016b). *Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes.* J Gen Virol 97(3): 537-542.
Smith DB S. P. (2014). *International committee on taxonomy of viruses hepeviridae study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. Consensus proposals for classification of the family hepeviridae.* J Gen Virol: 95:2223–2232. .
Sommerkorn F. M., B. Schauer, T. Schreiner, H. Fickenscher and A. Krumbholz (2017). *Performance of Hepatitis E Virus (HEV)-antibody tests: a comparative analysis based on samples from individuals with direct contact to domestic pigs or wild boar in Germany.* Med Microbiol Immunol 206(3): 277-286.
Son K. Y., D. S. Kim, J. Kwon, J. S. Choi, M. I. Kang, G. J. Belsham and K. O. Cho (2014). *Full-length genomic analysis of Korean porcine Sapelovirus strains.* PLoS One 9(9): e107860.
Sonoda H., M. Abe, T. Sugimoto, Y. Sato, M. Bando, E. Fukui, H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa and H. Okamoto (2004). *Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan.* J Clin Microbiol 42(11): 5371-5374.
Spaccaferri G. (2015). Cas groupés d'infections par le virus de l'hépatite E Auvergne, 2015, Santé Publique France.
Spada E., S. Pupella, G. Pisani, R. Bruni, P. Chionne, E. Madonna, U. Villano, M. Simeoni, S. Fabi, G. Marano, C. Marcantonio, P. Pezzotti, A. R. Ciccaglione and G. M. Liumbruno (2018). *A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors.* Blood Transfus: 1-9.

Spancerniene U., J. Grigas, J. Buitkuviene, J. Zymantiene, V. Juozaitiene, M. Stankeviciute, D. Razukevicius, D. Zienius and A. Stankevicius (2018). *Prevalence and phylogenetic analysis of hepatitis E virus in pigs, wild boars, roe deer, red deer and moose in Lithuania.* Acta Vet Scand 60(1): 13.
Sridhar S., C. C. Y. Yip, S. Wu, J. Cai, A. J. Zhang, K. H. Leung, T. W. H. Chung, J. F. W. Chan, W. M. Chan, J. L. L. Teng, R. K. H. Au-Yeung, V. C. C. Cheng, H. Chen, S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo, N. S. Xia, C. M. Lo and K. Y. Yuen (2018). *Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant.* Emerg Infect Dis 24(12): 2241-2250.
Stang A., K. Korn, O. Wildner and K. Uberla (2005). *Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR.* J Clin Microbiol 43(2): 716-720.
Steyer A., T. Naglic, T. Mocilnik, M. Poljsak-Prijatelj and M. Poljak (2011). *Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage.* Infect Genet Evol 11(7): 1732-1737.
Strakova P., B. Kriz, I. Rudolf and Z. Hubalek (2014). *Seroprevalence study of hepatitis E virus infection in two districts of the Czech Republic.* Epidemiol Mikrobiol Imunol 63(2): 92-94.
Stramer S. L., E. D. Moritz, G. A. Foster, E. Ong, J. M. Linnen, B. M. Hogema, M. Mak, C. P. Chia and R. Y. Dodd (2016). *Hepatitis E virus: seroprevalence and frequency of viral RNA detection among US blood donors.* Transfusion 56(2): 481-488.
Suin V., S. E. Klamer, V. Hutse, M. Wautier, M. Jacques, M. Abady, S. Lamoral, V. Verburgh, I. Thomas, B. Brochier, L. Subissi and S. Van Gucht (2019). *Epidemiology and genotype 3 subtype dynamics of hepatitis E virus in Belgium, 2010 to 2017.* Euro Surveill 24(10).
Suppiah S., Y. Zhou and T. K. Frey (2011). *Lack of processing of the expressed ORF1 gene product of hepatitis E virus.* Virol J 8: 245.
Surjit M., S. Jameel and S. K. Lal (2004). *The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA.* J Virol 78(1): 320-328.
Suzuki K., T. Aikawa and H. Okamoto (2002). *Fulminant hepatitis E in Japan.* N Engl J Med 347(18): 1456.
Szabo K., E. Trojnar, H. Anheyer-Behmenburg, A. Binder, U. Schotte, L. Ellerbroek, G. Klein and R. Johne (2015). *Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method.* Int J Food Microbiol 215: 149-156.
Tabatabai J., J. J. Wenzel, M. Soboletzki, C. Flux, M. H. Navid and P. Schnitzler (2014). *First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany.* J Clin Virol 61(1): 170-172.
Takahashi K., N. Kitajima, N. Abe and S. Mishiro (2004). *Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer.* Virology 330(2): 501-505.
Takahashi K., S. Terada, H. Kokuryu, M. Arai and S. Mishiro (2010a). *A wild boar-derived hepatitis E virus isolate presumably representing so far unidentified genotype 5.* Kanzo 51(9): 536-538.
Takahashi M., T. Nishizawa, S. Nagashima, S. Jirintai, M. Kawakami, Y. Sonoda, T. Suzuki, S. Yamamoto, K. Shigemoto, K. Ashida, Y. Sato and H. Okamoto (2014). *Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains.* Virus Res 180: 59-69.
Takahashi M., T. Nishizawa, H. Sato, Y. Sato, Jirintai, S. Nagashima and H. Okamoto (2011). *Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype.* J Gen Virol 92(Pt 4): 902-908.
Takahashi M., T. Tanaka, M. Azuma, E. Kusano, T. Aikawa, T. Shibayama, Y. Yazaki, H. Mizuo, J. Inoue and H. Okamoto (2007). *Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system.* Journal of Clinical Microbiology 45(11): 3671-3679.
Takahashi M., T. Tanaka, H. Takahashi, Y. Hoshino, S. Nagashima, Jirintai, H. Mizuo, Y. Yazaki, T. Takagi, M. Azuma, E. Kusano, N. Isoda, K. Sugano and H. Okamoto (2010b). *Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation.* J Clin Microbiol 48(4): 1112-1125.

Takahashi M., K. Yamada, Y. Hoshino, H. Takahashi, K. Ichiyama, T. Tanaka and H. Okamoto (2008). *Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces.* Arch Virol 153(9): 1703-1713.
Tam A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry and G. R. Reyes (1991). *Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome.* Virology 185(1): 120-131.
Tamura A., Y. K. Shimizu, T. Tanaka, K. Kuroda, Y. Arakawa, K. Takahashi, S. Mishiro, K. Shimizu and M. Moriyama (2007). *Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma.* Hepatol Res 37(2): 113-120.
Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.* Mol Biol Evol 30(12): 2725-2729.
Tanaka T., M. Takahashi, E. Kusano and H. Okamoto (2007). *Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus.* J Gen Virol 88(Pt 3): 903-911.
Tang X., C. Yang, Y. Gu, C. Song, X. Zhang, Y. Wang, J. Zhang, C. L. Hew, S. Li, N. Xia and J. Sivaraman (2011). *Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus.* Proc Natl Acad Sci U S A 108(25): 10266-10271.
Taton B., K. Moreau, S. Lepreux, T. Bachelet, P. Trimoulet, V. De Ledinghen, A. Pommereau, P. Ronco, N. Kamar, P. Merville and L. Couzi (2013). *Hepatitis E virus infection as a new probable cause of de novo membranous nephropathy after kidney transplantation.* Transpl Infect Dis 15(6): E211-215.
Tavitian S., J. M. Peron, A. Huynh, J. M. Mansuy, L. Ysebaert, F. Huguet, J. P. Vinel, M. Attal, J. Izopet and C. Recher (2010). *Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies.* J Clin Virol 49(2): 141-144.
Te H. S., J. Drobeniuc, S. Kamili, C. Dong, J. Hart and U. M. Sharapov (2013). *Hepatitis E virus infection in a liver transplant recipient in the United States: a case report.* Transplant Proc 45(2): 810-813.
Tei S., N. Kitajima, K. Takahashi and S. Mishiro (2003). *Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings.* Lancet 362(9381): 371-373.
Teixeira J., J. R. Mesquita, S. S. Pereira, R. M. Oliveira, J. Abreu-Silva, A. Rodrigues, M. Myrmel, K. Stene-Johansen, J. Overbo, G. Goncalves and M. S. Nascimento (2017). *Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal.* Med Microbiol Immunol 206(1): 77-81.
Teo C. G. (2012). *Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E.* Epidemiol Infect 140(5): 767-787.
Territoires D. G. d. P. A. A. e. d. (2012). Cahier des charges de l'appellation d'origine « Jambon sec de Corse » ou « Jambon sec de Corse – Prisuttu » homologué par le décret n° 2012–445 du 2 avril 2012. . Bulletin officiel n°14 du 06-04-12. 14.
Thiry D., A. Mauroy, C. Saegerman, A. Licoppe, T. Fett, I. Thomas, B. Brochier, E. Thiry and A. Linden (2017a). *Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus.* Transbound Emerg Dis 64(3): 764-773.
Thiry D., A. Mauroy, C. Saegerman, I. Thomas, M. Wautier, C. Miry, G. Czaplicki, D. Berkvens, N. Praet, W. van der Poel, R. Cariolet, B. Brochier and E. Thiry (2014). *Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium.* Vet Microbiol 172(3-4): 407-414.
Thiry D., N. Rose, A. Mauroy, F. Paboeuf, L. Dams, S. Roels, N. Pavio and E. Thiry (2017b). *Susceptibility of Pigs to Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Isolated from a Wild Boar.* Transbound Emerg Dis 64(5): 1589-1597.
Thom K., P. Gilhooly, K. McGowan, K. Malloy, L. M. Jarvis, C. Crossan, L. Scobie, O. Blatchford, A. Smith-Palmer, M. C. Donnelly, J. S. Davidson, I. Johannessen, K. J. Simpson, H. R. Dalton and J. Petrik (2018). *Hepatitis E virus (HEV) in Scotland: evidence of recent increase in viral circulation in humans.* Euro Surveill 23(12).
Ticehurst J., L. L. Rhodes, Jr., K. Krawczynski, L. V. Asher, W. F. Engler, T. L. Mensing, J. D. Caudill, M. H. Sjogren, C. H. Hoke, Jr., J. W. LeDuc and et al. (1992). *Infection of owl monkeys (Aotus trivirgatus)*

and cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) with hepatitis E virus from Mexico. J Infect Dis 165(5): 835-845.
Tirapicos Nunes. JL (1993). *Contributo para a reintegraçao do proco alentejeno no montado.*, Univeristé de Evora.
Tremeaux P., S. Lhomme, S. Chapuy-Regaud, J. M. Peron, L. Alric, N. Kamar, J. Izopet and F. Abravanel (2016). *Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection.* J Clin Virol 79: 1-5.
Trmal J., I. Pavlik, P. Vasickova, L. Matejickova, L. Simunkova, S. Luks and J. Pazderkova (2012). *[Outbreaks of viral hepatitis E in the Czech Republic?].* Epidemiol Mikrobiol Imunol 61(1-2): 15-20.
Tsachev I., M. Baymakova, M. Ciccozzi, R. Pepovich, T. Kundurzhiev, P. Marutsov, K. K. Dimitrov, K. Gospodinova, M. Pishmisheva and L. Pekova (2019). *Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection in Pigs from Southern Bulgaria.* Vector Borne Zoonotic Dis.
Tsarev S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J. L. Gerin and R. H. Purcell (1994). *Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E.* Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 10198-10202.
Tyagi S., H. Korkaya, M. Zafrullah, S. Jameel and S. K. Lal (2002). *The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2.* J Biol Chem 277(25): 22759-22767.
van Gageldonk-Lafeber A. B., W. van der Hoek, F. Borlee, D. J. Heederik, S. H. Mooi, C. B. Maassen, C. J. Yzermans, B. Rockx, L. A. Smit and J. H. Reimerink (2017). *Hepatitis E virus seroprevalence among the general population in a livestock-dense area in the Netherlands: a cross-sectional population-based serological survey.* BMC Infect Dis 17(1): 21.
Vitral C. L., M. A. Pinto, L. L. Lewis-Ximenez, Y. E. Khudyakov, D. R. dos Santos and A. M. Gaspar (2005). *Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil.* Mem Inst Oswaldo Cruz 100(2): 117-122.
Vollmer T., J. Diekmann, M. Eberhardt, C. Knabbe and J. Dreier (2016). *Monitoring of Anti-Hepatitis E Virus Antibody Seroconversion in Asymptomatically Infected Blood Donors: Systematic Comparison of Nine Commercial Anti-HEV IgM and IgG Assays.* Viruses 8(8).
Vollmer T., J. Diekmann, R. Johne, M. Eberhardt, C. Knabbe and J. Dreier (2012). *Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors.* J Clin Microbiol 50(8): 2708-2713.
Vollmer T., C. Knabbe and J. Dreier (2014). *Comparison of real-time PCR and antigen assays for detection of hepatitis E virus in blood donors.* J Clin Microbiol 52(6): 2150-2156.
Wacheck S., C. Werres, U. Mohn, S. Dorn, E. Soutschek, M. Fredriksson-Ahomaa and E. Martlbauer (2012). *Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany.* Foodborne Pathog Dis 9(7): 655-660.
Walachowski S., V. Dorenlor, J. Lefevre, A. Lunazzi, F. Eono, T. Merbah, E. Eveno, N. Pavio and N. Rose (2014). *Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France.* Epidemiol Infect 142(9): 1934-1944.
Wang B., D. Harms, C. P. Papp, S. Niendorf, S. Jacobsen, M. Lutgehetmann, S. Pischke, H. Wedermeyer, J. Hofmann and C. T. Bock (2018). *Comprehensive Molecular Approach for Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 Variants.* J Clin Microbiol 56(5).
Wang H., I. Kjellberg, P. Sikora, H. Rydberg, M. Lindh, O. Bergstedt and H. Norder (2019). *Hepatitis E virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water.* Water Res 168: 115141.
Wang L., Y. Zheng, C. Fu, S. Huang, M. Hong, Z. Yan, K. Jia, P. Zhou and S. Li (2016). *Seroprevalence of hepatitis E virus infection among dogs in several developed cities in the Guangdong province of China.* J Med Virol 88(8): 1404-1407.
Wedemeyer H., S. Pischke and M. P. Manns (2012). *Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection.* Gastroenterology 142(6): 1388-1397 e1381.
Weger S., B. Elkin, R. Lindsay, T. Bollinger, V. Crichton and A. Andonov (2017). *Hepatitis E Virus Seroprevalence in Free-Ranging Deer in Canada.* Transbound Emerg Dis 64(3): 1008-1011.

Wenzel J. J., J. Preiss, M. Schemmerer, B. Huber and W. Jilg (2013). *Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates.* J Infect Dis 207(3): 497-500.
Wichmann O., S. Schimanski, J. Koch, M. Kohler, C. Rothe, A. Plentz, W. Jilg and K. Stark (2008). *Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany.* J Infect Dis 198(12): 1732-1741.
Widen F., L. Sundqvist, A. Matyi-Toth, G. Metreveli, S. Belak, G. Hallgren and H. Norder (2011). *Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden.* Epidemiol Infect 139(3): 361-371.
Williams T. P., C. Kasorndorkbua, P. G. Halbur, G. Haqshenas, D. K. Guenette, T. E. Toth and X. J. Meng (2001). *Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model.* J Clin Microbiol 39(9): 3040-3046.
Woo P. C., S. K. Lau, J. L. Teng, K. Y. Cao, U. Wernery, T. Schountz, T. H. Chiu, A. K. Tsang, P. C. Wong, E. Y. Wong and K. Y. Yuen (2016). *New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013.* Emerg Infect Dis 22(12): 2219-2221.
Woo P. C., S. K. Lau, J. L. Teng, A. K. Tsang, M. Joseph, E. Y. Wong, Y. Tang, S. Sivakumar, J. Xie, R. Bai, R. Wernery, U. Wernery and K. Y. Yuen (2014). *New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East.* Emerg Infect Dis 20(6): 1044-1048.
Wu Q., J. An, R. She, R. Shi, W. Hao, M. Soomro, X. Yuan, J. Yang and J. Wang (2017). *Detection of Genotype 4 Swine Hepatitis E Virus in Systemic Tissues in Cross-Species Infected Rabbits.* PloS One 12(1): e0171277.
Wylie K. M., K. A. Mihindukulasuriya, E. Sodergren, G. M. Weinstock and G. A. Storch (2012). *Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children.* PLoS One 7(6): e27735.
Xin S. and L. Xiao (2016). *Clinical Manifestations of Hepatitis E.* Adv Exp Med Biol 948: 175-189.
Xing L., J. C. Wang, T. C. Li, Y. Yasutomi, J. Lara, Y. Khudyakov, D. Schofield, S. U. Emerson, R. H. Purcell, N. Takeda, T. Miyamura and R. H. Cheng (2011). *Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain.* J Virol 85(2): 1117-1124.
Xu C., R. Y. Wang, C. A. Schechterly, S. Ge, J. W. Shih, N. S. Xia, N. L. Luban and H. J. Alter (2013). *An assessment of hepatitis E virus (HEV) in US blood donors and recipients: no detectable HEV RNA in 1939 donors tested and no evidence for HEV transmission to 362 prospectively followed recipients.* Transfusion 53(10 Pt 2): 2505-2511.
Xu J., F. Wu, D. Tian, J. Wang, Z. Zheng and N. Xia (2014). *Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-kappaappa B signaling induced by tumor necrosis factor-alpha in human A549 lung epithelial cells.* PLoS One 9(6): e100787.
Yamada K., M. Takahashi, Y. Hoshino, H. Takahashi, K. Ichiyama, S. Nagashima, T. Tanaka and H. Okamoto (2009). *ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells.* J Gen Virol 90(Pt 8): 1880-1891.
Yan Q., H. Du and Y. Wang (2008). *Comparison of two diagnostic reagents to detect anti-hepatitis E virus IgG antibodies.* Chinese Journal of Zoonoses: 24:1087–1089.
Yapa C. M., C. Furlong, A. Rosewell, K. A. Ward, S. Adamson, C. Shadbolt, J. Kok, S. L. Tracy, S. Bowden, E. J. Smedley, M. J. Ferson, V. Sheppeard and J. M. McAnulty (2016). *First reported outbreak of locally acquired hepatitis E virus infection in Australia.* Med J Aust 204(7): 274.
Yin X., C. Ambardekar, Y. Lu and Z. Feng (2016a). *Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses.* J Virol 90(8): 4232-4242.
Yin X. and Z. Feng (2019). *Hepatitis E Virus Entry.* Viruses 11(10).
Yin X., X. Li and Z. Feng (2016b). *Role of Envelopment in the HEV Life Cycle.* Viruses 8(8).
Yoo D., P. Willson, Y. Pei, M. A. Hayes, A. Deckert, C. E. Dewey, R. M. Friendship, Y. Yoon, M. Gottschalk, C. Yason and A. Giulivi (2001). *Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus.* Clin Diagn Lab Immunol 8(6): 1213-1219.

Yu H., S. Li, C. Yang, M. Wei, C. Song, Z. Zheng, Y. Gu, H. Du, J. Zhang and N. Xia (2011a). *Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78.* J Mol Model 17(5): 987-995.

Yu J. M., Z. Q. Xu, B. W. Li, Q. Zhang, S. X. Cui, M. Jin and Z. J. Duan (2011b). *Analysis and characterization of the complete genome of a member of a new species of kobuvirus associated with swine.* Arch Virol 156(5): 747-751.

Yugo D. M. and X. J. Meng (2013). *Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission.* Int J Environ Res Public Health 10(10): 4507-4533.

Zafrullah M., M. H. Ozdener, R. Kumar, S. K. Panda and S. Jameel (1999). *Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein.* J Virol 73(5): 4074-4082.

Zafrullah M., X. Zhang, C. Tran, M. Nguyen, S. Kamili, M. A. Purdy and S. L. Stramer (2018). *Disparities in detection of antibodies against hepatitis E virus in US blood donor samples using commercial assays.* Transfusion.

Zeng M. Y., H. Gao, X. X. Yan, W. J. Qu, Y. K. Sun, G. W. Fu and Y. L. Yan (2017). *High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China.* Zoonoses Public Health.

Zhang J., S. X. Ge, G. Y. Huang, S. W. Li, Z. Q. He, Y. B. Wang, Y. J. Zheng, Y. Gu, M. H. Ng and N. S. Xia (2003). *Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model.* J Med Virol 71(4): 518-526.

Zhang J., J. W. Shih, T. Wu, S. W. Li and N. S. Xia (2013). *Development of the hepatitis E vaccine: from bench to field.* Semin Liver Dis 33(1): 79-88.

Zhang J., X. F. Zhang, S. J. Huang, T. Wu, Y. M. Hu, Z. Z. Wang, H. Wang, H. M. Jiang, Y. J. Wang, Q. Yan, M. Guo, X. H. Liu, J. X. Li, C. L. Yang, Q. Tang, R. J. Jiang, H. R. Pan, Y. M. Li, J. W. Shih, M. H. Ng, F. C. Zhu and N. S. Xia (2015). *Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine.* N Engl J Med 372(10): 914-922.

Zhang J., X. F. Zhang, C. Zhou, Z. Z. Wang, S. J. Huang, X. Yao, Z. L. Liang, T. Wu, J. X. Li, Q. Yan, C. L. Yang, H. M. Jiang, H. J. Huang, Y. L. Xian, J. W. Shih, M. H. Ng, Y. M. Li, J. Z. Wang, F. C. Zhu and N. S. Xia (2014). *Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity.* Clin Microbiol Infect 20(6): O397-405.

Zhang L., Y. Tian, Z. Wen, F. Zhang, Y. Qi, W. Huang, H. Zhang and Y. Wang (2016). *Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2.* J Med Virol 88(12): 2186-2195.

Zhang W., Q. Shen, J. Mou, G. Gong, Z. Yang, L. Cui, J. Zhu, G. Ju and X. Hua (2008). *Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China.* Zoonoses Public Health 55(6): 291-298.

Zhang X., I. Bilic, S. Troxler and M. Hess (2017). *Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds.* Virus Res 228: 75-78.

Zhao C., Y. Geng, T. J. Harrison, W. Huang, A. Song and Y. Wang (2015). *Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus infection.* J Viral Hepat 22(11): 957-963.

Zheng Z. Z., J. Miao, M. Zhao, M. Tang, A. E. Yeo, H. Yu, J. Zhang and N. S. Xia (2010). *Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking.* J Gen Virol 91(Pt 7): 1728-1736.

Zhou W., K. Ullman, V. Chowdry, M. Reining, Z. Benyeda, C. Baule, M. Juremalm, P. Wallgren, L. Schwarz, E. Zhou, S. P. Pedrero, I. Hennig-Pauka, J. Segales and L. Liu (2016). *Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries.* Vet Microbiol 182: 75-81.

Zhou Y. and S. Emerson (2006). *P.302 Heat shock cognate protein 70 may mediate the entry of hepatitis E virus into host cells.* Journal of Clinical Virology 36.

Annexes

Annexe 1 Revue 1 : Virus de l'hépatite E et voies de transmissions dans les pays industrialisés

Une revue de la littérature portant sur la problématique des voies de transmissions du virus dans les pays industrialisés a été publiée dans le journal Viruses (IF : 3.811) le 25 mai 2018 (insérée ci-dessous dans la partie correspondante) (Capai *et al.*, 2018). Dans cette revue, une présentation globale du virus est présentée. Sa découverte, la description de son génome, sa taxonomie, son cycle de réplication ainsi que la clinique y sont tout d'abord développés. Par la suite, les différentes voies de transmissions avérées et suspectées dans les pays industrialisés sont recensées. Enfin, les différents traitements et moyen de prévention sont décrit. La compréhension et la connaissance des voies de transmissions existantes et suspectées dans ces pays est apparue comme essentielle pour mon travail de thèse notamment pour la mise en place de l'étude de séroprévalence en population humaine et de la réflexion autour du questionnaire sur les habitudes et comportements des individus inclus.

Résumé en français : Le virus de l'hépatite E (HEV) est un virus à ARN à brin positif transmis majoritairement par la voie fécale-orale. Les génotypes 1 et 2 du HEV n'infectent que les humains et provoquent principalement des épidémies d'origine hydrique. Les génotypes HEV-3 et HEV-4 sont largement représentés dans le règne animal et sont principalement transmis sous forme de zoonose.

Au cours des 20 dernières années, l'infection à HEV a été considérée comme une maladie importée dans les pays développés, mais il existe maintenant des preuves que le HEV est un agent pathogène méconnu dans les pays à revenu élevé. Dans cette revue, nous décrivons les connaissances actuelles sur la biologie moléculaire du HEV, ses caractéristiques cliniques, ses principales voies de transmission et les stratégies thérapeutiques possibles dans les pays industrialisés.

viruses

MDPI

Review

Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps?

Lisandru Capai [1,*], Rémi Charrel [2] and Alessandra Falchi [1,*]

1 EA7310 BIOSCOPE, Laboratoire de Virologie, Université de Corse-Inserm, 20250 Corte, France
2 Unité des Virus Emergents (UVE), Aix-Marseille Université, IRD 190, INSERM 1207, IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France; remi.charrel@univ-amu.fr
* Correspondence: capai_l@univ-corse.fr (L.C.); falchi@univ-corse.fr (A.F.); Tel.: +33-495-450-677 (A.F.)

Received: 5 April 2018; Accepted: 23 May 2018; Published: 25 May 2018

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) is a positive-strand RNA virus transmitted by the fecal–oral route. HEV genotypes 1 and 2 infect only humans and cause mainly waterborne outbreaks. HEV genotypes 3 and 4 are widely represented in the animal kingdom, and are mainly transmitted as a zoonosis. For the past 20 years, HEV infection has been considered an imported disease in developed countries, but now there is evidence that HEV is an underrecognized pathogen in high-income countries, and that the incidence of confirmed cases has been steadily increasing over the last decade. In this review, we describe current knowledge about the molecular biology of HEV, its clinical features, its main routes of transmission, and possible therapeutic strategies in developed countries.

Keywords: Hepatitis E virus; clinical; transmission; zoonosis; virology

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is one of the leading causes of acute viral hepatitis worldwide, and is responsible for 20 million infections and 70,000 deaths every year [1].

Currently, all of the HEV strains that have been isolated from humans belong to the species *Orthohepevirus* A, with four genotypes implicated in the majority of cases: genotypes 1 and 2 (HEV-1 and HEV-2) infect humans exclusively, whereas genotypes 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4) also infect animals and are zoonotic. Usually, HEV-1 and 2 are associated with epidemic outbreaks of Hepatitis E, while HEV-3 and 4 are associated with sporadic cases. A large number of animals have been found to carry HEV, but pigs are the main reservoir [2]. HEV-3 and HEV-4 are emerging pathogens in high-income countries, most likely because of the consumption of contaminated food [3,4]. However, the possible routes of contamination in industrialized countries are not well elucidated, and unsuspected ones may play significant roles in the epidemiology of the disease [5].

In humans, the majority of HEV-3 cases of infection are asymptomatic, but clinically significant forms exist. A small proportion of infections progress to chronic disease, particularly among those with an immunocompromised status and those who have preexisting liver disease [6]. In high-income countries, risk factors for symptomatic or complicated infection include male gender, age > 45, and preexisting liver disease [7].

Over the past 20 years, HEV has been considered an imported disease in developed countries, but there is evidence that autochthonous HEV infection is underrecognized, despite a steadily increasing incidence [8].

In this review, we mainly describe the current knowledge about molecular biology, clinical aspects, and routes of transmission in developed countries in order to highlight gaps and future directions for research studies.

2. Discovery

In 1978, the first described HEV epidemic took place in India, in the Kashmir region [9]. It resulted in an estimated 52,000 cases of icteric hepatitis with 1700 deaths. Symptomatic cases were predominant in young adults, with an increased incidence and severity in pregnant women. Initially, this outbreak was classified as non-A and non-B Hepatitis Epidemics. A few years later, another similar outbreak occurred in a soviet military camp in Afghanistan [10]. Dr. Balayan orally self-administrated the stooled extract of an ill patient, and after a few days endured the same symptoms that had been observed in other patients [10]. Electron microscopic analysis of the stools revealed viral particles that agglutinated with serum from convalescent patients with non-A and non-B hepatitis.

In 1990, partial sequences were characterized [11], which was followed by sequencing the complete genome [12,13]. The sequenced strains were isolated from Asia and Mexico, where the virus was spreading epidemically. The hepatitis was named Hepatitis E, with the E referring to enterically transmitted non-A non-B hepatitis [11,14].

Moreover, a retrospective analysis of various reports describing jaundice epidemics with a higher percentage of infection in pregnant women was used to identify Hepatitis E-like epidemics in the last decade of the 18th century [15].

3. HEV, a Naked Virus?

HEV is a small, single-stranded, positive-sense and RNA virus (~7.2 kb) with an icosahedral capsid [12]. For many years, this virus has been described as a non-enveloped virus [16–18]; however, recently, another form has been identified. HEV can be "masked" by the membrane of the host cells, and be resistant to antibodies when this form is in blood [19,20]. When HEV particles were released by the cellular exosomal pathway, they appeared to be similar to a "quasi-enveloped" virus. The resistance of the "quasi-enveloped" form is caused by the absence of viral antigens on the surface. These different forms were also found for the hepatitis A virus (HAV) [21].

4. Taxonomy

The current taxonomy classifies HEV in the family *Hepeviridae* [3]. Since 2015, this family has been split into two genera: *Orthohepevirus*, which contains four species designated as *Orthohepevirus* A to D, and *Piscihepevirus* (Piscihepevirus A) [22,23]. The genus *Orthohepevirus* A includes eight genotypes (HEV-1 to HEV-8). HEV-1 and HEV-2 have been detected in humans only, whereas HEV-3 and HEV-4 have been detected in humans and several animal species (domestic pig, wild boar, *Cervidae*). HEV-7 was detected in humans and *Camelidae* [24]. HEV-5 and HEV-6 have been detected only in wild boars [25–27]. The new genotype HEV-8 could infect humans similar to HEV-7, and comes from Bactrian camels [28].

Orthohepevirus B consists of avian viruses, and is divided into four proposed subtypes (I–IV), which are mainly detected in domestic chickens. *Orthohepevirus* C includes two genotypes that have been mainly detected in rats (HEV-C1) and carnivores (HEV-C2). *Orthohepevirus* D strains have been detected in different bat species. The genus *Piscihepevirus* includes a single species (A), cutthroat trout virus, which infects trout, although its pathogenicity and full host range are unknown [29].

5. Genome

The HEV genome is a single-stranded, positive-sense RNA of ~7.2 kb [12], and it is organized as shown in Figure 1. The 5′ cap and 3′ poly(A) tail are non-coding untranslated regions (UTRs). The 5′ cap contains a 7-methyl-guanine. HEV is a positive-sense RNA virus that expresses three open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2, and ORF3 [5,30].

ORF1 encodes a set of nonstructural proteins (~1700 amino acids) with eight putative domains: a methyltransferase (Met), a Y domain (Y), a papain-like cysteine protease (PCP), hypervariable region (HVR), proline-rich domain (PRO), an X macrodomain (X), an RNA helicase (Hel), and an

RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [1,31]. Enzymes produced from ORF1 are involved in viral replication, transcription, and polyprotein cleavage [11,31–33]. It is not yet clear if the polyprotein is cleaved into individual functional domains or it functions as a single protein [34,35].

ORF2 encodes a structural capsid protein. The ORF-translated protein 2 (pORF2) has three glycosylation sites at amino acids (137, 310, and 562). This protein also has an amino-terminal signal peptide that leads to its translocation into the endoplasmic reticulum [36]. ORF2 encodes the structural protein of the icosahedral capsid (660 amino acids) [37], the sequence for which is located at the 3′ end of the RNA strand. It is involved in virus assembly, encapsidation, binding, and the host immune response to the virus [1,38]. Immunological studies of the capsid region have contributed to the development of an HEV vaccine [39].

ORF3 is located between ORF1 and ORF2, and partially overlaps with ORF2 (nt5145–5475) [1]. ORF3 encodes a small phosphoprotein (VP13) of 113 amino acids, 13 kDa [40]. The full role of the VP13 protein is not yet well determined, but studies have been conducted, and it is a multiple functional protein. VP13 is capable of binding to the mammalian cytoskeleton (microtubules) [41]. The ORF3 protein is suggested to act as an adapter to link intracellular transduction pathways, reduce the host inflammatory response, and protect virus-infected cells [42]. VP13 plays an essential role in infectivity in vivo among animal models infected experimentally [43,44]. However, this protein is not indispensable for HEV replication in cultured cells [44]. VP13 is in interacting with different proteins in cells [45]; it plays a role in interferon induction and signaling [46–48], and is also involved in virion release [49,50].

A new ORF was discovered on the ORF1 of genotype HEV-1. For this genotype, an additional ORF exists: the ORF4 [51]. The protein encoded by ORF4 is expressed when a stress of endoplasmic reticulum occurs and can stimulate polymerase activity in interaction with an eukaryotic elongation factor [51]. Translation of ORF4 is driven by an internal ribosome entry site IRES-like sequence situated in nucleotide 2701–2787 of HEV genome [51]. The ORF4 product will form a complex with other proteins to stimulate RdRp activity and increase viral replication.

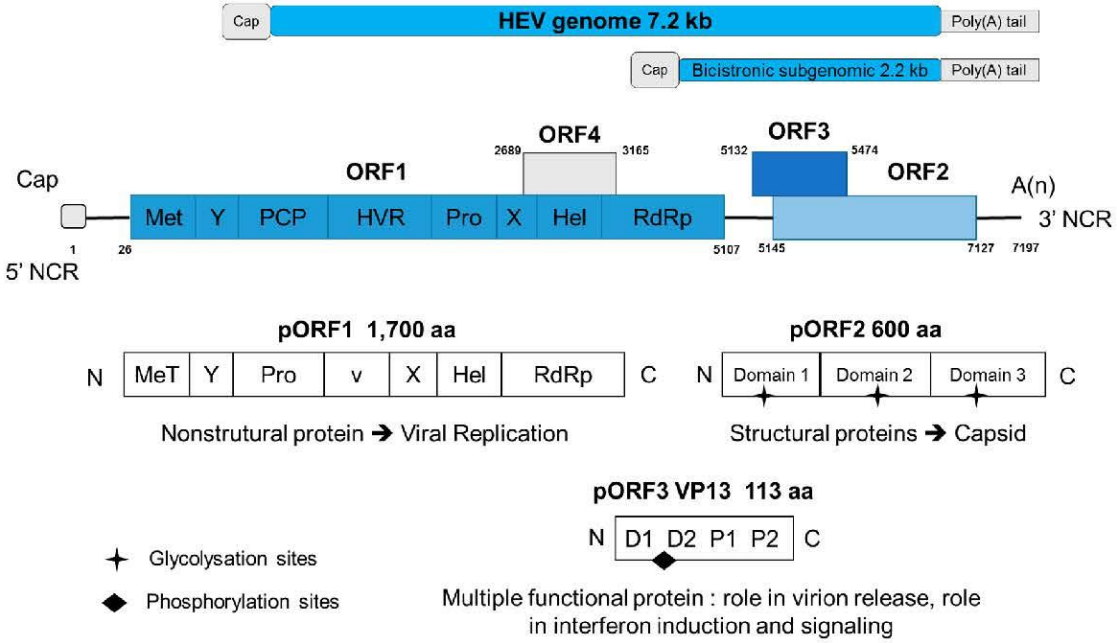


Figure 1. Organization of the Hepatitis E virus (HEV) genome, open reading frames (ORFs), and proteins. Methyltransferase (Met), Y domain (Y), papain-like cysteine protease (PCP), hypervariable region (HVR), proline-rich domain (PRO), X macrodomain (X), RNA helicase (Hel), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), non-coding region (NCR).

6. Putative Replication Cycle of HEV

Systems to cultivate HEV in vitro have been developed only recently, and the mechanism of viral replication remains hypothetical. An example of the putative cycle is presented in Figure 2 [52]. Studies including genome analyses and analogies with other known RNA viruses have made it possible to learn more about the replication of HEV. Unsurprisingly, the virus multiplies mainly in hepatocytes (the predominant cells in the liver), but a replication intermediate, viral RNA with negative polarity, has also been detected in the colon, intestine, and lymph nodes of pigs [53], as well as in the cerebrospinal fluid and heart of infected humans [54].

The cellular receptor for HEV is not yet known, but the presence of heparan sulfate proteoglycans appears to be necessary for the binding of the virus to target cells [55]. Additionally, experiments investigating ORF2 peptide binding suggested that the C-terminal region of ORF2 would allow the entry of the virus through binding to heat shock cognate protein 70 (Hsc70) on the cell surface [56].

Once it has bound, HEV enters the cell by endocytosis, which appears to be dynamin-2, clathrin, and membrane cholesterol-dependent [57,58]. The pathway of the virus within the cell remains unknown, but heat shock protein 90 (Hsp90) and tubulin could play a role in the intracellular transport of HEV virions [59]. Subsequently, the RNA is released in the cytoplasm of the cell, but the mechanisms and exact localization of this process have not been explored. Once the viral RNA is free in the cytosol, translation of the ORF1 polyprotein will occur because of its 5′ cap. Following the translation of methyltransferase, protease, helicase, and RNA polymerase activities, the genomic RNA is copied into a strand of negative RNA, which then allows the synthesis of genomic and subgenomic RNAs [60].

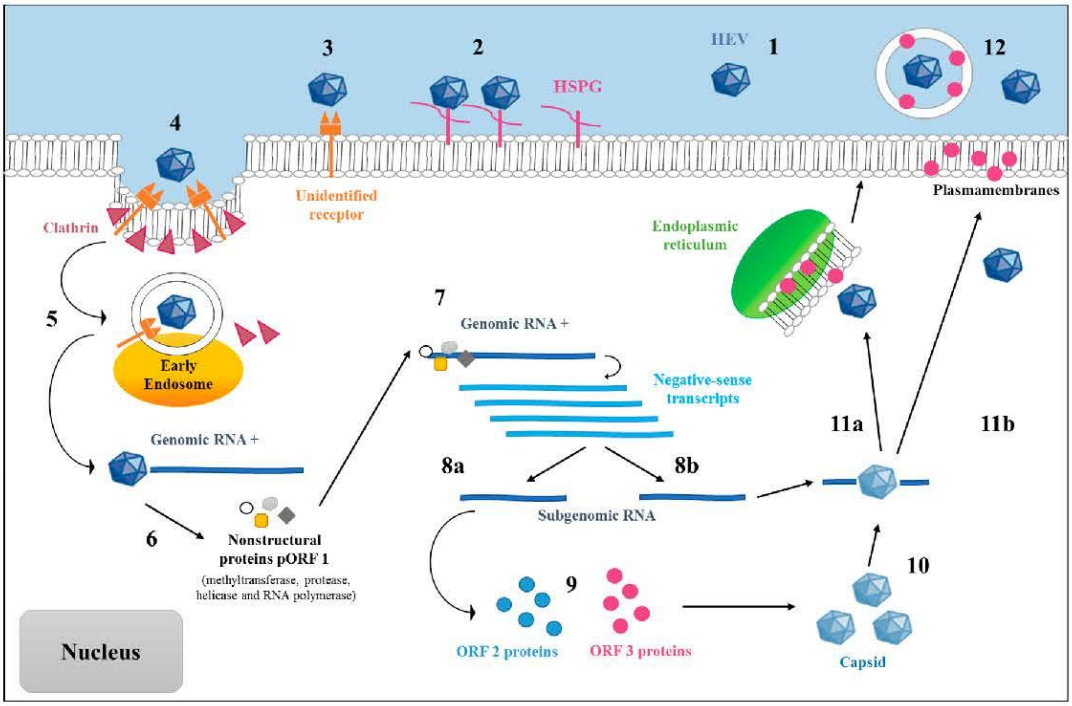


Figure 2. Putative replication cycle of HEV. Step 1: HEV in the extracellular environment. Step 2: Attachment of HEV to the target cell involving heat shock protein. Step 3: Receptor binding. Step 4: Clathrin-dependent endocytosis. Step 5: Encapsidation and liberation of genomic RNA. Step 6: RNA translated into nonstructural ORF-translated protein 1 (pORF1). Step 7: Replication of RNA+ into negative-sense transcripts. Step 8a: Synthesis of subgenomic RNA. Step 8b: Synthesis of full-length positive sense transcripts. Step 9: Translation of subgenomic RNA into ORF2 and ORF3 proteins. Step 10: Capsid formation and assemblage of new virions. Step 11a and 11b: Exit of the virus via the ORF3 proteins fixed on the endoplasmic membranes or the cell wall. Step 12: Mature virions attached to ORF3 protein and lipids (quasi-enveloped form in bloodstream) or free (in bile).

Rehman et al. have shown that the 3′ end of the genome binds specifically to the viral replicase on the surface of the endoplasmic reticulum [61]. ORF2 and ORF3 are translated subsequently to produce the structural proteins (capsid protein and phosphoprotein) that will allow the encapsidation of the newly synthesized viral RNA strands. This makes it possible to obtain new viral particles [40,62]; a glucose-regulated protein belonging to the Hsp70 family (Grp78) may play a role in the folding and assembly of the capsid proteins [63]. The proteins encoded by ORF2 and ORF3 interact, which suggests a role for ORF3 in the assembly of viral particles [64]. HEV is not cytolytic [65]. Moreover, studies have shown the requirement of the exosomal pathway for virion release [66,67]. Recent studies suggest that viruses secreted into the bloodstream are associated with the ORF3 protein and lipids, but viruses secreted into the bile are non-enveloped [66,68].

Recently, a new cell culture system has been developed that allows the detection of viral replication and protein expression very early post-transfection [69]. Time-course experiments showed that the ORF2 protein was produced early, and that large amounts were secreted into the supernatant of transfected cells. Interestingly, ORF2 and ORF3 proteins in cell lysate and cell supernatant migrated differently, indicating that these proteins likely undergo post-translational modifications during secretion.

7. Clinical

The course and clinical presentation of HEV infection is highly variable (Figure 3); the mechanisms leading to the different clinical outcomes are only partially understood [70–73].

7.1. Acute Hepatitis

In humans, the acute form of the disease can be caused by strains belonging to four genotypes: HEV-1, HEV2, HEV3, and HEV-4. Symptoms are resembling those of hepatitis A. Clinical manifestations are similar in developing and industrialized countries [70]. The incubation period ranges from 15 days to nine weeks (mean 40 days). The prodromal phase is quite variable, and can manifest as asthenia, fever, and digestive disorders for several days, followed by an icteric phase of two weeks; accordingly, it is not surprising that most cases remain undetected at the acute stage. Hepatitis is caused by an immune reaction directed towards the infected hepatocytes. Acute cytolytic hepatitis is the most common symptom. In most cases, the outcome is favorable, and biological parameters normalize within three months [74]. Cholestatic forms occur in 20% of cases [75].

Routine laboratory testing usually detects an increase in alanine and aspartate aminotransferase (ALT, AST) levels, accompanied by an increase of alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl-transferase (γGT), and bilirubin levels. The ALT level increases usually between 1000–3000 IU/L, but extreme values can be seen. ALT elevation is commonly higher than AST elevation. Cases where ALT is normal despite HEV RNA is detected during the acute stage have been described [76].

In industrialized countries, symptomatic HEV infections mostly affect men older than 55 years [77]. The mortality rate is 1–4%, which is higher than the mortality associated with acute hepatitis A (0.1–2.5%) [5]. However, these rates are likely overestimated, because they were calculated from symptomatic cases seen in hospitals. In the general population, the mortality rate ranges between 0.06–0.7% [78]. Cases leading to death correspond to the acute forms, which can become fulminant.

7.2. Fulminant Hepatitis

Occasionally (1–2% of cases), acute hepatitis can develop into fulminant hepatitis [79]. Fulminant hepatitis is frequent among people with underlying liver diseases in high-income countries after HEV infection [80]. Cases have been reported in several industrialized countries: the first cases were reported in Italy [81], Spain [82–84], France [85,86], and Japan [87,88]. Despite clinical specificities, there would not be a correlation between the severity of the disease and the genotype [89]. However, a case study in France showed that infection with genotype 4 could be more severe [90]. The limits of these studies are the small number of cases, so other studies are needed to clarify this point.

7.3. Chronicity

Chronicity is defined as a persistent viremia at least three to six months after the diagnosis [91]. AST and ALT are less elevated in patients who progress to chronic HEV infection; the mean ALT is 300 IU/L in chronic disease, and 1000 IU/L in acute disease [92]. There is no correlation between the viral load and the risk of progression to fibrosis [92].

Although the routes of infection (zoonotic transmission, consumption of infected products) do not differ between the general population and immunocompromised individuals, and the latter can also get infected via blood products or organ donation: transfusion and transplantation-associated cases have been described [93].

The majority of HEV chronic infections is observed with HEV-3, probably because it is the most commonly circulating genotype in industrialized countries [18,94–99].

However, chronic infections caused by strains belonging to genotype HEV-4 have been recently described [1,100]. Rapid evolution towards cirrhosis and graft rejection were observed. Cases have been reported in several industrialized countries [101–105].

7.4. Extrahepatic Manifestations

Many types of extrahepatic manifestations were reported in both acute and chronic infections [106]; among others, thrombocytopenia, kidney injury, hemolytic anemia, and pancreatitis were described [107–109]. Neurological signs are seen in 5% of cases [110,111]: Guillain–Barré syndrome (GBS), neuralgic amyotrophy, and encephalitis/meningoencephalitis/myositis were associated with acute forms [109]. Finally, HEV superinfection can aggravate previous liver diseases caused by alcohol, hepatitis C, or hepatitis B viruses [112,113]. Superinfection must be evoked in the presence of a brutal marked elevation of AST and ALT, or in the case of hepatic encephalopathy or renal impairment.

7.5. HEV Infection during Pregnancy

The majority of clinical studies and cases in pregnant women come from developing countries (central Africa and South East Asia, mostly) with genotype 1 and 2. In these highly endemic areas, mortality and vertical transmission rate is high, and severe forms occurred [5,114–119].

However, there are few cases reported during pregnancy in industrialized Western countries [120–124]. The first case reported of a pregnant woman infected by HEV with Gt3 in Europe was in a 41-year-old woman living in France [121]. This woman and her baby had no complications. A prospective study in France showed that, out of the 315 pregnant women participating, HEV prevalence was 7.74% [125]. HEV-3 and HEV-4 do not appear to cause fatal infections with fulminant hepatitis in pregnant women [120].

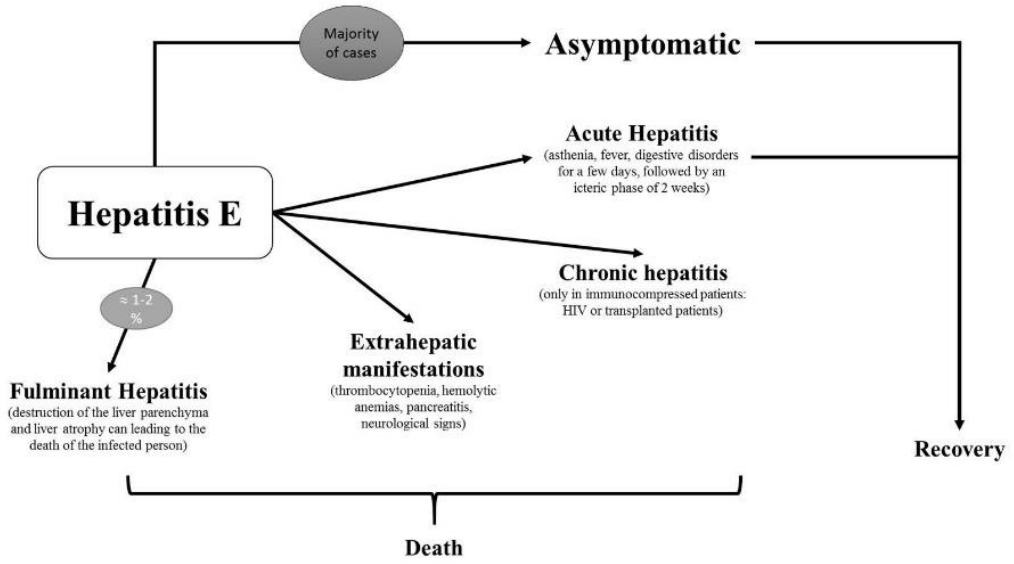


Figure 3. Different clinical forms of Hepatitis E.

8. Different Routes of Transmission

As a consequence of the high seroprevalence of HEV in industrialized countries, many questions arise about whether the consumption of contaminated pork is the unique source of infection. There is a growing interest for addressing alternative routes of infection linked with water, other animals, vertical transmission, and transfusion. Figure 4 summarizes all of the transmission pathways described or suspected in the literature.

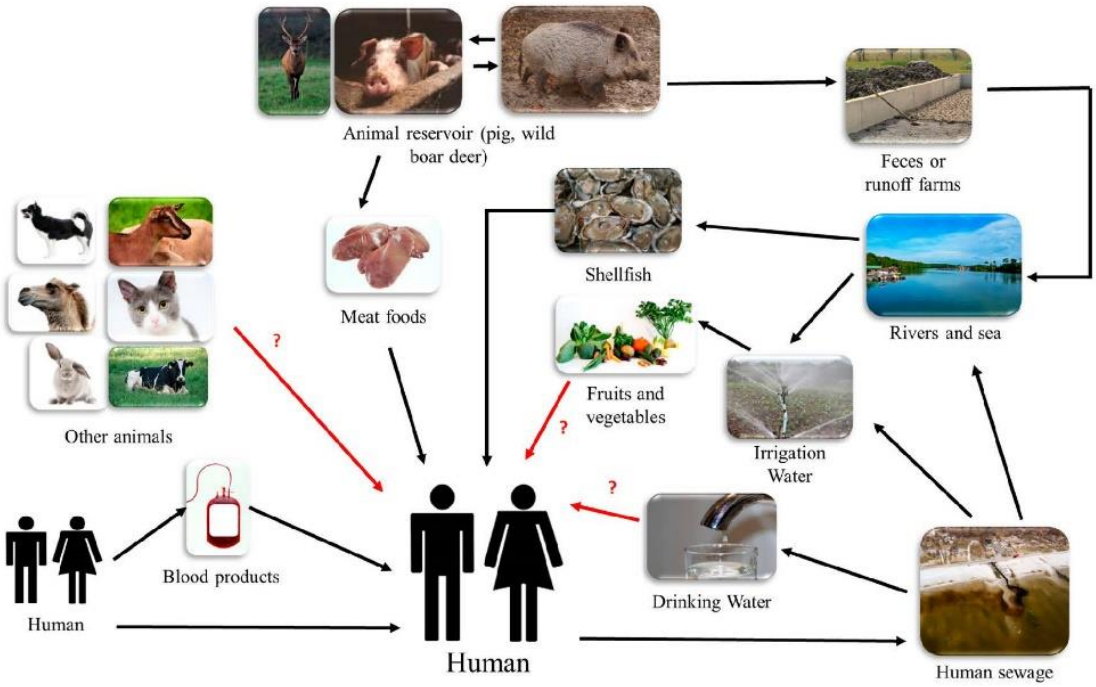


Figure 4. Diagram summarizing the different routes of transmission of HEV in high-income countries. Black arrows mean "confirmed transmission routes" and red arrows with "?" mean "suspected and not confirmed transmission routes".

8.1. Zoonotic Transmission

In industrialized countries, the infection of humans with HEV is believed to be zoonotic through the consumption of contaminated foods or by direct contact with infected animals.

In France, a correlation between HEV infection and consumption of the pork liver sausage, ficatellu, has been reported [126–128]. Ficatellu is a liver product that contains at least 30% pork liver, and does not undergo a heating step during production. One survey that analyzed food products in France showed that 30% of ficatelli samples were positive for the presence of HEV RNA [129]. In the Netherlands, the rate of HEV RNA was lower than in France, with a detection rate of 6.4% in commercial porcine livers [130]. The HEV RNA sequences were reported to have 93% homology with those detected in human HEV infection in the Netherlands, and 97% homology with previously isolated sequences from swine HEV infections. In Germany, raw and liver sausages were screened for HEV RNA, and 14 of 70 raw sausages (20%) and 11 of 50 liver sausages (22%) were positive. The detected HEV strains belonged to genotype 3, and showed high genetic variability [131].

A survey in the United States (USA) [132] demonstrated that the consumption of undercooked meat was associated with a higher rate of seropositivity for anti-HEV antibodies in college students. Moreover, three of 128 packages of food analyzed in Virginia were positive for HEV RNA (2.3%). In Australia, 55 cases of HEV infection were confirmed [133]. Of these, 24 people had not traveled during the incubation time, and 17 of these had eaten in the same restaurant. The HEV RNA detected was of genotype HEV-3, and 99% homology was found between the restaurant strain and that which was found in confirmed cases.

In Japan, an investigation was conducted in a patient who was infected by HEV after eating wild boar meat [134]. HEV-3 RNA was detected in his serum, in his daughter's serum, and in the wild boar meat. Venison consumption was repeatedly reported among HEV infected patients; confirmation of the source of infection was provided [135]: the patients ate venison a few weeks before the onset of symptoms, and the HEV RNA that was found in patients had the same sequence as that found in the leftover portions of venison. The virus has also been found in more surprising products such as herbs and spices: among the 230 samples tested, two were positive for HEV RNA [136].

In Switzerland, the prevalence of HEV RNA in 160 pig livers from different farms was 1.3% [137]. Another study had screened ready-to-eat meat products for Hepatitis E virus. Positive rates of 18.9% for liver sausages and 5.7% for raw meat sausages were estimated [138].

However, given the very high prevalence in regions where it is not common to eat uncooked or undercooked products containing pig liver or pig meat, it is legitimate to pursue investigations aiming at documenting other routes of infection.

8.2. Waterborne Transmission

The waterborne transmission of HEV (HEV-1 and HEV-2) occurs mainly in developing countries where wastewater treatment is inadequate. Since HEV exist in its non-enveloped form, it is resistant in the environment, and therefore, water-borne transmission is also possible in developed countries when untreated water is ingested.

8.2.1. Irrigation Water

The quality of irrigation water used in several countries in the production chains of fruits and vegetables was estimated [139]. Samples of irrigation water were collected in Finland, Poland, Serbia, and the Czech Republic (n = 108), and from three leafy green vegetable farms in Poland, Serbia, and Greece (n = 61). The two major origins of contamination of samples used to irrigate berry fruits were fecal contamination from human (8.3%, 9/108) and porcine (4.5%, 4/89). The samples were analyzed for the presence of several viruses, and HEV was identified in one country (5%, 1/20). HEV has also been found in frozen raspberries (2.6%) [140] and on field-grown strawberries [141]. The genotype identified was porcine genotype HEV-3. Irrigation water was the main suspect as the

origin of contamination. A metagenomic assessment of the viral contamination of fresh parsley plants in Spain demonstrated the presence of HEV-3f [142]. Among samples from fresh lettuce points of sale, HEV prevalence was 3.2% (4/125) [143].

In Turkey, a study [144] compared farms using treated water (control group) with those using untreated water (test group) for irrigation. The seroprevalence of HEV IgG that was observed among people working on the test group farms (and their families) was higher (34.8%) than that in people working on the control group farms (4.4%).

These reports indicate a possible route of contamination for vegetables and fruits irrigated with contaminated water or food contaminated during the food production chain. Indeed, some vegetables and fruits are consumed raw, which means that even if they are well washed, the virus could still be ingested by consumers.

8.2.2. Contaminated Environmental Water

In Italy, a study analyzed different types of samples (bivalves, water, and raw sewage) for hepatitis A virus and HEV [145]. HEV RNA was found in one sample of raw sewage and in one river sample; both isolates were HEV-3, and their sequences were similar to the human and swine sequences previously defined.

In Slovenia, using seroprevalence data obtained from a pig farm, 60 surface water samples were tested for HEV RNA, of which two were positive (3.3%); one positive specimen had been collected in the vicinity of a pig farm [146]. In Japan, HEV-3 RNA was detected in two of 32 bivalves collected in rivers [147]. In the Netherlands, 17% of surface water samples analyzed were positive for HEV RNA, which probably came from sewage [148]. After a person was infected, viral RNA was detected in the patient's serum and in the surface water collected in the vicinity of the patient's house [149].

8.2.3. Filter Feeders: Evidence of Water Contamination and Possible Route of Foodborne Transmission

Water can be contaminated by human wastewater or animal reservoirs, and indirectly infect animals living in water. The rate of HEV RNA detection in filter feeders such as mollusks ranges from 15% in Spain [150] to 85% in the United Kingdom [151]. HEV-3 was detected in two of 32 samples of bivalves mollusks collected from Japanese rivers [147]. In Spain, HEV detected in mollusks were genetically most closely related with viruses circulating in humans and swine. The infection of humans through the consumption of seafood has not been demonstrated, but several studies have pointed to mollusks and shellfishes consumption as probable routes of infection [152].

Although the presence of HEV is undisputable in the environment, low viral loads engage for performing infectivity studies to assess or infirm the role of water as a vector of epidemiological significance.

8.3. Risk of Transfusion-Related Transmission

The rate of HEV RNA blood products ranged from 1/726 in the Netherlands [153] to 1/74,131 in Australia [154]. Table 1 shows the rate of blood donations positive for HEV in different industrialized countries. The mean proportion positive was 0.0002 (range, 0.0001–0.0003), i.e., one positive for 5000 donations (1/5000).

Table 1. Rate of HEV detection in blood donations in different industrialized countries. USA: United States.

Country	Rate of Positive Blood Products	References
Australia	1/14,799; 1/74,131	[155]
Austria	1/8416	[156]
Denmark	1/2231	[157]
England	1/7040; 1/2848	[158,159]
France	1/2218; 1/744	[160,161]
Germany	1/1240; 1/4525	[162,163]
Ireland	1/4997	[164]
Japan	1/8173	[165]
Netherlands	1/2700; 1/726	[166]
Poland	1/1266	[167]
Scotland	1/14,520	[168]
Spain	1/3333	[169]
Sweden	1/7986	[111,163]
USA	1/9500; 0/51,075; 1/42,674	[170]

A case-control study reported the transmission of HEV by blood in transfused patients [171]. Markers of acute HEV infection were detected significantly more frequently in patients having received blood products (13/145) than in controls (2/250). Three susceptible transfused patients (seronegative for anti-HEV IgG) were infected with HEV, but no controls. Moreover, cases of associated HEV infections have been documented [105,172–176].

A recent study showed that the risk of HEV transmission to blood product recipients correlated with rates of positive blood donations, the viral load, and the volume of plasma in the final transfused blood component [177].

8.4. Sexual Transmission

Overall, very little data is available on Hepatitis E, unlike what is described for Hepatitis A. Men having sex with men (MSM) and HIV-infected MSM have a higher prevalence of HEV IgG than the general population in the same region [178–183]. So far, there is no direct evidence of transmission by sexual contact. However, in light of the recent findings showing that sperm is an excellent sanctuary for Ebola virus, Zika virus, and dengue virus, with documented cases resulting sexual transmission, such studies should also be performed for HEV.

8.5. Other Routes of Transmission

Few studies have been made concerning vertical transmission between mothers and their infants. High transmission rates were described, but these have so far been documented only in India; these were caused by HEV-1: 33.3% (6/18) [116], 46.09% (59/128) [184], and 78.9% (15/18) [185]. Another possible route of HEV transmission between mother and child was demonstrated by Ramos-Juarez et al. [186], who isolated HEV from the breast milk of a 34-year-old woman with HEV infection. In industrialized countries, the rare cases of infection reported in pregnant women (HEV-3) did not lead to infection in the newborn [120–123]. This genotype specificity deserves to be explored.

Nosocomial transmission of HEV seems very infrequent in industrialized countries. Indeed, very few cases were reported by this route. However, in France, a patient-to-patient transmission of Hepatitis E was described in a hematology ward [187]. The reported case became infected after contact with an undiagnosed chronically infected patient who resided in the same unit. HEV is very resistant, so important hygiene measures must be implemented when a case of Hepatitis E occurs in a unit, and especially when an at-risk patient is present.

9. Infection Markers and Diagnosis

The diagnosis of Hepatitis E by the study of clinical signs is quite complicated, because the majority of cases are asymptomatic, and the clinical forms are not specific. The detection of infection markers is therefore required to diagnose Hepatitis E or previous exposure to HEV. Different markers of HEV infection exist: anti-HEV IgG and IgM antibodies, viral genome in blood and body fluids, and alanine aminotransferase activity.

The anti-HEV immunoglobulin M appears first in the kinetics of post-infection markers. Peak detection occurs on average at the eighth week, and IgM are detectable up to 32 weeks after infection [188]. The detection of these IgM antibodies is a marker of recent infection, as is the presence of the viral genome in the blood and stool. The anti-HEV immunoglobulin G appears just after the IgM, and can be detected for years after the infection (immune memory) [189]. IgG are markers of an older infection. However, many studies have shown a very great heterogeneity between commercial tests for Hepatitis E virus IgG antibodies detection [190–193]. The Wantaï HEV-antigen (Ag) ELISA(Plus) assay for diagnosing acute HEV infections performed better than the others, with better sensitivity and specificity [194]. Moreover, it presented no sensitivity difference for diagnosis between immunocompetent and immunocompromised patients.

A viremia is observed a few days before the appearance of clinical manifestations, and disappears one to two weeks after it [195]. The amount of virus found varies by individual, but according to a study of 11 people in 2007, the viral load ranged from 2×10^3 to 1.7×10^7 genome copies per milliliter [196]. The presence of HEV in the stool is longer, as excretion begins one week before the onset of symptoms, and may last up to six weeks afterwards. However, in immunocompromised patients, this secretion can be considerably longer [102]. Stool viral load is in the range of 5.7×104 genome copies per milliliter [196]. The detection of the HEV genome is highly sensitive and specific for the diagnosis of Hepatitis E. The most commonly used technique is real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). It is therefore done from blood samples or stool, and the sequences targeted for the detection of HVE genome are ORF2 and ORF3.

Other marker of Hepatitis Exist, alanine-aminotransferase activity (ALAT) appears two to three weeks after infection with a peak in the sixth week, at the same time as the beginning of the icteric phase [197]. This enzyme activity is not specific for Hepatitis E, but shows symptoms in the liver. ALAT are moderately elevated in immunocompromised patients.

10. Treatment, Prevention, and Vaccine

Ribavirin and pegylated alpha interferon show some efficacy against HEV [65]. There is no recommendations for treating HEV infected patients with antiviral regimens. However, a combination of ribavirin and pegylated alpha interferon improved the condition of treated patients. The rapid clearance of HEV viremia permitted avoiding liver transplantation, although the absence of a control group prevents definitive conclusions. Interferon is not used in transplanted patients because of the risk of acute graft rejection.

A multicenter study has shown that ribavirin may be effective in the treatment of chronic HEV infection; indeed, a three-month course seemed to be a good duration of therapy for most patients. A sustained virologic response (SVR) occurred in 46 of the 59 patients (78%) [198]. When patients are under immunosuppressive therapy, reduction of the doses are primarily attempted, since curation is observed in 32% of cases [199]. Durable HEV clearance is observed in 85% of patients after three months of monotherapy, and can be pursued for another three months if viremia remains positive after the first three-month cure.

Liver transplantation is considered when there is fulminant hepatitis and the patient's condition is life-threatening.

While the main origins of HEV infection are known, several nonspecific means of prevention can be implemented. First, the treatment of wastewater and the quality of water in developing countries remain a major public health problem; untreated water is clearly a source of infection in both

developing and industrialized countries. Effective hand washing and correct preparation of "at-risk" foods (heated to >70 °C at the core) are also a means of prevention [128,200,201]. For pregnant women at high risk of fulminant hepatitis, the consumption of "at-risk" foods is strongly discouraged.

Despite the obvious risk of HEV transmission, prevention strategies are currently insufficient and infrequently implemented. Several studies have been undertaken to develop a human vaccine against HEV. Shrestha et al. [202] made a recombinant vaccine and obtained 95.5% efficacy with three doses. Nevertheless, this study did not evolve after phase two. Another study undertaken with more than 50,000 participants [203] showed a vaccine efficacy of 100% after 12 months and 86.8% (95% confidence interval 715–945) after a prolonged follow-up of 4.5 years [204]. People who received three doses (0, one, and six months) maintained their antibodies against HEV for at least 4.5 years. Currently, this vaccine against HEV has obtained approval from the Chinese government [204]; no vaccines are currently available in industrialized countries where HEV transmission is predominantly zoonotic. Therefore, it might be possible to reduce the risk of infection by eliminating the circulation of the virus in the most affected reservoir: pigs. In a modeling study, the effect on the dynamics of virus infection of a fictitious vaccine against late or early zoonotic porcine HEV was assessed. Later vaccination at 10 weeks reduced the proportion of infected pigs at the age of slaughter [205]. Therefore, vaccination of the main reservoir could be the optimal choice. Due to the large numbers of animals to vaccinate and the age at which they are slaughtered, the use of inert vaccines is not applicable. Inactivated vaccines are expensive to produce, and require at least two injections for effective protection. It would be better, in this context, to develop an attenuated live vaccine strain; this is not only cheaper to produce, but a single injection also provides protection similar to that seen after a natural infection [206].

However, the production of live attenuated vaccines is still based on empirical techniques that do not allow fine control or stabilization of the attenuation phenotype. Molecular determinants of attenuation are most often linked to a small number of protein changes. This means that there is a risk of phenotypic reversion, or in contrast, the protein changes can introduce new pathogenic traits that are different from those of the wild-type strain. Moreover, the methods that have been used to produce these vaccines do not make it possible to completely control the composition of the viral subpopulations between different vaccine batches.

11. What Do We still Need to Know?

- Even if zoonotic transmission has been identified as an important risk factor in high-come countries, the detection of HEV has been reported in several studies performed in environmental and irrigation water, sewage, and filter feeders. These results arise questions about the role of HEV in other routes of transmission and about its denomination as an environmental virus.
- The epidemiology of HEV in high-income countries is difficult to understand because of the small number of studies, the heterogeneity between them caused by the different assays used, and the type of population included. Gaps related to different suspected animal reservoirs, including food other than pork, need to be explored in order to improve the control and prevention of HEV.
- About the clinical part, the transition to chronicity and the real numbers of symptomatic cases are still poorly understood. Studies could be conducted to deepen knowledge.
- Concerning the replication cycle of HEV, many points are still unknown, especially on the HEV receptor cell and on the exact role of the pORF3 protein. Cell culture progress and discoveries in these areas could lead to advances in treatment and vaccines. A HEV vaccine is currently available in China, but not in other countries worldwide. The development of a vaccine in pigs could reduce the spread of the virus between species and humans.
- The discovery of "quasi-enveloped" HEV particles in blood raises questions about the effects on infectivity, immunity, transmission, and the virus replication cycle.
- Regarding prevention, despite the growing number of cases, Hepatitis E remains unknown to the general public. The population could be sensitized, particularly in the hyperendemic regions. Risky behaviors may thus decrease, especially among people at risk.

Author Contributions: L.C.: data mining and drafting of the manuscript; A.F. and R.C.: supervision manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Debing, Y.; Moradpour, D.; Neyts, J.; Gouttenoire, J. Update on Hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 200–212. [CrossRef] [PubMed]
2. Pavio, N.; Meng, X.J.; Renou, C. Zoonotic Hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 46. [CrossRef] [PubMed]
3. Kamar, N.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Xia, N.S.; Ijaz, S.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Hepatitis E. *Lancet* **2012**, *379*, 2477–2488. [CrossRef]
4. Dalton, H.R.; Bendall, R.; Ijaz, S.; Banks, M. Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8*, 698–709. [CrossRef]
5. Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 494–503. [CrossRef] [PubMed]
6. Lapa, D.; Capobianchi, M.R.; Garbuglia, A.R. Epidemiology of Hepatitis E virus in european countries. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25711–25743. [CrossRef] [PubMed]
7. Nelson, K.E.; Kmush, B.; Labrique, A.B. The epidemiology of Hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2011**, *9*, 1133–1148. [CrossRef] [PubMed]
8. Aspinall, E.J.; Couturier, E.; Faber, M.; Said, B.; Ijaz, S.; Tavoschi, L.; Takkinen, J.; Adlhoch, C. Hepatitis E virus infection in europe: Surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Eurosurveillance* **2017**, *22*. [CrossRef] [PubMed]
9. Khuroo, M.S. 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.* **1980**, *68*, 818–824. [CrossRef]
10. Balayan, M.S.; Andjaparidze, A.G.; Savinskaya, S.S.; Ketiladze, E.S.; Braginsky, D.M.; Savinov, A.P.; Poleschuk, V.F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **1983**, *20*, 23–31. [PubMed]
11. Reyes, G.R.; Purdy, M.A.; Kim, J.P.; Luk, K.C.; Young, L.M.; Fry, K.E.; Bradley, D.W. Isolation of a cdna from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **1990**, *247*, 1335–1339. [CrossRef] [PubMed]
12. Tam, A.W.; Smith, M.M.; Guerra, M.E.; Huang, C.C.; Bradley, D.W.; Fry, K.E.; Reyes, G.R. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **1991**, *185*, 120–131. [CrossRef]
13. Huang, C.C.; Nguyen, D.; Fernandez, J.; Yun, K.Y.; Fry, K.E.; Bradley, D.W.; Tam, A.W.; Reyes, G.R. Molecular cloning and sequencing of the mexico isolate of Hepatitis E virus (HEV). *Virology* **1992**, *191*, 550–558. [CrossRef]
14. Khuroo, M.S. Discovery of Hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* **2011**, *161*, 3–14. [CrossRef] [PubMed]
15. Teo, C.G. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of Hepatitis E. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 767–787. [CrossRef] [PubMed]
16. Bradley, D.W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* **1990**, *46*, 442–461. [CrossRef] [PubMed]
17. Emerson, S.U.; Purcell, R.H. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* **2003**, *13*, 145–154. [CrossRef] [PubMed]
18. Hoofnagle, J.H.; Nelson, K.E.; Purcell, R.H. Hepatitis E. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1237–1244. [CrossRef] [PubMed]
19. Takahashi, M.; Tanaka, T.; Takahashi, H.; Hoshino, Y.; Nagashima, S.; Jirintai; Mizuo, H.; Yazaki, Y.; Takagi, T.; Azuma, M.; 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*, 1112–1125. [CrossRef] [PubMed]

20. Chapuy-Regaud, S.; Dubois, M.; Plisson-Chastang, C.; Bonnefois, T.; Lhomme, S.; Bertrand-Michel, J.; You, B.; Simoneau, S.; Gleizes, P.E.; Flan, B.; et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* **2017**, *141*, 70–79. [CrossRef] [PubMed]
21. Feng, Z.; Hensley, L.; McKnight, K.L.; Hu, F.; Madden, V.; Ping, L.; Jeong, S.H.; Walker, C.; Lanford, R.E.; Lemon, S.M. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* **2013**, *496*, 367–371. [CrossRef] [PubMed]
22. Smith, D.B.; Simmonds, P.; International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group; Jameel, S.; Emerson, S.U.; Harrison, T.J.; Meng, X.J.; Okamoto, H.; Van der Poel, W.H.; Purdy, M.A. Consensus proposals for classification of the family hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2223–2232. [CrossRef] [PubMed]
23. Smith, D.B.; Simmonds, P.; Izopet, J.; Oliveira-Filho, E.F.; Ulrich, R.G.; Johne, R.; Koenig, M.; Jameel, S.; Harrison, T.J.; Meng, X.-J.; et al. Proposed reference sequences for Hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 537–542. [CrossRef] [PubMed]
24. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Tsang, A.K.; Joseph, M.; Wong, E.Y.; Tang, Y.; Sivakumar, S.; Xie, J.; Bai, R.; et al. New Hepatitis E virus genotype in camels, the middle east. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1044–1048. [CrossRef] [PubMed]
25. Takahashi, K.; Terada, S.; Kokuryu, H.; Arai, M.; Mishiro, S. A wild boar-derived Hepatitis E virus isolate presumably representing so far unidentified genotype 5. *Kanzo* **2010**, *51*, 536–538. [CrossRef]
26. Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Sato, H.; Sato, Y.; Jirintai; Nagashima, S.; Okamoto, H. Analysis of the full-length genome of a Hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 902–908. [CrossRef] [PubMed]
27. Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Nagashima, S.; Jirintai, S.; Kawakami, M.; Sonoda, Y.; Suzuki, T.; Yamamoto, S.; Shigemoto, K.; Ashida, K.; et al. Molecular characterization of a novel Hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* **2014**, *180*, 59–69. [CrossRef] [PubMed]
28. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Cao, K.Y.; Wernery, U.; Schountz, T.; Chiu, T.H.; Tsang, A.K.; Wong, P.C.; Wong, E.Y.; et al. New Hepatitis E virus genotype in bactrian camels, xinjiang, china, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2219–2221. [CrossRef] [PubMed]
29. Purdy, M.A.; Harrison, T.J.; Jameel, S.; Meng, X.J.; Okamoto, H.; Van der Poel, W.H.M.; Smith, D.B.; ICTV Report, C. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2645–2646. [CrossRef] [PubMed]
30. Panda, S.K.; Thakral, D.; Rehman, S. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* **2007**, *17*, 151–180. [CrossRef] [PubMed]
31. Koonin, E.V.; Gorbalenya, A.E.; Purdy, M.A.; Rozanov, M.N.; Reyes, G.R.; Bradley, D.W. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of Hepatitis E virus: Delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8259–8263. [CrossRef] [PubMed]
32. Kaur, M.; Hyams, K.C.; Purdy, M.A.; Krawczynski, K.; Ching, W.M.; Fry, K.E.; Reyes, G.R.; Bradley, D.W.; Carl, M. Human linear B-cell epitopes encoded by the Hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3855–3858. [CrossRef] [PubMed]
33. Holla, R.P.; Ahmad, I.; Ahmad, Z.; Jameel, S. Molecular virology of Hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.* **2013**, *33*, 3–14. [PubMed]
34. Suppiah, S.; Zhou, Y.; Frey, T.K. Lack of processing of the expressed ORF1 gene product of Hepatitis E virus. *Virol. J.* **2011**, *8*, 245. [CrossRef] [PubMed]
35. Sehgal, D.; Thomas, S.; Chakraborty, M.; Jameel, S. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virol. J.* **2006**, *3*, 38. [CrossRef] [PubMed]
36. Zafrullah, M.; Ozdener, M.H.; Kumar, R.; Panda, S.K.; Jameel, S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the Hepatitis E virus ORF2 protein. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4074–4082. [PubMed]
37. Jameel, S.; Zafrullah, M.; Ozdener, M.H.; Panda, S.K. Expression in animal cells and characterization of the Hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* **1996**, *70*, 207–216. [PubMed]
38. Surjit, M.; Jameel, S.; Lal, S.K. The ORF2 protein of Hepatitis E virus binds the 5′ region of viral RNA. *J. Virol.* **2004**, *78*, 320–328. [CrossRef] [PubMed]

39. Xing, L.; Wang, J.C.; Li, T.C.; Yasutomi, Y.; Lara, J.; Khudyakov, Y.; Schofield, D.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H.; Takeda, N.; et al. Spatial configuration of Hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* **2011**, *85*, 1117–1124. [CrossRef] [PubMed]
40. Graff, J.; Torian, U.; Nguyen, H.; Emerson, S.U. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of Hepatitis E virus. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5919–5926. [CrossRef] [PubMed]
41. Tang, X.; Yang, C.; Gu, Y.; Song, C.; Zhang, X.; Wang, Y.; Zhang, J.; Hew, C.L.; Li, S.; Xia, N.; et al. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of Hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10266–10271. [CrossRef] [PubMed]
42. Kamar, N.; Dalton, H.R.; Abravanel, F.; Izopet, J. Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 116–138. [CrossRef] [PubMed]
43. Graff, J.; Nguyen, H.; Yu, C.; Elkins, W.R.; St Claire, M.; Purcell, R.H.; Emerson, S.U. 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.* **2005**, *79*, 6680–6689. [CrossRef] [PubMed]
44. Emerson, S.U.; Nguyen, H.; Torian, U.; Purcell, R.H. ORF3 protein of Hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J. Virol.* **2006**, *80*, 10457–10464. [CrossRef] [PubMed]
45. Osterman, A.; Stellberger, T.; Gebhardt, A.; Kurz, M.; Friedel, C.C.; Uetz, P.; Nitschko, H.; Baiker, A.; Vizoso-Pinto, M.G. The Hepatitis E virus intraviral interactome. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13872. [CrossRef] [PubMed]
46. Dong, C.; Zafrullah, M.; Mixson-Hayden, T.; Dai, X.; Liang, J.; Meng, J.; Kamili, S. Suppression of interferon-alpha signaling by Hepatitis E virus. *Hepatology* **2012**, *55*, 1324–1332. [CrossRef] [PubMed]
47. Nan, Y.; Ma, Z.; Wang, R.; Yu, Y.; Kannan, H.; Fredericksen, B.; Zhang, Y.J. Enhancement of interferon induction by ORF3 product of Hepatitis E virus. *J. Virol.* **2014**, *88*, 8696–8705. [CrossRef] [PubMed]
48. Xu, J.; Wu, F.; Tian, D.; Wang, J.; Zheng, Z.; Xia, N. Open reading frame 3 of genotype 1 Hepatitis E virus inhibits nuclear factor-κB signaling induced by tumor necrosis factor-α in human A549 lung epithelial cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100787.
49. Takahashi, M.; Yamada, K.; Hoshino, Y.; Takahashi, H.; Ichiyama, K.; Tanaka, T.; Okamoto, H. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of Hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 1703–1713. [CrossRef] [PubMed]
50. Ding, Q.; Heller, B.; Capuccino, J.M.; Song, B.; Nimgaonkar, I.; Hrebikova, G.; Contreras, J.E.; Ploss, A. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1147–1152. [CrossRef] [PubMed]
51. Nair, V.P.; Anang, S.; Subramani, C.; Madhvi, A.; Bakshi, K.; Srivastava, A.; Shalimar; Nayak, B.; Ranjith Kumar, C.T.; Surjit, M. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 Hepatitis E virus. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005521. [CrossRef] [PubMed]
52. Ahmad, I.; Holla, R.P.; Jameel, S. Molecular virology of Hepatitis E virus. *Virus Res.* **2011**, *161*, 47–58. [CrossRef] [PubMed]
53. Williams, T.P.; Kasorndorkbua, C.; Halbur, P.G.; Haqshenas, G.; Guenette, D.K.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Evidence of extrahepatic sites of replication of the Hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 3040–3046. [CrossRef] [PubMed]
54. Kamar, N.; Izopet, J.; Cintas, P.; Garrouste, C.; Uro-Coste, E.; Cointault, O.; Rostaing, L. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am. J. Transplant.* **2010**, *10*, 1321–1324. [CrossRef] [PubMed]
55. Kalia, M.; Chandra, V.; Rahman, S.A.; Sehgal, D.; Jameel, S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the Hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12714–12724. [CrossRef] [PubMed]
56. Zhou, Y.; Emerson, S. P.302 heat shock cognate protein 70 may mediate the entry of Hepatitis E virus into host cells. *J. Clin. Virol.* **2006**, *36*. [CrossRef]
57. Kapur, N.; Thakral, D.; Durgapal, H.; Panda, S.K. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J. Viral Hepat.* **2012**, *19*, 436–448. [CrossRef] [PubMed]
58. Holla, P.; Ahmad, I.; Ahmed, Z.; Jameel, S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic* **2015**, *16*, 398–416. [CrossRef] [PubMed]

59. Zheng, Z.Z.; Miao, J.; Zhao, M.; Tang, M.; Yeo, A.E.; Yu, H.; Zhang, J.; Xia, N.S. Role of heat-shock protein 90 in Hepatitis E virus capsid trafficking. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1728–1736. [CrossRef] [PubMed]
60. Purdy, M.A.; Tam, A.W.; Huang, C.; Yarbough, P.; Reyes, G. Hepatitis E virus: A nonenveloped member of the α- like RNA virus supergroup. *Semin. Virol.* **1993**, *4*, 319–326. [CrossRef]
61. Rehman, S.; Kapur, N.; Durgapal, H.; Panda, S.K. Subcellular localization of Hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* **2008**, *370*, 77–92. [CrossRef] [PubMed]
62. Yamada, K.; Takahashi, M.; Hoshino, Y.; Takahashi, H.; Ichiyama, K.; Nagashima, S.; Tanaka, T.; Okamoto, H. ORF3 protein of Hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1880–1891. [CrossRef] [PubMed]
63. Yu, H.; Li, S.; Yang, C.; Wei, M.; Song, C.; Zheng, Z.; Gu, Y.; Du, H.; Zhang, J.; Xia, N. Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor grp78. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 987–995. [CrossRef] [PubMed]
64. Tyagi, S.; Korkaya, H.; Zafrullah, M.; Jameel, S.; Lal, S.K. 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.* **2002**, *277*, 22759–22767. [CrossRef] [PubMed]
65. Tanaka, T.; Takahashi, M.; Kusano, E.; Okamoto, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 903–911. [CrossRef] [PubMed]
66. Nagashima, S.; Jirintai, S.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Tanggis; Nishizawa, T.; Kouki, T.; Yashiro, T.; Okamoto, H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2166–2175. [CrossRef] [PubMed]
67. Nagashima, S.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Nishizawa, T.; Nishiyama, T.; Primadharsini, P.P.; Okamoto, H. Characterization of the quasi-enveloped Hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *J. Virol.* **2017**, *91*. [CrossRef] [PubMed]
68. Nagashima, S.; Takahashi, M.; Jirintai, S.; Tanaka, T.; Nishizawa, T.; Yasuda, J.; Okamoto, H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of Hepatitis E virions. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2838–2848. [CrossRef] [PubMed]
69. Montpellier, C.; Wychowski, C.; Sayed, I.M.; Meunier, J.C.; Saliou, J.M.; Ankavay, M.; Bull, A.; Pillez, A.; Abravanel, F.; Helle, F.; et al. Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 211–223. [CrossRef] [PubMed]
70. Aggarwal, R. Clinical presentation of Hepatitis E. *Virus Res.* **2011**, *161*, 15–22. [CrossRef] [PubMed]
71. EcHEVarria, J.M. Light and darkness: Prevalence of Hepatitis E virus infection among the general population. *Scientifica (Cairo)* **2014**, *2014*, 481016. [CrossRef] [PubMed]
72. Said, B.; Ijaz, S.; Kafatos, G.; Booth, L.; Thomas, H.L.; Walsh, A.; Ramsay, M.; Morgan, D.; Hepatitis, E.I.I.T. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1738–1744. [CrossRef] [PubMed]
73. Ahmed, A.; Ali, I.A.; Ghazal, H.; Fazili, J.; Nusrat, S. Mystery of Hepatitis E virus: Recent advances in its diagnosis and management. *Int. J. Hepatol.* **2015**, *2015*, 872431. [CrossRef] [PubMed]
74. Nicand, E.; Bigaillon, C.; Tesse, S. Hepatitis E: An emerging disease ? *Pathol. Biol.* **2009**, *57*, 203–221. [CrossRef] [PubMed]
75. Irshad, M. Hepatitis E virus: An update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology* **1999**, *42*, 252–262. [CrossRef] [PubMed]
76. Wedemeyer, H.; Pischke, S.; Manns, M.P. Pathogenesis and treatment of Hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1388–1397. [CrossRef] [PubMed]
77. Mansuy, J.M.; Mengelle, C.; Miedouge, M.; Abravanel, F.; Izopet, J. Viral Hepatitis E. *Arch. Pediatr.* **2009**, *16*, 717–720. [CrossRef]
78. Naik, S.R.; Aggarwal, R.; Salunke, P.N.; Mehrotra, N.N. A large waterborne viral Hepatitis E epidemic in kanpur, india. *Bull. World Health Organ.* **1992**, *70*, 597–604. [PubMed]
79. Dalton, H.R.; Hazeldine, S.; Banks, M.; Ijaz, S.; Bendall, R. Locally acquired Hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* **2007**, *369*, 1260. [CrossRef]
80. Xin, S.; Xiao, L. Clinical manifestations of Hepatitis E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *948*, 175–189. [PubMed]
81. Festa, S.; Garbuglia, A.R.; Baccini, F.; Panzuto, F.; Capobianchi, M.R.; Santino, I.; Purchiaroni, F.; Orgera, G.; Delle Fave, G.; Marignani, M. Acute fulminant Hepatitis E virus genotype 3E infection: Description of the first case in Europe. *Scand. J. Infect. Dis.* **2014**, *46*, 727–731. [CrossRef] [PubMed]

82. Mateos, M.L.; Molina, A.; Patier, J.L.; Moreira, V. Sporadic Hepatitis E in spain: Study of 9 autochthonous and 3 imported cases. *Med. Clin. (Barc)* **2005**, *125*, 118–119.
83. Mateos Lindemann, M.L.; Morales, J.G.; Fernandez-Barredo, S.; Dominguez, M.R.; Garcia de la Hoz, F.; Halfon, P.; Perez Gracia, M.T. Fulminant Hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 12–15. [CrossRef] [PubMed]
84. Mateos-Lindemann, M.L.; Diez-Aguilar, M.; Gonzalez-Galdamez, A.; Graus-Morales, J.; Moreno-Zamora, A.; Perez-Gracia, M.T. Acute, chronic and fulminant hepatitise: Seven years of experience (2004–2011). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2013**, *31*, 595–598. [CrossRef] [PubMed]
85. Doudier, B.; Verrot, D.; Serratrice, C.; Poucel, C.; Auguste, R.; Colson, P. Fatal outcome of autochthonous Hepatitis E in a patient with b cell lymphoma in southeastern france. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 339–342. [CrossRef] [PubMed]
86. Doudier, B.; Vencatassin, H.; Aherfi, S.; Colson, P. Fatal fulminant Hepatitis E associated with autoimmune hepatitis and excessive paracetamol intake in southeastern france. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1294–1297. [CrossRef] [PubMed]
87. Sainokami, S.; Abe, K.; Kumagai, I.; Miyasaka, A.; Endo, R.; Takikawa, Y.; Suzuki, K.; Mizuo, H.; Sugai, Y.; Akahane, Y.; et al. Epidemiological and clinical study of sporadic acute Hepatitis E caused by indigenous strains of Hepatitis E virus in japan compared with acute hepatitis a. *J. Gastroenterol.* **2004**, *39*, 640–648. [CrossRef] [PubMed]
88. Suzuki, K.; Aikawa, T.; Okamoto, H. Fulminant Hepatitis E in japan. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1456. [CrossRef] [PubMed]
89. Kumar, S.; Pujhari, S.K.; Chawla, Y.K.; Chakraborti, A.; Ratho, R.K. Molecular detection and sequence analysis of Hepatitis E virus in patients with viral hepatitis from north india. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *71*, 110–117. [CrossRef] [PubMed]
90. Jeblaoui, A.; Haim-Boukobza, S.; Marchadier, E.; Mokhtari, C.; Roque-Afonso, A.M. Genotype 4 Hepatitis E virus in france: An autochthonous infection with a more severe presentation. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, e122–e126. [CrossRef] [PubMed]
91. Kamar, N.; Garrouste, C.; Haagsma, E.B.; Garrigue, V.; Pischke, S.; Chauvet, C.; Dumortier, J.; Cannesson, A.; Cassuto-Viguier, E.; Thervet, E.; et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with Hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1481–1489. [CrossRef] [PubMed]
92. Murali, A.R.; Kotwal, V.; Chawla, S. Chronic Hepatitis E: A brief review. *World J. Hepatol.* **2015**, *7*, 2194–2201. [CrossRef] [PubMed]
93. Kamar, N.; Mallet, V.; Izopet, J. Ribavirin for chronic Hepatitis E virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 2447–2448. [CrossRef] [PubMed]
94. De Niet, A.; Zaaijer, H.L.; ten Berge, I.; Weegink, C.J.; Reesink, H.W.; Beuers, U. Chronic Hepatitis E after solid organ transplantation. *Neth. J. Med.* **2012**, *70*, 261–266. [PubMed]
95. Gerolami, R.; Moal, V.; Colson, P. Chronic Hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 859–860. [CrossRef] [PubMed]
96. Te, H.S.; Drobeniuc, J.; Kamili, S.; Dong, C.; Hart, J.; Sharapov, U.M. Hepatitis E virus infection in a liver transplant recipient in the united states: A case report. *Transplant. Proc.* **2013**, *45*, 810–813. [CrossRef] [PubMed]
97. Renou, C.; Lafeuillade, A.; Cadranel, J.F.; Pavio, N.; Pariente, A.; Allegre, T.; Poggi, C.; Penaranda, G.; Cordier, F.; Nicand, E. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS* **2010**, *24*, 1493–1499. [CrossRef] [PubMed]
98. Tavitian, S.; Peron, J.M.; Huynh, A.; Mansuy, J.M.; Ysebaert, L.; Huguet, F.; Vinel, J.P.; Attal, M.; Izopet, J.; Recher, C. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Virol.* **2010**, *49*, 141–144. [CrossRef] [PubMed]
99. Gauss, A.; Wenzel, J.J.; Flechtenmacher, C.; Navid, M.H.; Eisenbach, C.; Jilg, W.; Stremmel, W.; Schnitzler, P. Chronic Hepatitis E virus infection in a patient with leukemia and elevated transaminases: A case report. *J. Med. Case Rep.* **2012**, *6*, 334. [CrossRef] [PubMed]
100. Geng, Y.; Zhang, H.; Huang, W.; J Harrison, T.; Geng, K.; Li, Z.; Wang, Y. Persistent Hepatitis E virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat. Mon.* **2014**, *14*, e15618. [CrossRef] [PubMed]

101. Kamar, N.; Selves, J.; Mansuy, J.-M.; Ouezzani, L.; Péron, J.-M.; Guitard, J.; Cointault, O.; Esposito, L.; Abravanel, F.; Danjoux, M.; et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 811–817. [CrossRef] [PubMed]
102. Péron, J.-M.; Mansuy, J.-M.; Récher, C.; Bureau, C.; Poirson, H.; Alric, L.; Izopet, J.; Vinel, J.-P. Prolonged Hepatitis E in an immunocompromised patient. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *21*, 1223–1224. [CrossRef] [PubMed]
103. Dalton, H.R.; Bendall, R.P.; Keane, F.E.; Tedder, R.S.; Ijaz, S. Persistent carriage of Hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1025–1027. [CrossRef] [PubMed]
104. Behrendt, P.; Steinmann, E.; Manns, M.P.; Wedemeyer, H. The impact of Hepatitis E in the liver transplant setting. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1418–1429. [CrossRef] [PubMed]
105. Tamura, A.; Shimizu, Y.K.; Tanaka, T.; Kuroda, K.; Arakawa, Y.; Takahashi, K.; Mishiro, S.; Shimizu, K.; Moriyama, M. Persistent infection of Hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with t-cell lymphoma. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **2007**, *37*, 113–120. [CrossRef] [PubMed]
106. Aggarwal, R.; Jameel, S. Hepatitis E. *Hepatology* **2011**, *54*, 2218–2226. [CrossRef] [PubMed]
107. Colson, P.; Dhiver, C.; Gerolami, R. Hepatitis E virus as a newly identified cause of acute viral hepatitis during human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 1176–1180. [CrossRef] [PubMed]
108. Abid, S.; Khan, A.H. Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with Hepatitis E. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97*, 1544–1547. [CrossRef] [PubMed]
109. Kamar, N.; Marion, O.; Abravanel, F.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Extrahepatic manifestations of Hepatitis E virus. *Liver Int.* **2016**, *36*, 467–472. [CrossRef] [PubMed]
110. Deroux, A.; Brion, J.P.; Hyerle, L.; Belbezier, A.; Vaillant, M.; Mosnier, E.; Larrat, S.; Morand, P.; Pavese, P. Association between Hepatitis E and neurological disorders: Two case studies and literature review. *J. Clin. Virol.* **2014**, *60*, 60–62. [CrossRef] [PubMed]
111. Kamar, N.; Abravanel, F.; Lhomme, S.; Rostaing, L.; Izopet, J. Hepatitis E virus: Chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2015**, *39*, 20–27. [CrossRef] [PubMed]
112. Kumar, M.; Sharma, B.C.; Sarin, S.K. Hepatitis E virus as an etiology of acute exacerbation of previously unrecognized asymptomatic patients with hepatitis B virus-related chronic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *23*, 883–887. [CrossRef] [PubMed]
113. Monga, R.; Garg, S.; Tyagi, P.; Kumar, N. Superimposed acute Hepatitis E infection in patients with chronic liver disease. *Indian J. Gastroenterol.* **2004**, *23*, 50–52. [PubMed]
114. Dahiya, M.; Kumar, A.; Kar, P.; Gupta, R.K. Acute viral hepatitis in third trimester of pregnancy. *Indian J. Gastroenterol.* **2005**, *24*, 128–129. [PubMed]
115. Jilani, N.; Das, B.C.; Husain, S.A.; Baweja, U.K.; Chattopadhya, D.; Gupta, R.K.; Sardana, S.; Kar, P. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2007**, *22*, 676–682. [CrossRef] [PubMed]
116. Kumar, A.; Beniwal, M.; Kar, P.; Sharma, J.B.; Murthy, N.S. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2004**, *85*, 240–244. [CrossRef] [PubMed]
117. Shrestha, P.; Bhandari, D.; Sharma, D.; Bhandari, B.P. A study of viral hepatitis during pregnancy in nepal medical college teaching hospital. *Nepal Med. Coll. J.* **2009**, *11*, 192–194. [PubMed]
118. Prasad, G.S.; Prasad, S.; Bhupali, A.; Patil, A.N.; Parashar, K. A study of Hepatitis E in pregnancy: Maternal and fetal outcome. *J. Obstet. Gynaecol. India* **2016**, *66*, 18–23. [CrossRef] [PubMed]
119. Jaiswal, S.P.; Jain, A.K.; Naik, G.; Soni, N.; Chitnis, D.S. Viral hepatitis during pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2001**, *72*, 103–108. [CrossRef]
120. Lachish, T.; Erez, O.; Daudi, N.; Shouval, D.; Schwartz, E. Acute Hepatitis E virus in pregnant women in israel and in other industrialized countries. *J. Clin. Virol.* **2015**, *73*, 20–24. [CrossRef] [PubMed]
121. Anty, R.; Ollier, L.; Peron, J.M.; Nicand, E.; Cannavo, I.; Bongain, A.; Giordanengo, V.; Tran, A. First case report of an acute genotype 3 Hepatitis E infected pregnant woman living in south-eastern france. *J. Clin. Virol.* **2012**, *54*, 76–78. [CrossRef] [PubMed]
122. Shaikh, A.; Nelson-Piercy, C. Fulminant liver failure following Hepatitis E in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.* **2006**, *26*, 159–160. [CrossRef] [PubMed]

123. Tabatabai, J.; Wenzel, J.J.; Soboletzki, M.; Flux, C.; Navid, M.H.; Schnitzler, P. First case report of an acute Hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in germany. *J. Clin. Virol.* **2014**, *61*, 170–172. [CrossRef] [PubMed]
124. Lindemann, M.L.; Gabilondo, G.; Romero, B.; de la Maza, O.M.; Perez-Gracia, M.T. Low prevalence of Hepatitis E infection among pregnant women in madrid, spain. *J. Clin. Virol.* **2010**, *82*, 1666–1668. [CrossRef] [PubMed]
125. Renou, C.; Gobert, V.; Locher, C.; Moumen, A.; Timbely, O.; Savary, J.; Roque-Afonso, A.M. Prospective study of Hepatitis E virus infection among pregnant women in france. *Virol. J.* **2014**, *11*, 68. [CrossRef] [PubMed]
126. Renou, C.; Roque-Afonso, A.M.; Pavio, N. Foodborne transmission of Hepatitis E virus from raw pork liver sausage, france. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1945–1947. [CrossRef] [PubMed]
127. Berto, A.; Grierson, S.; Hakze-van der Honing, R.; Martelli, F.; Johne, R.; Reetz, J.; Ulrich, R.G.; Pavio, N.; Van der Poel, W.H.; Banks, M. Hepatitis E virus in pork liver sausage, france. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 264–266. [CrossRef] [PubMed]
128. Colson, P.; Borentain, P.; Queyriaux, B.; Kaba, M.; Moal, V.; Gallian, P.; Heyries, L.; Raoult, D.; Gerolami, R. Pig liver sausage as a source of Hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 825–834. [CrossRef] [PubMed]
129. Pavio, N.; Merbah, T.; Thebault, A. Frequent Hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, france. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1925–1927. [CrossRef] [PubMed]
130. Bouwknegt, M.; Lodder-Verschoor, F.; van der Poel, W.H.; Rutjes, S.A.; de Roda Husman, A.M. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the netherlands. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2889–2895. [CrossRef] [PubMed]
131. Szabo, K.; Trojnar, E.; Anheyer-Behmenburg, H.; Binder, A.; Schotte, U.; Ellerbroek, L.; Klein, G.; Johne, R. Detection of Hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in germany using an optimized method. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 149–156. [CrossRef] [PubMed]
132. Cossaboom, C.M.; Heffron, C.L.; Cao, D.; Yugo, D.M.; Houk-Miles, A.E.; Lindsay, D.S.; Zajac, A.M.; Bertke, A.S.; Elvinger, F.; Meng, X.J. Risk factors and sources of foodborne Hepatitis E virus infection in the united states. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 1641–1645. [CrossRef] [PubMed]
133. Yapa, C.M.; Furlong, C.; Rosewell, A.; Ward, K.A.; Adamson, S.; Shadbolt, C.; Kok, J.; Tracy, S.L.; Bowden, S.; Smedley, E.J.; et al. First reported outbreak of locally acquired Hepatitis E virus infection in australia. *Med. J. Aust.* **2016**, *204*, 274. [CrossRef] [PubMed]
134. Li, T.C.; Chijiwa, K.; Sera, N.; Ishibashi, T.; Etoh, Y.; Shinohara, Y.; Kurata, Y.; Ishida, M.; Sakamoto, S.; Takeda, N.; et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1958–1960. [CrossRef] [PubMed]
135. Tei, S.; Kitajima, N.; Takahashi, K.; Mishiro, S. Zoonotic transmission of Hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* **2003**, *362*, 371–373. [CrossRef]
136. Loisy-Hamon, F.; Leturnier, G. Autochthonous cases of Hepatitis E: Where does the virus come from? Impact of pig slurry treatment on reduction of the viral load and prevalence of the virus in food substrates. *EuroReference* **2015**, *18*, 13–18.
137. Muller, A.; Collineau, L.; Stephan, R.; Muller, A.; Stark, K.D. Assessment of the risk of foodborne transmission and burden of Hepatitis E in switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *242*, 107–115. [CrossRef] [PubMed]
138. Moor, D.; Liniger, M.; Baumgartner, A.; Felleisen, R. Screening of ready-to-eat meat products for Hepatitis E virus in switzerland. *Food Environ. Virol.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
139. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazic, S.; Soderberg, K.; Vasickova, P.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; et al. Virological quality of irrigation water in leafy green vegetables and berry fruits production chains. *Food Environ. Virol.* **2017**, *9*, 72–78. [CrossRef] [PubMed]
140. Maunula, L.; Kaupke, A.; Vasickova, P.; Soderberg, K.; Kozyra, I.; Lazic, S.; van der Poel, W.H.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.A.; et al. Tracing enteric viruses in the european berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 177–185. [CrossRef] [PubMed]
141. Brassard, J.; Gagne, M.J.; Genereux, M.; Cote, C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3763–3766. [CrossRef] [PubMed]
142. Fernandez-Cassi, X.; Timoneda, N.; Gonzales-Gustavson, E.; Abril, J.F.; Bofill-Mas, S.; Girones, R. A metagenomic assessment of viral contamination on fresh parsley plants irrigated with fecally tainted river water. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *257*, 80–90. [CrossRef] [PubMed]

143. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazic, S.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; Kaupke, A.; Legaki, E.; et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three european countries. *Food Environ. Virol.* **2012**, *4*, 179–191. [CrossRef] [PubMed]
144. Ceylan, A.; Ertem, M.; Ilcin, E.; Ozekinci, T. A special risk group for Hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *131*, 753–756. [CrossRef] [PubMed]
145. Iaconelli, M.; Purpari, G.; Della Libera, S.; Petricca, S.; Guercio, A.; Ciccaglione, A.R.; Bruni, R.; Taffon, S.; Equestre, M.; Fratini, M.; et al. Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in bivalve molluscs in italy. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 316–324. [CrossRef] [PubMed]
146. Steyer, A.; Naglic, T.; Mocilnik, T.; Poljsak-Prijatelj, M.; Poljak, M. Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 1732–1737. [CrossRef] [PubMed]
147. Li, T.C.; Miyamura, T.; Takeda, N. Detection of Hepatitis E virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (corbicula japonica) in japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 170–172. [PubMed]
148. Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; Lodder-Verschoor, F.; van den Berg, H.H.; Vennema, H.; Duizer, E.; Koopmans, M.; de Roda Husman, A.M. Sources of Hepatitis E virus genotype 3 in the netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 381–387. [CrossRef] [PubMed]
149. Borgen, K.; Herremans, T.; Duizer, E.; Vennema, H.; Rutjes, S.; Bosman, A.; de Roda Husman, A.M.; Koopmans, M. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the netherlands; a case series 2004–2006. *BMC Infect. Dis.* **2008**, *8*, 61. [CrossRef] [PubMed]
150. Mesquita, J.R.; Oliveira, D.; Rivadulla, E.; Abreu-Silva, J.; Varela, M.F.; Romalde, J.L.; Nascimento, M.S. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (mytilus galloprovinciallis), spain. *Food Microbiol.* **2016**, *58*, 13–15. [CrossRef] [PubMed]
151. Crossan, C.; Baker, P.J.; Craft, J.; Takeuchi, Y.; Dalton, H.R.; Scobie, L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, united kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 2085–2087. [CrossRef] [PubMed]
152. Mansuy, J.M.; Gallian, P.; Dimeglio, C.; Saune, K.; Arnaud, C.; Pelletier, B.; Morel, P.; Legrand, D.; Tiberghien, P.; Izopet, J. A nationwide survey of Hepatitis E viral infection in french blood donors. *Hepatology* **2016**, *63*, 1145–1154. [CrossRef] [PubMed]
153. Hogema, B.M.; Molier, M.; Sjerps, M.; de Waal, M.; van Swieten, P.; van de Laar, T.; Molenaar-de Backer, M.; Zaaijer, H.L. Incidence and duration of Hepatitis E virus infection in dutch blood donors. *Transfusion* **2016**, *56*, 722–728. [CrossRef] [PubMed]
154. Hoad, V.C.; Seed, C.R.; Fryk, J.J.; Harley, R.; Flower, R.L.P.; Hogema, B.M.; Kiely, P.; Faddy, H.M. Hepatitis E virus RNA in australian blood donors: Prevalence and risk assessment. *Vox Sang.* **2017**, *112*, 614–621. [CrossRef] [PubMed]
155. Shrestha, A.C.; Flower, R.L.; Seed, C.R.; Keller, A.J.; Harley, R.; Chan, H.T.; Hoad, V.; Warrilow, D.; Northill, J.; Holmberg, J.A.; et al. Hepatitis E virus RNA in australian blood donations. *Transfusion* **2016**, *56*, 3086–3093. [CrossRef] [PubMed]
156. Fischer, C.; Hofmann, M.; Danzer, M.; Hofer, K.; Kaar, J.; Gabriel, C. Seroprevalence and incidence of Hepatitis E in blood donors in upper austria. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119576. [CrossRef] [PubMed]
157. Harritshoj, L.H.; Holm, D.K.; Saekmose, S.G.; Jensen, B.A.; Hogema, B.M.; Fischer, T.K.; Midgley, S.E.; Krog, J.S.; Erikstrup, C.; Ullum, H. Low transfusion transmission of Hepatitis E among 25,637 single-donation, nucleic acid-tested blood donors. *Transfusion* **2016**, *56*, 2225–2232. [CrossRef] [PubMed]
158. Ijaz, S.; Szypulska, R.; Tettmar, K.I.; Kitchen, A.; Tedder, R.S. Detection of Hepatitis E virus RNA in plasma mini-pools from blood donors in england. *Vox Sang.* **2012**, *102*, 272. [CrossRef] [PubMed]
159. Hewitt, P.E.; Ijaz, S.; Brailsford, S.R.; Brett, R.; Dicks, S.; Haywood, B.; Kennedy, I.T.R.; Kitchen, A.; Patel, P.; Poh, J.; et al. Hepatitis E virus in blood components: A prevalence and transmission study in southeast england. *Lancet* **2014**, *384*, 1766–1773. [CrossRef]
160. Gallian, P.; Lhomme, S.; Piquet, Y.; Saune, K.; Abravanel, F.; Assal, A.; Tiberghien, P.; Izopet, J. Hepatitis E virus infections in blood donors, france. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1914–1917. [CrossRef] [PubMed]
161. Gallian, P.; Couchouron, A.; Dupont, I.; Fabra, C.; Piquet, Y.; Djoudi, R.; Assal, A.; Tiberghien, P. Comparison of Hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in french blood donors. *Transfusion* **2017**, *57*, 223–224. [CrossRef] [PubMed]

162. Vollmer, T.; Diekmann, J.; Johne, R.; Eberhardt, M.; Knabbe, C.; Dreier, J. Novel approach for detection of Hepatitis E virus infection in german blood donors. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2708–2713. [CrossRef] [PubMed]
163. Baylis, S.A.; Gartner, T.; Nick, S.; Ovemyr, J.; Blumel, J. Occurrence of Hepatitis E virus RNA in plasma donations from sweden, germany and the united states. *Vox Sang.* **2012**, *103*, 89–90. [CrossRef] [PubMed]
164. O'Riordan, J.; Boland, F.; Williams, P.; Donnellan, J.; Hogema, B.M.; Ijaz, S.; Murphy, W.G. Hepatitis E virus infection in the irish blood donor population. *Transfusion* **2016**, *56*, 2868–2876. [CrossRef] [PubMed]
165. Minagi, T.; Okamoto, H.; Ikegawa, M.; Ideno, S.; Takahashi, K.; Sakai, K.; Hagiwara, K.; Yunoki, M.; Wakisaka, A. Hepatitis E virus in donor plasma collected in japan. *Vox Sang.* **2016**, *111*, 242–246. [CrossRef] [PubMed]
166. Slot, E.; Hogema, B.M.; Riezebos-Brilman, A.; Kok, T.M.; Molier, M.; Zaaijer, H.L. Silent Hepatitis E virus infection in dutch blood donors, 2011 to 2012. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20550. [CrossRef] [PubMed]
167. Grabarczyk, P.; Sulkowska, E.; Gdowska, J.; Kopacz, A.; Liszewski, G.; Kubicka-Russel, D.; Baylis, S.A.; Corman, V.M.; Nocen, E.; Piotrowski, D.; et al. Molecular and serological infection marker screening in blood donors indicates high endemicity of Hepatitis E virus in poland. *Transfusion* **2018**, *58*, 1245–1253. [CrossRef] [PubMed]
168. Cleland, A.; Smith, L.; Crossan, C.; Blatchford, O.; Dalton, H.R.; Scobie, L.; Petrik, J. Hepatitis E virus in scottish blood donors. *Vox Sang.* **2013**, *105*, 283–289. [CrossRef] [PubMed]
169. Sauleda, S.; Ong, E.; Bes, M.; Janssen, A.; Cory, R.; Babizki, M.; Shin, T.; Lindquist, A.; Hoang, A.; Vang, L.; et al. Seroprevalence of Hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from catalonia (spain). *Transfusion* **2015**, *55*, 972–979. [CrossRef] [PubMed]
170. Stramer, S.L.; Moritz, E.D.; Foster, G.A.; Ong, E.; Linnen, J.M.; Hogema, B.M.; Mak, M.; Chia, C.P.; Dodd, R.Y. Hepatitis E virus: Seroprevalence and frequency of viral RNA detection among us blood donors. *Transfusion* **2016**, *56*, 481–488. [CrossRef] [PubMed]
171. Khuroo, M.S.; Kamili, S.; Yattoo, G.N. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2004**, *19*, 778–784. [CrossRef] [PubMed]
172. Matsubayashi, K.; Kang, J.H.; Sakata, H.; Takahashi, K.; Shindo, M.; Kato, M.; Sato, S.; Kato, T.; Nishimori, H.; Tsuji, K.; et al. A case of transfusion-transmitted Hepatitis E caused by blood from a donor infected with Hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* **2008**, *48*, 1368–1375. [CrossRef] [PubMed]
173. Arankalle, V.A.; Chobe, L.P. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: Evidence for post-transfusion Hepatitis E. *Vox Sang.* **2000**, *79*, 72–74. [CrossRef] [PubMed]
174. Mitsui, T.; Tsukamoto, Y.; Yamazaki, C.; Masuko, K.; Tsuda, F.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Okamoto, H. Prevalence of Hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in japan: Evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J. Med. Virol.* **2004**, *74*, 563–572. [CrossRef] [PubMed]
175. Bajpai, M.; Gupta, E. Transfusion-transmitted Hepatitis E: Is screening warranted? *Indian J. Med. Microbiol.* **2011**, *29*, 353–358. [PubMed]
176. Hoad, V.C.; Gibbs, T.; Ravikumara, M.; Nash, M.; Levy, A.; Tracy, S.L.; Mews, C.; Perkowska-Guse, Z.; Faddy, H.M.; Bowden, S. First confirmed case of transfusion-transmitted Hepatitis E in australia. *Med. J. Aust.* **2017**, *206*, 289–290. [CrossRef] [PubMed]
177. Izopet, J.; Lhomme, S.; Chapuy-Regaud, S.; Mansuy, J.M.; Kamar, N.; Abravanel, F. HEV and transfusion-recipient risk. *Trans. Clin. Biol.* **2017**, *24*, 176–181. [CrossRef] [PubMed]
178. Balayan, M.S.; Fedorova, O.E.; Mikhailov, M.I.; Rytick, P.G.; Eremin, V.F.; Danilova, T.I.; SHEVelev, B.I.; GorbacHEVa, E.C.; Pankova, G.Y. Antibody to Hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients. *J. Viral Hepat.* **1997**, *4*, 279–283. [CrossRef] [PubMed]
179. Christensen, P.B.; Engle, R.E.; Jacobsen, S.E.; Krarup, H.B.; Georgsen, J.; Purcell, R.H. High prevalence of Hepatitis E antibodies among danish prisoners and drug users. *J. Med. Virol.* **2002**, *66*, 49–55. [CrossRef] [PubMed]
180. Keane, F.; Gompels, M.; Bendall, R.; Drayton, R.; Jennings, L.; Black, J.; Baragwanath, G.; Lin, N.; Henley, W.; Ngui, S.L.; et al. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med.* **2012**, *13*, 83–88. [CrossRef] [PubMed]

181. Payne, B.A.; Medhi, M.; Ijaz, S.; Valappil, M.; Savage, E.J.; Gill, O.N.; Tedder, R.; Schwab, U. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, united kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 333–335. [CrossRef] [PubMed]
182. Politou, M.; Boti, S.; Androutsakos, T.; Valsami, S.; Pittaras, T.; Kapsimali, V. Seroprevalence of Hepatitis E in HIV infected patients in greece. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 1517–1520. [CrossRef] [PubMed]
183. Montella, F.; Rezza, G.; Di Sora, F.; Pezzotti, P.; Recchia, O. Association between Hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men. *Lancet* **1994**, *344*, 1433. [CrossRef]
184. Sharma, S.; Kumar, A.; Kar, P.; Agarwal, S.; Ramji, S.; Husain, S.A.; Prasad, S.; Sharma, S. Risk factors for vertical transmission of Hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **2017**, *24*, 1067–1075. [CrossRef] [PubMed]
185. Khuroo, M.S.; Kamili, S.; Khuroo, M.S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted Hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* **2009**, *16*, 519–523. [CrossRef] [PubMed]
186. Rivero-Juarez, A.; Frias, M.; Rodriguez-Cano, D.; Cuenca-Lopez, F.; Rivero, A. Isolation of Hepatitis E virus from breast milk during acute infection. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 1464. [CrossRef] [PubMed]
187. Mansuy, J.M.; Huynh, A.; Abravanel, F.; Recher, C.; Peron, J.M.; Izopet, J. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of Hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 373–374. [CrossRef] [PubMed]
188. Huang, S.; Zhang, X.; Jiang, H.; Yan, Q.; Ai, X.; Wang, Y.; Cai, J.; Jiang, L.; Wu, T.; Wang, Z.; et al. Profile of acute infectious markers in sporadic Hepatitis E. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13560. [CrossRef] [PubMed]
189. Khuroo, M.S.; Kamili, S.; Dar, M.Y.; Moecklii, R.; Jameel, S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* **1993**, *341*, 1355.
190. Bendall, R.; Ellis, V.; Ijaz, S.; Ali, R.; Dalton, H. 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.* **2010**, *82*, 799–805. [CrossRef] [PubMed]
191. Vollmer, T.; Diekmann, J.; Eberhardt, M.; Knabbe, C.; Dreier, J. Monitoring of anti-Hepatitis E virus antibody seroconversion in asymptomatically infected blood donors: Systematic comparison of nine commercial anti-HEV IgM and IgG assays. *Viruses* **2016**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
192. Avellon, A.; Morago, L.; Garcia-Galera del Carmen, M.; Munoz, M.; EcHEVarria, J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for Hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 1934–1939. [CrossRef] [PubMed]
193. Wenzel, J.J.; Preiss, J.; Schemmerer, M.; Huber, B.; Jilg, W. Test performance characteristics of anti-HEV igg assays strongly influence Hepatitis E seroprevalence estimates. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 497–500. [CrossRef] [PubMed]
194. Tremeaux, P.; Lhomme, S.; Chapuy-Regaud, S.; Peron, J.M.; Alric, L.; Kamar, N.; Izopet, J.; Abravanel, F. Performance of an antigen assay for diagnosing acute Hepatitis E virus genotype 3 infection. *J. Clin. Virol.* **2016**, *79*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
195. Aggarwal, R.; Kini, D.; Sofat, S.; Naik, S.R.; Krawczynski, K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute Hepatitis E. *Lancet* **2000**, *356*, 1081–1082. [CrossRef]
196. Takahashi, M.; Tanaka, T.; Azuma, M.; Kusano, E.; Aikawa, T.; Shibayama, T.; Yazaki, Y.; Mizuo, H.; Inoue, J.; Okamoto, H. Prolonged fecal shedding of Hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute Hepatitis E: Evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3671–3679. [CrossRef] [PubMed]
197. Kamar, N.; Izopet, J.; Pavio, N.; Aggarwal, R.; Labrique, A.; Wedemeyer, H.; Dalton, H.R. Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17086. [CrossRef] [PubMed]
198. Kamar, N.; Izopet, J.; Tripon, S.; Bismuth, M.; Hillaire, S.; Dumortier, J.; Radenne, S.; Coilly, A.; Garrigue, V.; D'Alteroche, L.; et al. Ribavirin for chronic Hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1111–1120. [CrossRef] [PubMed]
199. Kamar, N.; Rostaing, L.; Abravanel, F.; Garrouste, C.; Esposito, L.; Cardeau-Desangles, I.; Mansuy, J.M.; Selves, J.; Peron, J.M.; Otal, P.; et al. Pegylated interferon-alpha for treating chronic Hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, e30–e33. [CrossRef] [PubMed]
200. Barnaud, E.; Rogée, S.; Garry, P.; Rose, N.; Pavio, N. Thermal inactivation of infectious Hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5153–5159. [CrossRef] [PubMed]

201. Emerson, S.U.; Arankalle, V.A.; Purcell, R.H. Thermal stability of Hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 930–933. [CrossRef] [PubMed]
202. Shrestha, M.P.; Scott, R.M.; Joshi, D.M.; Mammen, M.P., Jr.; Thapa, G.B.; Thapa, N.; Myint, K.S.; Fourneau, M.; Kuschner, R.A.; Shrestha, S.K.; et al. Safety and efficacy of a recombinant Hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 895–903. [CrossRef] [PubMed]
203. Zhang, J.; Shih, J.W.; Wu, T.; Li, S.W.; Xia, N.S. Development of the Hepatitis E vaccine: From bench to field. *Semin. Liver Dis.* **2013**, *33*, 79–88. [CrossRef] [PubMed]
204. Zhang, J.; Zhang, X.F.; Huang, S.J.; Wu, T.; Hu, Y.M.; Wang, Z.Z.; Wang, H.; Jiang, H.M.; Wang, Y.J.; Yan, Q.; et al. Long-term efficacy of a Hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 914–922. [CrossRef] [PubMed]
205. Backer, J.A.; Berto, A.; McCreary, C.; Martelli, F.; van der Poel, W.H. Transmission dynamics of Hepatitis E virus in pigs: Estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics* **2012**, *4*, 86–92. [CrossRef] [PubMed]
206. Barrett, A.D. Current status of flavivirus vaccines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *951*, 262–271. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Annexe 2 Revue 2 : Epidémiologie du virus de l'hépatite E de la population humaine dans les pays industrialisés et méta analyse

Une revue de la littérature concernant l'épidémiologie de l'hépatite E en population humaine dans les pays industrialisés a été publiée dans le journal Viruses (IF : 3.811) le 20 Janvier 2019 (insérée ci-dessous) (Capai *et al.*, 2019b). La compréhension de l'épidémiologie du HEV dans les pays industrialisés en population humaine est complexe compte tenu du grand nombre d'études, de l'hétérogénéité des tests utilisés et des différents types de population inclus. Le but de cette revue était de faire un bilan sur la situation dans ces pays concernant l'épidémiologie humaine, avec notamment l'étude de l'exposition de la population au virus. Pour cela, cet article passe en revue la détection récente des marqueurs de l'infection au HEV parmi les populations humaines (donneurs de sang, population générale, population à risques et les enfants). De plus, une méta-analyse a été réalisée pour déterminer la séroprévalence globale des IgG anti-HEV dans la population générale dans les pays industrialisés avec le kit de détection IgG Wantai.

Résumé en français : Bien que l'hépatite E soit de plus en plus décrite comme une cause majeure de maladie du foie dans les pays industrialisés, l'épidémiologie dans ces pays reste assez complexe. Nous faisons ici une revue de la littérature concernant les études de cas groupés d'hépatite E et des études de séroprévalences menées dans les pays industrialisés sur différents types de populations. Les taux de séroprévalence retrouvés vont de <5% à > 50% selon les pays et les groupes de population. L'hétérogénéité existante entre les différents kits ELISA peut expliquer ces écarts, mais ce n'est pas la seule explication. Nous avons effectué une méta-analyse d'études réalisées avec le test ELISA Wantai HEV-IgG largement utilisé et avons mis en évidence des différences frappantes qui restent difficiles à comprendre avec les connaissances actuelles sur les voies de transmission.

viruses

MDPI

Review

Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature

Lisandru Capai [1,*], Alessandra Falchi [1,*] and Rémi Charrel [2,3]

1 EA7310 BIOSCOPE, Laboratoire de Virologie, Université de Corse-Inserm, 20250 Corte, France
2 Unité des Virus Emergents (UVE), Aix-Marseille Université, IRD 190, INSERM 1207, IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France; remi.charrel@univ-amu.fr
3 Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA
* Correspondence: capai_l@univ-corse.fr (L.C.); falchi@univ-corse.fr (A.F.); Tel.: +33-495-450-155 (L.C.); +33-495-450-677 (A.F.)

Received: 13 December 2018; Accepted: 18 January 2019; Published: 20 January 2019

Abstract: Although Hepatitis E is increasingly described as a major cause of liver disease in industrialized countries, the epidemiology is far from being fully elucidated. We provide here a comprehensive review of documented clusters of cases, and of serological studies conducted in populations with distinct types of exposure. Seroprevalence rates range from <5% to >50% depending on the countries and the groups of population. Such discrepancies can be attributed to the type of serological assay used, but this solves only a part of the problem. We performed a meta-analysis of studies performed with the broadly used Wantai HEV-IgG ELISA and found striking differences that remain difficult to understand with the current knowledge of transmission pathways.

Keywords: epidemiology; Hepatitis E virus; Meta-analysis; seroprevalence; industrialized countries

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the major cause of enterically transmitted hepatitis worldwide [1]. There are two contrasting situations around the world with regard to hepatitis E. On the one hand, in developing countries, transmission is mainly fecal-oral with poorly treated water playing a major role. In these countries, the incriminated genotypes are HEV-1 and HEV-2. On the other hand, in industrialized countries, although not all transmission pathways are well known [2], the main form of transmission is zoonotic with HEV-3 and HEV-4 genotypes [3,4]. A growing number of studies have been published concerning the seroprevalence of HEV antibodies in different human populations. Hyperendemic zones also appear in industrialized countries with seroprevalences of up to 70% in some regions. However, considerable heterogeneity exists depending upon either the type of method used or the population under study, or both. In high-income countries, where swine are the main reservoir, very high IgG anti-HEV seropositivity rates can be observed.

HEV is a small, single-stranded, positive-sense, RNA virus (~7.2 kb) [5]. HEV was initially known as a nonenveloped virus; however, another form has recently been identified. This form can be "masked" by the membrane of the host cells and is resistant to antibodies when it is in the blood [6,7]. When HEV particles are released by the cellular exosomal pathway, it is considered a "quasi-enveloped" virus. It contains genome coding for three open reading frames (ORF1, ORF2, and ORF3). In HEV genotype 1, a fourth ORF was discovered on ORF1, namely ORF4 [8]. HEV belongs to the Hepeviridae family [3]. Since 2015, this family has been divided into two genera, Orthohepevirus and Piscihepevirus [9,10]. Orthohepevirus contains four species named Orthohepevirus A to D. Currently, all strains isolated from humans belong to Orthohepevirus A in these five genotypes: HEV-1,

HEV-2, HEV-3, HEV-4, and HEV-7. Genotypes 1 and 2 only affect humans but other genotypes can also infect other mammals. Orthohepevirus B, C, and D consist of avian, rat/carnivore, and bat viruses, respectively. The genus Piscihepevirus includes a single species (A) whose typical isolate, cutthroat trout virus, infects trout, although its pathogenicity and full host range are unknown [11].

The balance between symptomatic and asymptomatic forms is not yet well known. Certainly, with the very high seroprevalence observed in certain "hyperendemic" regions and the number of clinical cases recorded, infection by HEV is predominantly asymptomatic [12–14]. However, there are different forms of clinical manifestations that can range from acute hepatitis to fulminant hepatitis (1–2% of cases) [15]. Extrahepatic forms may also exist, including neurological disorders, thrombocytopenia, kidney injury, hemolytic anemia, and pancreatitis [16–18]. Chronic infections have been reported in most cases with genotype 3 infection in immunocompromised people in industrialized countries [19–25]. Recently, new chronic infections have been found to have been caused by genotype 4 [1,26–31].

Our understanding of the epidemiology of HEV in industrialized countries for human populations is complicated given the large number of studies, the heterogeneity of the laboratory tests used, and the different types of population included. The purpose of this review is to summarize the situation in industrialized countries with regard to humans. We review the recent detection of HEV markers and grouped cases among humans. Furthermore, a meta-analysis was performed to determine the overall seroprevalence of anti-HEV IgG in the general population in industrialized countries.

2. Seroprevalence of IgG anti-HEV

Anti-HEV IgG antibodies represent a marker of previous exposure to HEV. However, wide variations in sensitivity and specificity rates of various anti-HEV IgG assays make the interpretation of seroepidemiological studies of HEV infection difficult [32–34].

2.1. Seroprevalence of IgG anti-HEV with Wantai HEV-IgG ELISA Assay

Currently, the Wantai assay is the most commonly used assay with specificity and sensitivity for the HEV IgG of 97.96% and 99.6%, respectively [35,36]. In addition, other studies showed a better detection rate with the Wantai assay than other assays and this difference was probably not due to false positives [37,38]. Indeed, Wantai assay shows very low seroprevalences in children or some countries and increasing values with age [39,40]. Moreover, the main part of positives samples was confirmed by immunoblot [37].

As shown in Table 1, the non-Wantai assays underestimate HEV seroprevalence. A Danish study estimated seroprevalences of 10.7% and 19.8% for HEV antibodies depending on the assay used for NIH and Wantai, respectively [41]. The prevalence of IgG anti-HEV in Catalan blood donors was 19.96% (Wantai assay) and 10.72% (Mikrogen assay) [42]. We can also compare the use of different assays in different studies of the same population. Two studies in the Czech Republic, using different assays, found seroprevalences in BD of 5.7% and 6.7% [43,44]. Although the percentages here are similar, this is not always the case. The seroprevalence rate in France ranges from 3.2% to 22.4% depending on the type of detection assay (Genelabs Diagnostics vs. Wantai) [45,46].

Of the 5 studies which have tested the same sera using at least 2 different methods, the Wantai IgG kit was used on 4 occasions: in all of these 4 cases, the prevalence of IgG observed with the Wantai IgG kit was higher than that obtained with other kits [41–43,47,48].

Table 1. HEV IgG prevalences observed when the same population is tested using different assays.

Country	Population	Assay	Number of Samples	Seroprevalence anti-HEV IgG (%)	Reference
Denmark	BD	Wantai	504	19.80	[41]
		NIH		10.70	
Spain	BD	Wantai	9998	19.96	[42]
		Mikrogen		10.72	
Czech Republic	GP	Mikrogen	1715	6.70	[43]
		Diagnostic Bioprobes	230	5.70	[44]
France	BD	Wantai	10,569	22.4	[45]
		Genelabs Diagnostics	1998	3.20	[46]
New Zealand	BD	Wantai	1013	9.70	[47]
		MP Diagnostics		8.10	
USA	BD	Wantai	5040	12.28	[48]
		DSI		11.29	
		MP Diagnostics		10.65	

BD, blood donors; GP, general population. Lists of assays: Wantai: HEV-IgG ELISA; NIH, in-house assay developed at the National Institutes of Health, Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Diagnostic Bioprobes: ELISA kit HEV; Genelabs diagnostics: HEV ELISA; MP Diagnostic: HEV ELISA; DSI, Diagnostic Systems Incorporated.: DS-EIA-ANTI-HEV-G.

2.2. *Meta-Analysis*

A meta-analysis was carried out in accordance with the "Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses" (PRISMA) guide [49].

2.2.1. Literature Search, Selection Criteria, and Study Quality

A literature search was made in PubMed using the keywords "hepatitis E seroprevalence" or "hepatitis E blood donors".

Selection was based on title and abstract, and excluded studies older than 10 years and those where samples were collected before 2003, reviews, animal studies, and studies with a sample size smaller than 20 individuals or sera. The populations retained were the general population and the blood donors. No language restrictions were applied. Only studies regarding seroprevalence rates in industrialized countries with Wantai assay were included. Original abstracts were obtained and assessed in detail for inclusion. Following the abstract review, the full papers of the included studies were reviewed (Figure 1).

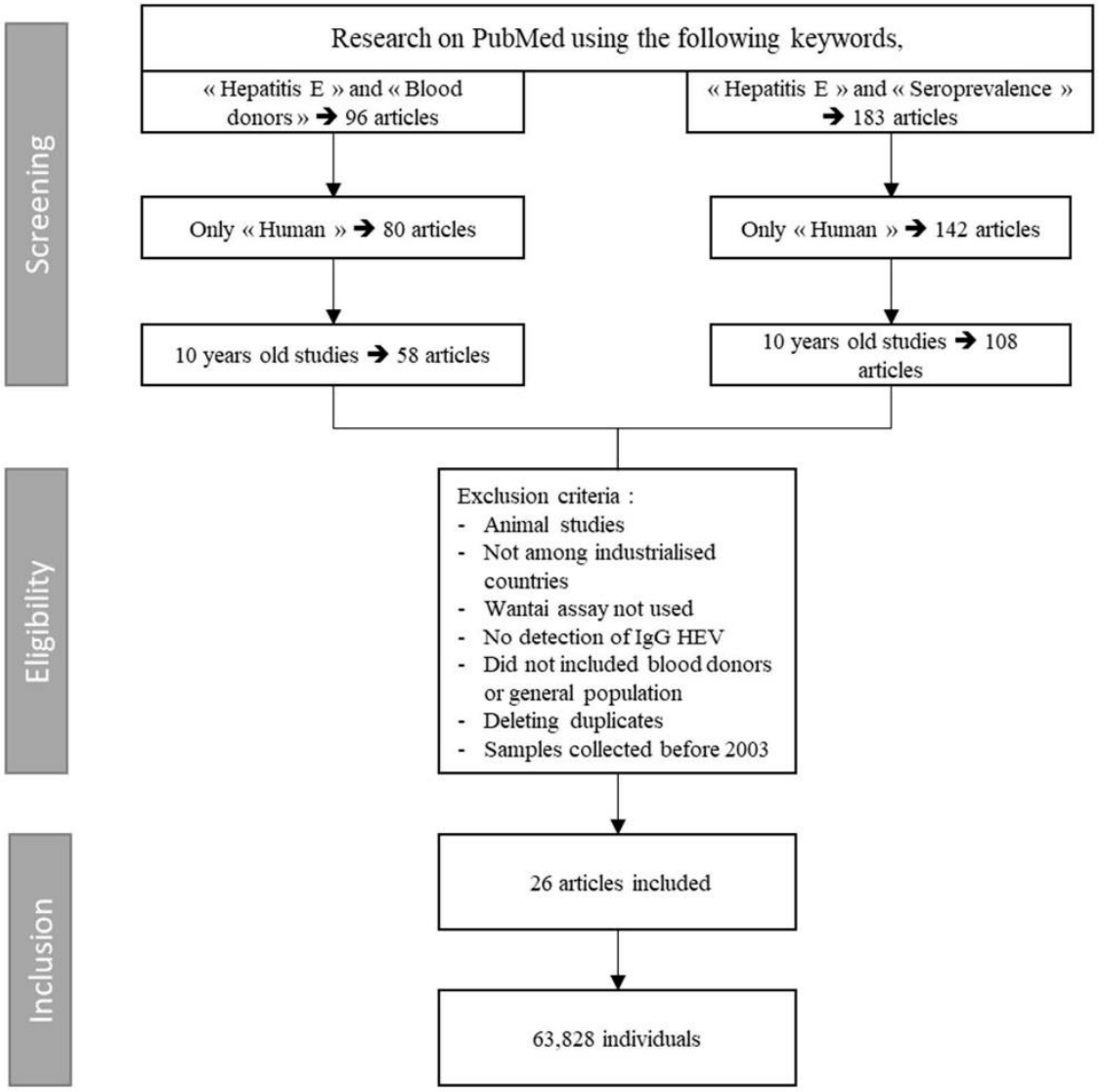


Figure 1. Search algorithm for meta-analysis: HEV IgG seroprevalence among blood donors.

2.2.2. Data Extraction

Information was extracted from each study included authors, journal, year of publication, country, diagnostic assay used, number of patients, positive events, seroprevalence, and kind of patient cohort. Data were stratified for three variables: assay employed, country of study, and nature of study cohort. We focused on different study cohorts: general population/blood donors, immunocompromised patients, and individuals with contact with swine/wild animals. The latter included veterinarians, farmers, hunters, forestry workers, and pig farm workers.

2.2.3. Statistical Analysis

The overall seroprevalence of anti-HEV IgG in industrialized countries was estimated by pooling the study data to run a meta-analysis. The analysis was conducted using the R statistical platform (version 3.1.2) and the metafor package (version 1.9-5) [50]. The I2 statistic was used to estimate the amount of heterogeneity accounted for by each model [51]. We used the double arcsine transformation method for variance stabilization [52] and a restricted maximum likelihood (REML) estimator for prevalence estimation.

2.2.4. Results of Meta-Analysis: Human Seroprevalence of IgG anti-HEV

A total of 26 studies from 15 countries were included in the meta-analysis of seroprevalence in industrialized countries using Wantai assays. The overall seroprevalence of IgG anti-HEV calculated was 19% [14–25%] and the I2 showed high heterogeneity (100%) (Figure 2). Given the heterogeneity between studies, the random effects model was chosen. Reported seroprevalences ranged from 4.2% to 52.5% [40,53]. The 26 studies comprised a total of 63,828 individuals. The list of references associated with the studies of the meta-analysis is present in the Table 2.

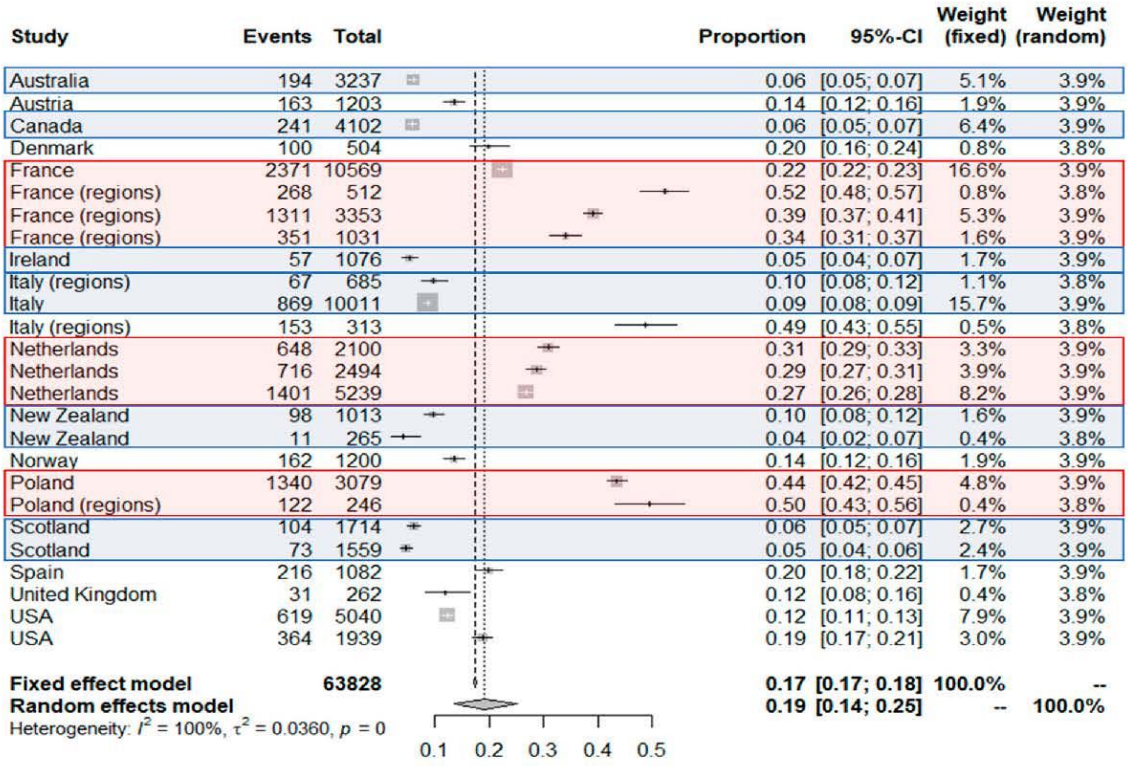


Figure 2. Results of the meta-analysis: Seroprevalence among blood donors in industrialized countries using Wantai HEV-IgG ELISA assay. Red areas correspond to countries with seroprevalence higher than the overall seroprevalence and blue areas to those with lower value. Black crosses correspond to the seroprevalence value of each study. The size of the grey square around the cross depend on the number of samples of each study included (weight). Black bars around the point correspond to the confidential interval. The additional data for each study included in the meta-analysis are presented in Table 2.

2.2.5. Interpretation of Meta-Analysis

France, Poland, and the Netherlands appear as countries with the highest seroprevalences. France has a fairly average national seroprevalence but regions of hyperendemias appear. For the Netherlands and Poland, the data of the different studies are homogeneous around 30% and 50% respectively. New Zealand, Scotland, Australia, Canada, and Ireland have seroprevalence under 10%. A special case appears with studies in Italy. In fact, for this country very distant seroprevalences have been observed, and hyperendemic zones could also exist in this country. Interestingly, in the 6 countries where at least 2 studies were done, the order of magnitude is well observed, specifically in the Netherlands (0.27; 0.29; 0.31), in Poland (0.44; 0.50), in Scotland (0.05; 0.06), in New Zealand (0.04; 0.1); in France, rates at 0.22 (national), 0.34 (Southwest France), 0.39 and 0.52 (Southern France) were observed; in Italy, the 3 studies provided very different rates at around 0.09 (national and Northern Italy) and 0.49 (Central Italy): These high differences in some regions may be explained by local eating habits or environmental HEV contamination.

Table 2. Comparison of seroprevalence rates observed with the Wantai HEV-IgG ELISA assay in blood donors (BD) and the general population (GP) (data used for meta-analyses). "Country (regions)" means the seroprevalence is at regional level.

Country	Population	Number of Samples	Positive Samples	Seroprevalence anti-HEV IgG (%)	Reference
France (regions)	BD	512	268	52.5	[40]
Poland (regions)	BD	246	122	49.6	[54]
Italy (regions)	BD	313	153	49	[55]
Poland	BD	3079	1340	43.52	[56]
France (regions)	BD	3353	1311	39.1	[57]
France (regions)	BD	1031	351	34	[58]
Netherlands	BD	2100	648	31	[59]
	GP	2494	716	28.7	[60]
	BD	5239	1401	27	[61]
France	BD	10,569	2371	22.4	[45]
Spain	BD	1082	216	19.96	[42]
Denmark	BD	504	100	19.8	[41]
USA	BD	1939	364	18.8	[62]
Norway	BD	1200	162	14	[63]
Austria	BD	1203	163	13.55	[64]
USA	BD	5040	619	12.28	[48]
UK	BD	262	31	12	[65]
Italy (regions)	BD	685	67	9.8	[66]
New Zealand	BD	1013	98	9.7	[47]
Italy	BD	10,011	869	8.7	[67]
Scotland	BD	1714	104	6.1	[68]
Australia	BD	3237	194	5.99	[69]
Canada	BD	4102	241	5.9	[70]
Ireland	BD	1076	57	5.3	[71]
Scotland	BD	1559	73	4.7	[72]
New Zealand	BD	265	11	4.2	[53]

2.3. High-Exposure Populations

People working in contact with animals (forest workers, hunters, pig and other farm workers) appeared as categories with higher seroprevalences (Table 3). It is impossible to compare studies that have not used the same assays. On the other hand, some studies have compared, under the same conditions, a GP with an "exposed population" (range 13.4–31.2%) [73,74]. While these studies were not conducted with the Wantai HEV-IgG ELISA assay, most of them were performed compared with a reference population. Accordingly, it can be deduced that selected populations are at higher risk of HEV infection such as pig farm workers or human with occupational exposure to pigs [73,75–78], forest workers [74,78,79], and farm workers [63]. Interestingly, veterinarians do not appear always as having a higher risk of infection [63,80,81]. However, the type of veterinarian activity (rural or urban) may greatly influence the risk of exposure to HEV as shown in Norway where seroprevalence in veterinarians working with swine was two times higher compared to those who did not work with swine [63].

Table 3. HEV IgG rates observed in different populations.

Country	Population	Assay	Number of Samples	Seroprevalence anti-HEV IgG (%)	*p*	OR [CI95]	References
Estonia	H	Mikrogen	144	4.2	0.02	3.54 [1.07; 12.69]	[73]
	PFW		67	13.4			
Germany	BD	Mikrogen	301	11	0.0076	1.77 [1.15; 2.794]	[79]
	FW		563	18			
	GP		106	28.3	0.02	2.14 [1.06; 4.41]	[82]
	PFW		116	15.5			
Norway	BD	Wantai	1200	14	*NS*, $p > 0.05$		[63]
	V		163	13			
	FaW		79	30	0.00028	2.68 [1.54; 4.53]	
Portugal	GP	Mikrogen	804	19.9	0.01	1.78 [1.12; 2.79]	[76]
	PFW		114	30.4			
Spain	GP	ND	325	7.3	0.002	2.89 [1.42; 5.82]	[83]
	PFW		101	19			
Finland	GP	Axiom	52	5.8	*NS*, $p > 0.05$		[80]
	V		333	10.2			
USA	BD	In-house assay	400	18	0.005	1.60 [1.14; 2.26]	[77]
	PFW		468	26			
France	FW	MP Diagnostics	593	31.2	/	/	[74]
	GP		322	26	0.007	1.61 [1.13; 2.30]	[78]
	FW		306	36.4			
	PFW		231	43.8	0.0000017	2.19 [1.51; 3.21]	
Italy	BD	BioChain Institute	170	8.82	0.0007	3.30 [1.53; 8.15]	[81]
	V		83	9.64			
Poland	H	ND	210	3.81	/	/	[84]

H: Hunters; PFW: Pig farm workers or with occupational contact with pigs; BD: blood donors; FW: Forest workers; FaW: Farmworkers; V: Veterinarians; GP: General population. Lists of assays: Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Axiom: HEV IgG EIA; MP Diagnostic: HEV ELISA; Biochain: ELISA Kit for IgG Antibody to Hepatitis E Virus ND: assay not determined.

2.4. Children

The few studies conducted in children consistently reported low seroprevalence rates: <5% in the USA, 4.2% in Turkey, 4.6% in Spain, 1.4% in Russia and 1.1% in Portugal [85–89] (Table 4).

Table 4. HEV IgG prevalence observed in children.

Country	Population	Assay	Number of Samples	Seroprevalence anti-HEV IgG (%)	Reference
USA	CH	ND	18,695	<5	[85]
Spain	CH	Biokit	1249	4.6	[86]
Turkey	CH	Diagnostic Bioprobes	408	4.2	[87]
Russia	CH	ND	3122	1.4	[88]
Portugal	CH	Mikrogen	352	1.1	[89]

CH: children. Lists of assays: Biokit: bioelisa HEV IgM 3.0; Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Euroimmun: Anti IgG HEv ELISA; Diagnostic Bioprobes: HEV IgG. ND: not determined assay.

2.5. Other Seroprevalences Observed in Industrialized Countries

Several studies have determined HEV seroprevalence through using assays other that the Wantai HEV-IgG ELISA. Seropositivity rates ranged between 1.9% in the Netherlands and 16.8% in Germany (Mikrogen) (Table 5) [90,91]. However, it is difficult to interpret these results and to compare results obtained by using different kits as previously indicated. These values may be useful whether the same kit is used in future studies or to compare exposure in different countries, in different populations or at different time points provided the same technique is used. These results should be considered as reference values for further studies performed using the same kit.

Table 5. Prevalences of HEV IgG observed in industrialized countries with assays other that Wantai HEV-IgG ELISA.

Country	Population	Assay	Number of Samples	HEV IgG (%)	Reference
Belgium	P	Strip immunoassay	100	14	[92]
Germany	GP	Mikrogen	4422	16.8	[90]
Germany	GP		7075	15.3	[93]
Greece	BD	Adaltis	265	9.43	[94]
Hungary	P	In-house assay	246	10.5	[95]
Ireland	BD	ND	198	8	[96]
Israel	BD	Diagnostic system	729	10.6	[97]
Italy	BD	In-house assay	199	7	[98]
Japan	BD	In-house assay	12,600	3.4	[99]
Japan	GP	In-house assay	22,027	5.3	[100]
Netherlands	GP	ND	7072	1.9	[91]
Poland	BD	Euroimmun	105	3.8	[101]
Portugal	BD	Abbott	1473	2.5	[102]
Spain	BD		563	2.8	[103]
Spain	GP	ND	NA	10	[104]
Spain	GP	Bioprobes	2305	2.17	[105]
Switzerland	BD	MP Diagnostics	550	4.9	[106]
UK	BD	ND	500	16	
UK	PCLD	ND	126	13	[107]
UK	OP	ND	336	25	
USA	GP	Diagnostic system	5966	10.2	[108]
USA	GP		7885	6	
USA	BD	MP Diagnostics	4499	9.5	[109]

BD: blood donors; PS: Professional soldiers; P: Patients; GP: General population; H: Hunters; PFW: Pig farm workers or in contact with pigs during job; FW: Forest workers; CH: Children; V: Veterinarians; FaW: Farmworkers; PCLD: Patients with chronic liver disease; OP: Old people; ND: assay not determined. Lists of assays: Mikrogen: RecomLine Anti-HEV IgG; Adaltis: AIAgen HEV; Diagnostic system: Anti-HEV-IgG kit; Euroimmun: Anti IgG HEv ELISA; Bioprobes: HEV IgG Diagnostic; MP Diagnostic: HEV ELISA. Abbott: HEV EIA.

2.6. Characteristics Associated with Higher Seroprevalence

The main characteristics associated with a high seropositivity rate in industrialized countries are increasing age, sex (male), contact with animals, consumption of raw or uncooked pork liver sausages (including ficatelli, a traditional Corsican pork liver sausage and traditional Dutch dry raw sausages), frequent consumption of bovine steak, frequent consumption of smoked beef offal, and consumption of oysters [45,59]. Conversely, bottled drinking water was associated with lower levels of anti-HEV IgG [45]. However, other factors could influence the exposure of the population to the virus.

3. Outbreaks in High-Income Countries

3.1. Confirmed and Grouped Cases

The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) reported that the number of confirmed HEV cases had increased from 514 in 2005 to 5617 in 2015, with 21,018 total reported cases during the whole period [110]. Three countries (France, the UK, and Germany) accounted for 80% of all reported cases. The number of severe cases also increased between 2005 (n = 85) and 2015 (n = 1115). The sex ratio (male) ranged from 61% to 69%. The proportion of cases in people older than 50 increased from ~40% during the 2005–2008 period to >60% during the 2013–2015 period. During the 2005–2015 period, a total of 28 deaths attributable to HEV have been claimed, with a clear increase since 2009.

Although HEV epidemics are predominantly due to genotypes 1 and 2 in tropical countries, small outbreaks have been described in industrialized countries. The ECDC reported 37 outbreaks between 2005 and 2015 with an increasing trend after 2009 [111]. The size of the outbreaks reported is ranged from 2 to 47 cases per year. Data on HEV outbreaks are provided by 18 countries and among them, 11 did not report any outbreak.

3.2. Description of Outbreaks

Table 6 summarizes seven HEV outbreaks in industrialized countries that involved 4–17 cases. Two were caused by HEV genotype 3 with the common source of contamination being undercooked pig or wild boar.

Table 6. List of HEV outbreaks for which peer-reviewed data are available.

Country	Number of Persons	Year	Cause	Virus	Reference
Spain	8	2015	Wild boar meat consumption	Genotype 3	[112]
Australia	17	2014	Pork products in a restaurant	Genotype 3	[116]
France	17	2013	Wedding spit-roasted piglet	ND	[113]
Italy	5	2011	Not identified	Genotype 4	[114]
Czech Republic	13	Not found in the reference	Not identified	ND	[115]
	8		Infection in farm pigs	ND	
UK	4	2008	foodborne source on a cruise ship	ND	[14]
Japan	29	2016	Not identified	Genotype 3	[117]

ND: Not determined.

In Spain, in October 2015, an HIV-infected patient presented at the Infectious Diseases Unit of the Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba with malaise, diarrhea, jaundice, vomiting, and fever. He tested positive for the presence of HEV RNA in her serum. The epidemiological investigation concluded that (i) all 8 family members had detectable HEV RNA in the serum, (ii) they were infected through the consumption of wild boar meat as demonstrated by HEV RNA detection in remaining frozen meat collected at home, (iii) genetic analysis showed that the 8 family members and the remaining frozen meat corresponded to the same viral strain (100% identity) belonging to

genotype 3 [112]. This sequence was previously described in wild boars from south-central Spain and swine (GenBank accession number: EU723512).

In France, in 2013, a cluster of 17 cases was associated with consumption of a spit-roasted piglet during a wedding [113]. Twelve cases (70%) were non symptomatic, five were symptomatic, and among them two (11.7%) were hospitalized. All individuals recovered. The survey attributed this large HEV outbreak to the consumption of an undercooked pig liver-based stuffing.

In the UK, in 2008, four passengers on a cruise ship presented with HEV infection [14]. Because of the incubation period, the source of infection was not identified.

In Italy, in 2011, five persons living in the Lazio region (close to Roma) were infected by HEV [114]. Despite the source of infection not being identified, the causing strain belonged to genotype 4 and was genetically most closely related with strains from China; none of these persons had contact or consumption history of Chinese products. These results are in line with those provided by other studies indicating that genotype 4 is now established in Europe.

The Czech Republic was also affected by two outbreaks [115]. For the first 13-case outbreak, the source was not identified. In the second outbreak, a link between human cases and infection in farm pigs was revealed for the first time.

In Australia, 55 cases of HEV infection were confirmed, including 24 people who had not traveled during the incubation period [116]. Of these, 17 had eaten in the same restaurant. The HEV RNA detected was of genotype 3. The high attack rates and OR estimated in the study were for pork products.

In 2016, after the notification of hepatitis E cases to the Asahikawa City Center of Public Health (ACPH) in a nursing home for elderly in Hokkaido, Japan, 125 persons were tested for HEV infection markers, and 29 were found to be positive. Only four presented anorexia, fatigue, and abdominal pain. All cases were caused by strains belonging to genotype 3 [117] and amplified sequences presented 99.8 to 100% of homology.

4. Conclusions

The markers of HEV infection are found at an increasing frequency among humans in industrialized countries. In addition, the sporadic nature of human cases in these countries is no longer relevant; hyperendemic regions exist in France, Italy, and Poland, at least. The number of confirmed cases and of clusters of cases has also drastically increased during the last decade. Whether this is due to a true epidemiological trend or due to increased awareness to HEV is not clear. The meta-analysis of studies performed with the Wantai HEV-IgG ELISA on blood donors or healthy general populations allowed us to classify industrialized countries into one of the following 3 categories based on the 19% (CI95 14–26) cut-off prevalence rate: high risk (France, Netherlands, Poland), medium risk (Austria, Denmark, Norway, Spain, UK and USA), and low risk (Canada, Scotland, Ireland, Australia and New Zealand). In addition, there is clearly an occupational risk for forest workers, farm workers, and pig farm workers. Apart from the pork-eating route of infection, the high exposure of adult population in industrialized countries (lowest rate is 5%) demands future investigations to better understand how people acquire HEV infection. The great heterogeneity observed between the anti-HEV IgG detection assays makes the comparison of the different studies and the comprehension of HEV epidemiology difficult. The establishment of a reference method in seroprevalence studies could remedy this problem.

Author Contributions: L.C.: data mining and drafting of the manuscript; A.F. and R.C.: supervision manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Debing, Y.; Moradpour, D.; Neyts, J.; Gouttenoire, J. Update on hepatitis e virology: Implications for clinical practice. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 200–212. [CrossRef] [PubMed]
2. Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Hepatitis e: An emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 494–503. [CrossRef] [PubMed]
3. Kamar, N.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Xia, N.S.; Ijaz, S.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Hepatitis e. *Lancet* **2012**, *379*, 2477–2488. [CrossRef]
4. Dalton, H.R.; Bendall, R.; Ijaz, S.; Banks, M. Hepatitis e: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* **2008**, *8*, 698–709. [CrossRef]
5. Tam, A.W.; Smith, M.M.; Guerra, M.E.; Huang, C.C.; Bradley, D.W.; Fry, K.E.; Reyes, G.R. Hepatitis e virus (hev): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **1991**, *185*, 120–131. [CrossRef]
6. Takahashi, M.; Tanaka, T.; Takahashi, H.; Hoshino, Y.; Nagashima, S.; Jirintai; Mizuo, H.; Yazaki, Y.; Takagi, T.; Azuma, M.; 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*, 1112–1125. [CrossRef] [PubMed]
7. Chapuy-Regaud, S.; Dubois, M.; Plisson-Chastang, C.; Bonnefois, T.; Lhomme, S.; Bertrand-Michel, J.; You, B.; Simoneau, S.; Gleizes, P.E.; Flan, B.; et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated hev particles protected from the immune response. *Biochimie* **2017**, *141*, 70–79. [CrossRef]
8. Nair, V.P.; Anang, S.; Subramani, C.; Madhvi, A.; Bakshi, K.; Srivastava, A.; Shalimar; Nayak, B.; Ranjith Kumar, C.T.; Surjit, M. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis e virus. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005521. [CrossRef]
9. Smith, D.B. International committee on taxonomy of viruses hepeviridae study g, jameel s, emerson su, harrison tj, meng xj, okamoto h, van der poel wh, purdy ma. Consensus proposals for classification of the family hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2223–2232. [CrossRef]
10. Smith, D.B.; Simmonds, P.; Izopet, J.; Oliveira-Filho, E.F.; Ulrich, R.G.; Johne, R.; Koenig, M.; Jameel, S.; Harrison, T.J.; Meng, X.-J.; et al. Proposed reference sequences for hepatitis e virus subtypes. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 537–542. [CrossRef]
11. Purdy, M.A.; Harrison, T.J.; Jameel, S.; Meng, X.J.; Okamoto, H.; Van der Poel, W.H.M.; Smith, D.B.; Ictv Report, C. Ictv virus taxonomy profile: Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2645–2646. [CrossRef] [PubMed]
12. Aggarwal, R. Clinical presentation of hepatitis e. *Virus Res.* **2011**, *161*, 15–22. [CrossRef]
13. Echevarria, J.M. Light and darkness: Prevalence of hepatitis e virus infection among the general population. *Scientifica (Cairo)* **2014**, *2014*, 481016. [CrossRef]
14. Said, B.; Ijaz, S.; Kafatos, G.; Booth, L.; Thomas, H.L.; Walsh, A.; Ramsay, M.; Morgan, D.; Hepatitis, E.I.I.T. Hepatitis e outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1738–1744. [CrossRef] [PubMed]
15. Dalton, H.R.; Hazeldine, S.; Banks, M.; Ijaz, S.; Bendall, R. Locally acquired hepatitis e in chronic liver disease. *Lancet* **2007**, *369*, 1260. [CrossRef]
16. Colson, P.; Dhiver, C.; Gerolami, R. Hepatitis e virus as a newly identified cause of acute viral hepatitis during human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 1176–1180. [CrossRef] [PubMed]
17. Abid, S.; Khan, A.H. Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis e. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97*, 1544–1547. [CrossRef]
18. Kamar, N.; Marion, O.; Abravanel, F.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Extrahepatic manifestations of hepatitis e virus. *Liver Int.* **2016**, *36*, 467–472. [CrossRef]
19. Hoofnagle, J.H.; Nelson, K.E.; Purcell, R.H. Hepatitis e. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1237–1244. [CrossRef]
20. de Niet, A.; Zaaijer, H.L.; ten Berge, I.; Weegink, C.J.; Reesink, H.W.; Beuers, U. Chronic hepatitis e after solid organ transplantation. *Neth. J. Med.* **2012**, *70*, 261–266.
21. Gerolami, R.; Moal, V.; Colson, P. Chronic hepatitis e with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 859–860. [CrossRef] [PubMed]
22. Te, H.S.; Drobeniuc, J.; Kamili, S.; Dong, C.; Hart, J.; Sharapov, U.M. Hepatitis e virus infection in a liver transplant recipient in the United States: A case report. *Transplant Proc.* **2013**, *45*, 810–813. [CrossRef] [PubMed]

23. Renou, C.; Lafeuillade, A.; Cadranel, J.F.; Pavio, N.; Pariente, A.; Allegre, T.; Poggi, C.; Penaranda, G.; Cordier, F.; Nicand, E. Hepatitis e virus in hiv-infected patients. *AIDS* **2010**, *24*, 1493–1499. [CrossRef] [PubMed]
24. Tavitian, S.; Peron, J.M.; Huynh, A.; Mansuy, J.M.; Ysebaert, L.; Huguet, F.; Vinel, J.P.; Attal, M.; Izopet, J.; Recher, C. Hepatitis e virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Virol.* **2010**, *49*, 141–144. [CrossRef] [PubMed]
25. Gauss, A.; Wenzel, J.J.; Flechtenmacher, C.; Navid, M.H.; Eisenbach, C.; Jilg, W.; Stremmel, W.; Schnitzler, P. Chronic hepatitis e virus infection in a patient with leukemia and elevated transaminases: A case report. *J. Med. Case Rep.* **2012**, *6*, 334. [CrossRef] [PubMed]
26. Geng, Y.; Zhang, H.; Huang, W.; T, J.H.; Geng, K.; Li, Z.; Wang, Y. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat. Mon.* **2014**, *14*, e15618. [CrossRef]
27. Kamar, N.; Selves, J.; Mansuy, J.-M.; Ouezzani, L.; Péron, J.-M.; Guitard, J.; Cointault, O.; Esposito, L.; Abravanel, F.; Danjoux, M.; et al. Hepatitis e virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 811–817. [CrossRef]
28. Péron, J.-M.; Mansuy, J.-M.; Récher, C.; Bureau, C.; Poirson, H.; Alric, L.; Izopet, J.; Vinel, J.-P. Prolonged hepatitis e in an immunocompromised patient. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *21*, 1223–1224. [CrossRef]
29. Dalton, H.R.; Bendall, R.P.; Keane, F.E.; Tedder, R.S.; Ijaz, S. Persistent carriage of hepatitis e virus in patients with hiv infection. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1025–1027. [CrossRef]
30. Behrendt, P.; Steinmann, E.; Manns, M.P.; Wedemeyer, H. The impact of hepatitis e in the liver transplant setting. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1418–1429. [CrossRef]
31. Tamura, A.; Shimizu, Y.K.; Tanaka, T.; Kuroda, K.; Arakawa, Y.; Takahashi, K.; Mishiro, S.; Shimizu, K.; Moriyama, M. Persistent infection of hepatitis e virus transmitted by blood transfusion in a patient with t-cell lymphoma. *Hepatol. Res.* **2007**, *37*, 113–120. [CrossRef] [PubMed]
32. Shrestha, A.C.; Flower, R.L.; Seed, C.R.; Stramer, S.L.; Faddy, H.M. A comparative study of assay performance of commercial hepatitis e virus enzyme-linked immunosorbent assay kits in Australian blood donor samples. *J. Blood Transfus.* **2016**, *2016*, 9647675. [CrossRef] [PubMed]
33. Park, H.K.; Jeong, S.H.; Kim, J.W.; Woo, B.H.; Lee, D.H.; Kim, H.Y.; Ahn, S. Seroprevalence of anti-hepatitis e virus (hev) in a korean population: Comparison of two commercial anti-hev assays. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 142. [CrossRef] [PubMed]
34. Wenzel, J.J.; Preiss, J.; Schemmerer, M.; Huber, B.; Jilg, W. Test performance characteristics of anti-hev igg assays strongly influence hepatitis e seroprevalence estimates. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 497–500. [CrossRef] [PubMed]
35. Yan, Q.; Du, H.; Wang, Y. Comparison of two diagnostic reagents to detect anti-hepatitis e virus igg antibodies. *Chin. J. Zoon.* **2008**, *24*, 1087–1089.
36. Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd. Wantai HEV-IgM ELISA. Available online: http://wantaibio.company.weiku.com/item/HEV-IgM-Elisa-kit-18043455.html (accessed on 3 December 2018).
37. Rossi-Tamisier, M.; Moal, V.; Gerolami, R.; Colson, P. Discrepancy between anti-hepatitis e virus immunoglobulin g prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J. Clin. Virol.* **2013**, *56*, 62–64. [CrossRef]
38. Hartl, J.; Otto, B.; Madden, R.G.; Webb, G.; Woolson, K.L.; Kriston, L.; Vettorazzi, E.; Lohse, A.W.; Dalton, H.R.; Pischke, S. Hepatitis e seroprevalence in europe: A meta-analysis. *Viruses* **2016**, *8*, 211. [CrossRef]
39. Christensen, P.B.; Engle, R.E.; Hjort, C.; Homburg, K.M.; Vach, W.; Georgsen, J.; Purcell, R.H. Time trend of the prevalence of hepatitis e antibodies among farmers and blood donors: A potential zoonosis in Denmark. *Clin. Infect Dis.* **2008**, *47*, 1026–1031. [CrossRef]
40. Mansuy, J.M.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Saune, K.; Miedouge, M.; Ellis, V.; Rech, H.; Destruel, F.; Kamar, N.; Dalton, H.R.; et al. Hepatitis e virus antibodies in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2309–2312. [CrossRef]
41. Holm, D.K.; Moessner, B.K.; Engle, R.E.; Zaaijer, H.L.; Georgsen, J.; Purcell, R.H.; Christensen, P.B. Declining prevalence of hepatitis e antibodies among danish blood donors. *Transfusion* **2015**, *55*, 1662–1667. [CrossRef]
42. Sauleda, S.; Ong, E.; Bes, M.; Janssen, A.; Cory, R.; Babizki, M.; Shin, T.; Lindquist, A.; Hoang, A.; Vang, L.; et al. Seroprevalence of hepatitis e virus (hev) and detection of hev rna with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion* **2015**, *55*, 972–979. [CrossRef] [PubMed]

43. Nemecek, V.; Butovicova, P.; Maly, M.; Dite, P.; Vertatova, M.; Vodickova, I.; Kriz, B. The prevalence of antibodies against hepatitis e virus in the Czech Republic: Serological survey. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2017**, *66*, 3–7. [PubMed]
44. Strakova, P.; Kriz, B.; Rudolf, I.; Hubalek, Z. Seroprevalence study of hepatitis e virus infection in two districts of the Czech Republic. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2014**, *63*, 92–94. [PubMed]
45. Mansuy, J.M.; Gallian, P.; Dimeglio, C.; Saune, K.; Arnaud, C.; Pelletier, B.; Morel, P.; Legrand, D.; Tiberghien, P.; Izopet, J. A nationwide survey of hepatitis e viral infection in French blood donors. *Hepatology* **2016**, *63*, 1145–1154. [CrossRef] [PubMed]
46. Boutrouille, A.; Bakkali-Kassimi, L.; Cruciere, C.; Pavio, N. Prevalence of anti-hepatitis e virus antibodies in French blood donors. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2009–2010. [CrossRef] [PubMed]
47. Hewitt, J.; Harte, D.; Sutherland, M.; Croucher, D.; Fouche, L.; Flanagan, P.; Williamson, D. Prevalence of hepatitis e virus antibodies and infection in New Zealand blood donors. *N. Z. Med. J.* **2018**, *131*, 38–43. [PubMed]
48. Zafrullah, M.; Zhang, X.; Tran, C.; Nguyen, M.; Kamili, S.; Purdy, M.A.; Stramer, S.L. Disparities in detection of antibodies against hepatitis e virus in US blood donor samples using commercial assays. *Transfusion* **2018**, *58*, 1254–1263. [CrossRef]
49. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The prisma statement. *J. Clin. Epidemiol.* **2009**, *62*, 1006–1012. [CrossRef]
50. Viechtbauer, W. Conducting meta-analyses in r with the metafor package. *J. Stat. Softw.* **2010**, *36*, 1–48. [CrossRef]
51. Higgins, J.P.; Thompson, S.G.; Deeks, J.J.; Altman, D.G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* **2003**, *327*, 557–560. [CrossRef]
52. Barendregt, J.J.; Doi, S.A.; Lee, Y.Y.; Norman, R.E.; Vos, T. Meta-analysis of prevalence. *J. Epidemiol. Community Health* **2013**, *67*, 974–978. [CrossRef] [PubMed]
53. Dalton, H.R.; Fellows, H.J.; Gane, E.J.; Wong, P.; Gerred, S.; Schroeder, B.; Croxson, M.C.; Garkavenko, O. Hepatitis e in New Zealand. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2007**, *22*, 1236–1240. [CrossRef] [PubMed]
54. Bura, M.; Lagiedo, M.; Michalak, M.; Sikora, J.; Mozer-Lisewska, I. Hepatitis e virus igg seroprevalence in hiv patients and blood donors, west-central Poland. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *61*, 20–22. [CrossRef]
55. Lucarelli, C.; Spada, E.; Taliani, G.; Chionne, P.; Madonna, E.; Marcantonio, C.; Pezzotti, P.; Bruni, R.; La Rosa, G.; Pisani, G.; et al. High prevalence of anti-hepatitis e virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014. *Euro Surveill.* **2016**, *21*, 30. [CrossRef] [PubMed]
56. Grabarczyk, P.; Sulkowska, E.; Gdowska, J.; Kopacz, A.; Liszewski, G.; Kubicka-Russel, D.; Baylis, S.A.; Corman, V.M.; Nocen, E.; Piotrowski, D.; et al. Molecular and serological infection marker screening in blood donors indicates high endemicity of hepatitis e virus in Poland. *Transfusion* **2018**, *58*, 1245–1253. [CrossRef] [PubMed]
57. Mansuy, J.M.; Saune, K.; Rech, H.; Abravanel, F.; Mengelle, C.; S, L.H.; Destruel, F.; Kamar, N.; Izopet, J. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis e virus, southern France, October 2011. *Euro Surveill.* **2015**, *20*, 27–34. [CrossRef]
58. Izopet, J.; Labrique, A.B.; Basnyat, B.; Dalton, H.R.; Kmush, B.; Heaney, C.D.; Nelson, K.E.; Ahmed, Z.B.; Zaman, K.; Mansuy, J.M.; et al. Hepatitis e virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. *J. Clin. Virol.* **2015**, *70*, 39–42. [CrossRef]
59. Mooij, S.H.; Hogema, B.M.; Tulen, A.D.; van Pelt, W.; Franz, E.; Zaaijer, H.L.; Molier, M.; Hofhuis, A. Risk factors for hepatitis e virus seropositivity in Dutch blood donors. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 173. [CrossRef]
60. Van Gageldonk-Lafeber, A.B.; van der Hoek, W.; Borlee, F.; Heederik, D.J.; Mooi, S.H.; Maassen, C.B.; Yzermans, C.J.; Rockx, B.; Smit, L.A.; Reimerink, J.H. Hepatitis e virus seroprevalence among the general population in a livestock-dense area in The Netherlands: A cross-sectional population-based serological survey. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 21. [CrossRef]
61. Slot, E.; Hogema, B.M.; Riezebos-Brilman, A.; Kok, T.M.; Molier, M.; Zaaijer, H.L. Silent hepatitis e virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* **2013**, *18*, 20550. [CrossRef]
62. Xu, C.; Wang, R.Y.; Schechterly, C.A.; Ge, S.; Shih, J.W.; Xia, N.S.; Luban, N.L.; Alter, H.J. An assessment of hepatitis e virus (hev) in US blood donors and recipients: No detectable hev rna in 1939 donors tested and no evidence for hev transmission to 362 prospectively followed recipients. *Transfusion* **2013**, *53*, 2505–2511. [CrossRef] [PubMed]

63. Lange, H.; Overbo, J.; Borgen, K.; Dudman, S.; Hoddevik, G.; Urdahl, A.M.; Vold, L.; Sjurseth, S.K. Hepatitis e in norway: Seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 181–186. [CrossRef] [PubMed]
64. Fischer, C.; Hofmann, M.; Danzer, M.; Hofer, K.; Kaar, J.; Gabriel, C. Seroprevalence and incidence of hepatitis e in blood donors in upper Austria. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119576. [CrossRef] [PubMed]
65. Beale, M.A.; Tettmar, K.; Szypulska, R.; Tedder, R.S.; Ijaz, S. Is there evidence of recent hepatitis e virus infection in english and north welsh blood donors? *Vox Sang.* **2011**, *100*, 340–342. [CrossRef] [PubMed]
66. Galli, C.; Fomiatti, L.; Tagliacarne, C.; Velati, C.; Zanetti, A.R.; Castaldi, S.; Romano, L. Seroprevalence of hepatitis e virus among blood donors in northern Italy (Sondrio, Lombardy) determined by three different assays. *Blood Transfus* **2017**, *15*, 502–505. [PubMed]
67. Spada, E.; Pupella, S.; Pisani, G.; Bruni, R.; Chionne, P.; Madonna, E.; Villano, U.; Simeoni, M.; Fabi, S.; Marano, G.; et al. A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis e virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus* **2018**, 1–9. [CrossRef]
68. Thom, K.; Gilhooly, P.; McGowan, K.; Malloy, K.; Jarvis, L.M.; Crossan, C.; Scobie, L.; Blatchford, O.; Smith-Palmer, A.; Donnelly, M.C.; et al. Hepatitis e virus (hev) in scotland: Evidence of recent increase in viral circulation in humans. *Euro Surveill.* **2018**, *23*, 12. [CrossRef]
69. Shrestha, A.C.; Seed, C.R.; Flower, R.L.; Rooks, K.M.; Keller, A.J.; Harley, R.J.; Chan, H.T.; Holmberg, J.A.; Faddy, H.M. Hepatitis e virus and implications for blood supply safety, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1940–1942. [CrossRef]
70. Fearon, M.A.; O'Brien, S.F.; Delage, G.; Scalia, V.; Bernier, F.; Bigham, M.; Weger, S.; Prabhu, S.; Andonov, A. Hepatitis e in Canadian blood donors. *Transfusion* **2017**, *57*, 1420–1425. [CrossRef]
71. O'Riordan, J.; Boland, F.; Williams, P.; Donnellan, J.; Hogema, B.M.; Ijaz, S.; Murphy, W.G. Hepatitis e virus infection in the Irish blood donor population. *Transfusion* **2016**, *56*, 2868–2876. [CrossRef]
72. Cleland, A.; Smith, L.; Crossan, C.; Blatchford, O.; Dalton, H.R.; Scobie, L.; Petrik, J. Hepatitis e virus in Scottish blood donors. *Vox Sang.* **2013**, *105*, 283–289. [CrossRef] [PubMed]
73. Ivanova, A.; Tefanova, V.; Reshetnjak, I.; Kuznetsova, T.; Geller, J.; Lundkvist, A.; Janson, M.; Neare, K.; Velstrom, K.; Jokelainen, P.; et al. Hepatitis e virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 403–412. [CrossRef] [PubMed]
74. Carpentier, A.; Chaussade, H.; Rigaud, E.; Rodriguez, J.; Berthault, C.; Boue, F.; Tognon, M.; Touze, A.; Garcia-Bonnet, N.; Choutet, P.; et al. High hepatitis e virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2888–2893. [CrossRef] [PubMed]
75. Krumbholz, A.; Joel, S.; Dremsek, P.; Neubert, A.; Johne, R.; Durrwald, R.; Walther, M.; Muller, T.H.; Kuhnel, D.; Lange, J.; et al. Seroprevalence of hepatitis e virus (hev) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* **2014**, *203*, 273–282. [CrossRef] [PubMed]
76. Teixeira, J.; Mesquita, J.R.; Pereira, S.S.; Oliveira, R.M.; Abreu-Silva, J.; Rodrigues, A.; Myrmel, M.; Stene-Johansen, K.; Overbo, J.; Goncalves, G.; et al. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Med. Microbiol. Immunol.* **2017**, *206*, 77–81. [CrossRef]
77. Meng, X.J.; Wiseman, B.; Elvinger, F.; Guenette, D.K.; Toth, T.E.; Engle, R.E.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H. 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.* **2002**, *40*, 117–122. [CrossRef] [PubMed]
78. Chaussade, H.; Rigaud, E.; Allix, A.; Carpentier, A.; Touze, A.; Delzescaux, D.; Choutet, P.; Garcia-Bonnet, N.; Coursaget, P. Hepatitis e virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *J. Clin. Virol.* **2013**, *58*, 504–508. [CrossRef] [PubMed]
79. Dremsek, P.; Wenzel, J.J.; Johne, R.; Ziller, M.; Hofmann, J.; Groschup, M.H.; Werdermann, S.; Mohn, U.; Dorn, S.; Motz, M.; et al. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis e virus-specific immunoglobulin g elisas. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 189–200. [CrossRef]
80. Kantala, T.; Kinnunen, P.M.; Oristo, S.; Jokelainen, P.; Vapalahti, O.; Maunula, L. Hepatitis e virus antibodies in Finnish veterinarians. *Zoon. Public Health* **2017**, *64*, 232–238. [CrossRef]
81. De Sabato, L.; Di Bartolo, I.; Montomoli, E.; Trombetta, C.; Ruggeri, F.M.; Ostanello, F. Retrospective study evaluating seroprevalence of hepatitis e virus in blood donors and in swine veterinarians in Italy (2004). *Zoon. Public Health* **2017**, *64*, 308–312. [CrossRef]

82. Krumbholz, A.; Mohn, U.; Lange, J.; Motz, M.; Wenzel, J.J.; Jilg, W.; Walther, M.; Straube, E.; Wutzler, P.; Zell, R. Prevalence of hepatitis e virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 239–244. [CrossRef] [PubMed]
83. Riveiro-Barciela, M.; Rodriguez-Frias, F.; Buti, M. Hepatitis e: Scale of the problem in Spain. *Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *35*, 719–724. [CrossRef] [PubMed]
84. Weiner, M.; Tokarska-Rodak, M.; Plewik, D.; Pańczuk, A.; Szepeluk, A.; Krajewska, M. The serological surveillance of hepatitis e virus among hunters and foresters in eastern Poland. *Pol. J. Microbiol.* **2017**, *66*, 277–279. [CrossRef] [PubMed]
85. Kuniholm, M.H.; Purcell, R.H.; McQuillan, G.M.; Engle, R.E.; Wasley, A.; Nelson, K.E. Epidemiology of hepatitis e virus in the United States: Results from the third national health and nutrition examination survey, 1988–1994. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 48–56. [CrossRef] [PubMed]
86. Buti, M.; Plans, P.; Dominguez, A.; Jardi, R.; Rodriguez Frias, F.; Esteban, R.; Salleras, L.; Plasencia, A. Prevalence of hepatitis e virus infection in children in the northeast of Spain. *Clin. Vaccine Immunol.* **2008**, *15*, 732–734. [CrossRef] [PubMed]
87. Bayhan, G.I.; Demioren, K.; Guducuoglu, H. Epidemiology of hepatitis e virus in children in the province of van, Turkey. *Turk. Pediatr. Ars.* **2016**, *51*, 148–151. [CrossRef] [PubMed]
88. Potemkin, I.A.; Lopatukhina, M.A.; Gadzhieva, O.A.; Prokhorova, E.L.; Diyarrassuba, A.; Isaeva, O.A.; Kozhanova, T.V.; Ivanova, O.E.; Silenova, O.V.; Setdikova, N.; et al. Prevalence of hepatitis e markers in children. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **2015**, *2*, 38–46.
89. Oliveira, R.; Mesquita, J.R.; Pereira, S.; Abreu-Silva, J.; Teixeira, J.; Nascimento, M.S.J. Seroprevalence of hepatitis e virus antibodies in Portuguese children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 623–626. [CrossRef]
90. Faber, M.S.; Wenzel, J.J.; Jilg, W.; Thamm, M.; Hohle, M.; Stark, K. Hepatitis e virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1654–1657. [CrossRef]
91. Verhoef, L.; Koopmans, M.; Duizer, E.; Bakker, J.; Reimerink, J.; Van Pelt, W. Seroprevalence of hepatitis e antibodies and risk profile of hev seropositivity in The Netherlands, 2006–2007. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 1838–1847. [CrossRef]
92. Van Hoecke, F.; Van Maerken, T.; De Boulle, M.; Geerts, A.; Vlierberghe, V.; Colle, I.; Padalko, H.E. Hepatitis e seroprevalence in east and west Flanders, Belgium. *Acta Gastroenterol. Belg.* **2012**, *75*, 322–324.
93. Faber, M.; Willrich, N.; Schemmerer, M.; Rauh, C.; Kuhnert, R.; Stark, K.; Wenzel, J.J. Hepatitis e virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J. Viral. Hepat.* **2018**, *25*, 752–758. [CrossRef]
94. Pittaras, T.; Valsami, S.; Mavrouli, M.; Kapsimali, V.; Tsakris, A.; Politou, M. Seroprevalence of hepatitis e virus in blood donors in Greece. *Vox Sang.* **2014**, *106*, 387. [CrossRef]
95. Haagsman, A.; Reuter, G.; Duizer, E.; Nagy, G.; Herremans, T.; Koopmans, M.; Szucs, G. Seroepidemiology of hepatitis e virus in patients with non-a, non-b, non-c hepatitis in Hungary. *J. Med. Virol.* **2007**, *79*, 927–930. [CrossRef]
96. Hickey, C.; Spillane, D.; Benson, J.; Levis, J.; Fanning, L.J.; Cryan, B.; Prentice, M.B. Hepatitis e virus (hev) infection in Ireland. *Ir. Med. J.* **2016**, *109*, 451. [PubMed]
97. Mor, O.; Bassal, R.; Michaeli, M.; Wax, M.; Ram, D.; Cohen-Ezra, O.; Cohen, D.; Mendelson, E.; Ben-Ari, Z.; Shohat, T. Prevalence of hepatitis e virus antibodies, Israel, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 692–694. [CrossRef]
98. Ricco, G.; Bonino, F.; Lanza, M.; Scatena, F.; Alfieri, C.M.; Messa, P.; Marchisio, E.; Mascolo, G.; Romano, L.; Galli, C.; et al. New immunoassays for total, iga and igm antibodies against hepatitis e virus: Prevalence in Italian blood donors and patients with chronic liver or kidney diseases. *Dig. Liver Dis.* **2016**, *48*, 536–541. [CrossRef]
99. Takeda, H.; Matsubayashi, K.; Sakata, H.; Sato, S.; Kato, T.; Hino, S.; Tadokoro, K.; Ikeda, H. A nationwide survey for prevalence of hepatitis e virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang.* **2010**, *99*, 307–313. [CrossRef] [PubMed]
100. Takahashi, M.; Tamura, K.; Hoshino, Y.; Nagashima, S.; Yazaki, Y.; Mizuo, H.; Iwamoto, S.; Okayama, M.; Nakamura, Y.; Kajii, E.; et al. A nationwide survey of hepatitis e virus infection in the general population of Japan. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 271–281. [CrossRef] [PubMed]

101. Bura, M.; Bukowska, A.; Bura, A.; Michalak, M.; Mozer-Lisewska, I. Hepatitis e virus antibodies in hiv-infected patients and blood donors from western Poland—A preliminary report. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 577–579. [CrossRef] [PubMed]
102. Queiros, L.; Condeco, J.; Tender, A.; Mateus, M.; Teixeira, A.; Pascoal, H. The seroprevalence for hepatitis e viral antibodies in the northern region of Portugal (among the donor population). *Acta Med. Port.* **1997**, *10*, 447–453. [PubMed]
103. Mateos, M.L.; Camarero, C.; Lasa, E.; Teruel, J.L.; Mir, N.; Baquero, F. Hepatitis e virus: Relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang.* **1999**, *76*, 78–80. [CrossRef] [PubMed]
104. Echevarria, J.M.; Fogeda, M.; Avellon, A. Epidemiology of hepatitis e virus infection in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33*, 281–286. [PubMed]
105. Fogeda, M.; Avellon, A.; Echevarria, J.M. Prevalence of specific antibody to hepatitis e virus in the general population of the community of Madrid, Spain. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 71–74. [CrossRef] [PubMed]
106. Kaufmann, A.; Kenfak-Foguena, A.; Andre, C.; Canellini, G.; Burgisser, P.; Moradpour, D.; Darling, K.E.; Cavassini, M. Hepatitis e virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21150. [CrossRef] [PubMed]
107. Dalton, H.R.; Stableforth, W.; Thurairajah, P.; Hazeldine, S.; Remnarace, R.; Usama, W.; Farrington, L.; Hamad, N.; Sieberhagen, C.; Ellis, V.; et al. Autochthonous hepatitis e in southwest england: Natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis e virus igg seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *20*, 784–790. [CrossRef]
108. Teshale, E.H.; Denniston, M.M.; Drobeniuc, J.; Kamili, S.; Teo, C.G.; Holmberg, S.D. Decline in hepatitis e virus antibody prevalence in the United States from 1988–1994 to 2009–2010. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 366–373. [CrossRef] [PubMed]
109. Stramer, S.L.; Moritz, E.D.; Foster, G.A.; Ong, E.; Linnen, J.M.; Hogema, B.M.; Mak, M.; Chia, C.P.; Dodd, R.Y. Hepatitis e virus: Seroprevalence and frequency of viral rna detection among US blood donors. *Transfusion* **2016**, *56*, 481–488. [CrossRef] [PubMed]
110. Aspinall, E.J.; Couturier, E.; Faber, M.; Said, B.; Ijaz, S.; Tavoschi, L.; Takkinen, J.; Adlhoch, C. Hepatitis e virus infection in europe: Surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro Surveill.* **2016**, *22*. [CrossRef] [PubMed]
111. ECDC. *Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015 Baseline Assessment of Testing, Diagnosis, Surveillance and Epidemiology*; European Center for Disease Prevention and Control: Stockholm, Sweden, 2017.
112. Rivero-Juarez, A.; Frias, M.; Martinez-Peinado, A.; Risalde, M.A.; Rodriguez-Cano, D.; Camacho, A.; Garcia-Bocanegra, I.; Cuenca-Lopez, F.; Gomez-Villamandos, J.C.; Rivero, A. Familial hepatitis e outbreak linked to wild boar meat consumption. *Zoon. Public Health* **2017**, *64*, 561–565. [CrossRef] [PubMed]
113. Guillois, Y.; Abravanel, F.; Miura, T.; Pavio, N.; Vaillant, V.; Lhomme, S.; Le Guyader, F.S.; Rose, N.; Le Saux, J.C.; King, L.A.; et al. High proportion of asymptomatic infections in an outbreak of hepatitis e associated with a spit-roasted piglet, France, 2013. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 351–357. [CrossRef]
114. Garbuglia, A.R.; Scognamiglio, P.; Petrosillo, N.; Mastroianni, C.M.; Sordillo, P.; Gentile, D.; La Scala, P.; Girardi, E.; Capobianchi, M.R. Hepatitis e virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 110–114. [CrossRef] [PubMed]
115. Trmal, J.; Pavlik, I.; Vasickova, P.; Matejickova, L.; Simunkova, L.; Luks, S.; Pazderkova, J. Outbreaks of viral hepatitis e in the Czech Republic? *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2012**, *61*, 15–20. [PubMed]
116. Yapa, C.M.; Furlong, C.; Rosewell, A.; Ward, K.A.; Adamson, S.; Shadbolt, C.; Kok, J.; Tracy, S.L.; Bowden, S.; Smedley, E.J.; et al. First reported outbreak of locally acquired hepatitis e virus infection in Australia. *Med. J. Aust.* **2016**, *204*, 274. [CrossRef] [PubMed]
117. Ishida, S.; Matsuura, K.; Yoshizumi, S.; Miyoshi, M.; Sugisawa, T.; Tanida, M.; Okano, M. Hepatitis e outbreak at a nursing home for aged people in Hokkaido, Japan, between February and March 2016. *J. Clin. Virol.* **2018**, *101*, 23–28. [CrossRef] [PubMed]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Annexe 3 Lettre information SEROMED (exemple donneurs de sang)

LETTRE D'INFORMATION

SéroMed : Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux de la population des donneurs de sang en Corse

Étude de séroprévalence menée en Corse

Promoteur de l'étude : Université de Corse

Chargé de l'étude : Lisandru Capai

Madame, Monsieur,

Nous vous proposons de participer à cette étude mise en place par l'Université de Corse et l'EFS.

Nous vous présentons ici les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt et le déroulement de l'étude, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

Après avoir obtenu les réponses satisfaisantes à vos questions et disposé d'un délai de réflexion suffisant, vous pourrez alors décider si vous voulez participer à cette étude ou non.

Participation volontaire

Votre participation à cette étude est entièrement volontaire et libre. Votre éventuel refus de participer n'aura aucune conséquence sur votre don, ainsi que sur vos relations avec les infirmiers et les médecins. Si vous acceptez de participer, et apposez votre signature de consentement, vous bénéficiez tout de même d'un droit de rétractation de l'étude, un droit que vous pourrez exercez à tout moment

Présentation de l'étude

L'objectif de cette étude est de collecter des données sur le dégré de protection de la population vis-à-vis de l'hépatite E, de nombreuses pathologies à prévention vaccinale et d'autres maladies infectieuses. Les résultats nous permettront d'évaluer par exemple, les effets du programme de vaccination, et dans le cas d'autres maladies infectieuses d'estimer leur fréquence, les populations à risque et d'orienter la mise en place d'éventuelles mesures de prévention. Cette étude est menée en Corse sous la responsabilité de l'université de Corse Pasquale Paoli (équipe d'accueil EA 7310 Bioscope Corse méditerranée) durant la période 2019/2020.

Interventions de l'étude sur les personnes participantes à la recherche SEROMED

Aucun prélèvement supplémentaire ne sera réalisé et la participation à cette étude ne modifie en rien le déroulement de votre don de sang. Dans le cadre du don de sang, des tubes sont prélevés pour la qualification biologique du don (procédure habituelle qui consiste à sécuriser le don via des analyses biologiques). Pour l'étude SEROMED, en plus des analyses biologiques habituelles réalisées pour le don, d'autres analyses seront effectuées pour détecter la présence d'anticorps contre les pathogènes cibles de l'étude (Virus de l'Hépatite E et A, Morbillivirus, Rubulavirus, Rubella virus, Virus Toscana, Borrelia burgdorferi, Virus West Nile, DENV, Virus chikungunya,

Usutu, Zika, Clostridium tetani, Schistosome hematobium), et pour certains d'entre eux, d'en calculer leur titre (quantité dans le sang). La transmission individuelle des résultats sérologiques (IgG) ne présenterait pas un bénéfice majeur pour les participants car les anticorps recherchés sont témoins d'une exposition passée.
Par ailleurs, votre participation à l'étude SEROMED consiste à remplir le questionnaire suivant, relatif à des données sociodémographiques, au rapport à l'eau et aux habitudes alimentaires.
Les données biologiques et les informations collectées via les questionnaires permettront de répondre aux objectifs décris précédement.
Pour participer à cette étude, il vous est demandé de:

1. Signer les deux exemplaires du formulaire de consentement précisant les termes légaux de cette étude
2. Réaliser votre don du sang de façon classique
3. Remplir le questionnaire et le remettre au médecin investigateur, qui le transmettra ensuite à l'équipe EA BISCOPE de l'université de Corse Pasquale Paoli .

Conservation des échantillons sanguins.

Un aliquot (500 µL à 1 mL de sérum) de chaque échantillon sanguin étudié sera conservé à –20°C, au sein de la biothèque transfusionnelle de l'EFS. Cet aliquot a vocation à être conservé pendant une durée de 5 ans à compter du début de l'étude, puis sera détruit. Il peut être aussi détruit à tout moment sur demande spécifique du donneur, ou recommandation des autorités compétentes ou du comité de suivi. Un aliquot pourra également être conservé au sein du laboratoire de Virologie de Corte pendant une durée de 5 ans également.

Bénéfice(s) attendus et risques potentiels.

Aucun bénéfice direct pour le donneur.
Aucun risque pour le donneur.

Aspects réglementaires et administratifs

Cette étude a reçu pour sa mise en œuvre un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) le 13/12/2017 (dossier ID RCB : 2016-A01000-51). Cette étude est conforme au Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD). Le Règlement (EU) 2016/679 du Parlement Européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des données fixe le cadre juridique applicable aux traitements à caractère personnel.

Traitement informatique des données personnelles

Les données vous concernant et les données nécessaires à l'étude seront recueillies par l'EFS et transmises de façon pseudo-anonyme au chargé de l'étude. Aucune donnée nominative ne sera transmise. Un traitement des données sera mis en œuvre pour permettre l'analyse des résultats, dans des conditions assurant leur confidentialité.

Si vous avez des questions concernant votre participation à cette étude, vous pourrez contacter le chargé de l'étude : Lisandru CAPAI, Tel: 0495450155 Email : lisandru.capai@gmail.com.

Nous vous remercions d'avoir pris le temps de lire cette lettre d'information. Si vous êtes d'accord pour participer à cette recherche, nous vous invitons à avertir le médecin de collecte, à signer le formulaire de consentement en deux exemplaires (dont un que vous conserverez) ainsi qu'à remplir le questionnaire.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

(Feuille à retirer du questionnaire après remplissage et à conserver par le médecin ou l'infirmier)

SéroMed : Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux chez les donneurs de sang en Corse

Etude transversale menée en Corse

Cadre réservé au donneur

Je soussigné (e) Nom…… Prénom……

Cadre réservé au médecin EFS

Nom :

Il m'a été proposé de participer à l'étude SEROMED : « **Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux chez les donneurs de sang en Corse** ». Il m'a été précisé que j'étais libre d'accepter ou de refuser de participer à l'étude et que ma participation n'impliquait pas de prise de sang supplémentaire par rapport à un don classique. Un échantillon de ce don servira pour la recherche des pathogènes cibles de l'étude (Virus Hépatite E, B, A, C, Morbillivirus, Rubulavirus, Rubella virus, Virus Toscana, Borrelia burgdorferi, Virus West Nile, DENV, Virus chikungunya, Usutu, Zika, Clostridium tetani, Schistosome hematobium). Aucun résultat individuel ne sera communiqué, mais un bilan de l'étude sera disponible sur le site de l'Université de Corse ou de l'EFS. Mes prélèvements seront conservés pendant une durée de cinq (5) ans à l'EFS PACA Corse. Il m'a en outre été demandé de remplir un questionnaire portant sur les données sociodémographiques, le rapport à l'eau et les habitudes alimentaires. Afin d'éclairer ma décision, j'ai reçu et bien compris les informations nécessaires. Le traitement informatisé des données recueillies à l'occasion de cette recherche est conforme au Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD). Le Règlement (EU) 2016/679 du Parlement Européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des données fixe le cadre juridique applicable aux traitements à caractère personnel. Seul le consentement est nominatif et sera traité séparément. Les analyses et le traitement des données sont eux anonymisés grâce au code SEROMED. L'étude a également reçu l'approbation du Comité de la Protection des personnes (ID RCB : 2016-A01000-51).

Après en avoir discuté et avoir obtenu réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche décrite ci-dessus. Je suis parfaitement conscient(e) que je peux retirer mon consentement à tout moment, et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité. Il suffit que j'en fasse la demande en contactant le Dr Pierre Gallian, biologiste à l'EFS PACA Corse, soit par mail pierre.gallian@efs.sante.fr soit par téléphone au 04 91 18 95 51, en précisant mon nom prénom date de naissance et les numéros d'identification figurant en bas de page (= Code SEROMED).

Je donne mon consentement éclairé pour la participation à cette étude.

J'accepte qu'un tube de mon sang et les données du questionnaire puissent être utilisés à des fins de recherche.

J'accepte la réalisation d'analyses sur mon sang.

Fait à ……, le ……

Signature du médecin EFS

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

Signature du donneur

Etiquette de don

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

(Feuille à retirer du questionnaire après remplissage et à conserver par le donneur inclus dans l'étude)

SéroMed : Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux chez les donneurs de sang en Corse

Etude transversale menée en Corse

Cadre réservé au donneur Je soussigné (e) Nom…… Prénom……
Cadre réservé au médecin EFS **Nom :**

Il m'a été proposé de participer à l'étude SEROMED : « **Degré d'exposition au virus de l'hépatite E et à d'autres agents infectieux chez les donneurs de sang en Corse** ». Il m'a été précisé que j'étais libre d'accepter ou de refuser de participer à l'étude et que ma participation n'impliquait pas de prise de sang supplémentaire par rapport à un don classique. Un échantillon de ce don servira pour la recherche des pathogènes cibles de l'étude (Virus Hépatite E, B, A, C, Morbillivirus, Rubulavirus, Rubella virus, Virus Toscana, Borrelia burgdorferi, Virus West Nile, DENV, Virus chikungunya, Usutu, Zika, Clostridium tetani, Schistosome hematobium). Aucun résultat individuel ne sera communiqué, mais un bilan de l'étude sera disponible sur le site de l'Université de Corse ou de l'EFS. Mes prélèvements seront conservés pendant une durée de cinq (5) ans à l'EFS PACA Corse. Il m'a en outre été demandé de remplir un questionnaire portant sur les données sociodémographiques, le rapport à l'eau et les habitudes alimentaires. Afin d'éclairer ma décision, j'ai reçu et bien compris les informations nécessaires. Le traitement informatisé des données recueillies à l'occasion de cette recherche est conforme au Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD). Le Règlement (EU) 2016/679 du Parlement Européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des données fixe le cadre juridique applicable aux traitements à caractère personnel. Seul le consentement est nominatif et sera traité séparément. Les analyses et le traitement des données sont eux anonymisés grâce au code SEROMED. L'étude a également reçu l'approbation du Comité de la Protection des personnes (ID RCB : 2016-A01000-51).

Après en avoir discuté et avoir obtenu réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche décrite ci-dessus. Je suis parfaitement conscient(e) que je peux retirer mon consentement à tout moment, et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité. Il suffit que j'en fasse la demande en contactant le Dr Pierre Gallian, biologiste à l'EFS PACA Corse, soit par mail pierre.gallian@efs.sante.fr soit par téléphone au 04 91 18 95 51, en précisant mon nom prénom date de naissance et les numéros d'identification figurant en bas de page (= Code SEROMED).

Je donne mon consentement éclairé pour la participation à cette étude.

J'accepte qu'un tube de mon sang et les données du questionnaire puissent être utilisés à des fins de recherche.

J'accepte la réalisation d'analyses sur mon sang.

Fait à ……, le ……

Signature du médecin EFS

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

Signature du donneur

Age _____ Sexe : Masculin ☐ Féminin ☐

1. **Quelle est votre situation?**
   - ☐ Salarié(e) du public/privé
   - ☐ Mère ou père au foyer
   - ☐ Demandeur/demandeuse d'emploi
   - ☐ Scolaire / étudiant(e)
   - ☐ Retraité(e) / pré-retraite(e)
   - ☐ En congé parental
   - ☐ Autre : ……

2. **Exercez-vous (ou avez exercé) une activité professionnelle ?**
   - ☐ Oui
   - ☐ Non

   Si oui : Laquelle de ces propositions correspond le mieux **à votre activité principale** ?

   - ☐ Agriculteurs exploitants
   - ☐ Artisans, commerçants et chefs d'entreprise
   - ☐ Cadres et professions intellectuelles supérieures
   - ☐ Professions Intermédiaires
   - ☐ Employés
   - ☐ Ouvriers
   - ☐ Retraités
   - ☐ Autres : ……

3. **Quel est le diplôme le plus élevé que vous avez obtenu ?**
   - ☐ Aucun diplôme
   - ☐ Niveau Brevet des collèges / CAP / BEP
   - ☐ Niveau Baccalauréat
   - ☐ Niveau Bac + 2
   - ☐ Niveau supérieur ou égal à Bac + 3 (Licence, Master, Ingénieur, Doctorat, …)

4. **Quel est le code postal de votre résidence principale ?**
   ……

5. **Vous et votre famille habitez actuellement dans (résidence principale):**
   - ☐ Une maison individuelle
   - ☐ Une ferme (présence animaux d'élevages)
   - ☐ Un appartement

6. **La distribution d'eau de votre logement est-elle faite (résidence principale) :**
   - ☐ à partir d'un réseau collectif de distribution
   - ☐ à partir d'un réseau privé (puits, forage)
   - ☐ NSP

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

7. **Comment les eaux usées de votre logement sont-elles gérées (résidence principale):**
   - ☐ Tout à l'égout
   - ☐ Fosse sceptique
   - ☐ Autre (précisez) : ……
   - ☐ NSP

8. **Avez-vous régulièrement des contacts avec des eaux usées (dans le cadre de votre activité professionnelle par exemple)?**
   - ☐ Oui
   - ☐ Non

   Si oui :

   - ☐ Dans une station d'épuration
   - ☐ Dans les égouts
   - ☐ Autre (fosse septique …) ……

9. **Consommation d'eau (placez les croix dans le tableau):**

	Jamais	Rarement	Souvent
Eau du robinet			
Eau en bouteille			
Fontaines (fontaines de village)			
Eau de source (en nature)			

10. **Pratiquez-vous l'élevage?**
    - ☐ Oui
    - ☐ Non

    Si oui, dans quel cadre :

    - ☐ Il s'agit de ma profession
    - ☐ Pour ma production personnelle

    Si oui quel type d'élevage pratiquez-vous? (plusieurs réponses possibles)

    - ☐ Poulets
    - ☐ Canards ou oies
    - ☐ Porcs
    - ☐ Vaches
    - ☐ Moutons et de brebis
    - ☐ Chèvres
    - ☐ Chevaux ou poneys
    - ☐ Lapins
    - ☐ Autre type d'élevage (préciser) : _____

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

11. Habitez-vous à moins de un kilomètre d'une ferme ou d'un élevage ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

Si oui quel type d'élevage ? (plusieurs réponses possibles)

- ☐ Poulets
- ☐ Canards ou d'oies
- ☐ Porcs
- ☐ Vaches
- ☐ Moutons et de brebis
- ☐ Chèvres
- ☐ Chevaux ou de poneys
- ☐ Lapins
- ☐ Autre type d'élevage (préciser) _____

12. Pratiquez-vous la chasse ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

Si oui, quel type d'animal (plusieurs réponses possibles)?

- ☐ Du sanglier
- ☐ Gros gibiers
- ☐ Petits gibiers
- ☐ Autre, précisez : _____

13. Pratiquez-vous le dépeçage d'animaux sauvages :

- ☐ Oui
- ☐ Non

14. Pratiquez-vous l'éviscération d'animaux sauvages ?

- ☐ Oui
- ☐ Non (allez à la question 15)

Si oui : portez-vous du matériel de protection (gants, masque, combinaison) ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

15. Dans le cadre de votre travail, avez-vous des contacts avec des animaux (vivants ou morts) ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

Si oui précisez les animaux : ……

Si oui dans quel cadre (plusieurs choix possibles) :

- ☐ Dans une ferme, un élevage

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

- ☐ Dans un abattoir
- ☐ Dans une pisciculture
- ☐ Autre, précisez : _____

16. Dans la liste des aliments ci-dessous, consommez-vous ? (placez les croix dans le tableau))

Liste des aliments	Fréquence consommation			Type de Cuisson (plusieurs réponses possibles)		
	Jamais	Rarement	Souvent	Cru	Saignant ou cuisson intermédiaire	Bien cuit
Petits gibiers (lièvres, perdrix…)						
Grands gibiers (cerfs, sangliers…)						
Porc						
Pâtés, saucisses						
Foie de porc						
Ficatellu (saucisse au foie de porc)						
Ficatellu cru sec						
Abats						
Boeuf						
Volailles						
Fruits de mer						
Poissons						
Fruits et légumes BIO ou du potager personnel						
Baies sauvages						

17. Avez-vous déjà voyagé dans une des zones géographiques suivante (plusieurs choix possibles) ?

- ☐ Afrique
- ☐ Océanie
- ☐ Asie
- ☐ Îles de l'Océan Indien
- ☐ Amérique Centrale et du Sud
- ☐ Îles du Pacifique
- ☐ Antilles et Caraïbes

CODE SEROMED
19-EFS-«code_seromed»

Mode opératoire de la ponction capillaire

SéroMed

Ne pas oublier de se désinfecter les mains et de bien noter le numéro patient sur le tube de collecte

1
- Choisir avec le patient le point de ponction (majeur ou annulaire)
- Demander au patient de se laver les mains avec de l'eau chaude et du savon,
- Secouer la main vers le bas afin de faire affluer le sang vers le bout du doigt
- Masser la paume vers l'extrémité du doigt à piquer
- Aseptiser le point de ponction avec le gel et la compresse

2
- Sortir l'auto-piqueur du kit fourni
- Enlever le capuchon stérile en le faisant pivoter

3
- Presser l'auto-piqueur sur le doigt et appuyer sur le bouton

4
- Ouvrir le tube « collecteur » et placer le petit entonnoir au dessus
- Prendre le doigt du patient et faire couler le sang au niveau de l'entonnoir jusqu'à remplissage du tube, pour cela il faut masser le doigt et non presser fortement

5
- Fermer le tube rempli en vissant le bouchon (clic)
- Ecrire les deux derniers chiffres du « code patient » sur le tube

Ex : 01 ou 02 etc.

- Comprimer le point de ponction avec une compresse, puis enlever les gants et se laver les main

6
- Attendre au minimum 30minutes
- Puis centrifuger le tube pendant 15 min

7
- Placer le tube centrifugé dans l'absorbant, puis dans le sachet plastique de transport. Enfin placer le tout dans l'enveloppe de retour pré affranchie,
- Ne pas oublier d'y joindre le questionnaire

Inserm — Institut national de la santé et de la recherche médicale
Sentinelles — Réseau Sentinelles
Aix Marseille université
Università di Corsica Pasquale Paoli
IRD — Institut de recherche pour le développement

Annexe 6 Fiche de collecte étude porcins

Fiche collecte prélèvements filière porcine			
Date			Description de l'élevage
Eleveur			
Code Eleveur	Type de porc	Numéro	Commentaires

Abstract

The Hepatitis E Virus (HEV) is an RNA single-stranded positive of 7,2kb and responsible for twenty millions of infections and 70,000 deaths every year in the world. In industrialized countries, like France, human cases are caused by genotype 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4), are sporadic and mainly due to zoonotic origin. The role of *Suidae* in these transmissions is frequently reported in the literature, whether through contact with animals, consumption of meat products, or products with pork liver. A French study in 2016 among blood donors showed a regional anti-HEV IgG seroprevalence of 60% on the island (but with a little number of donors included). In addition, studies on domestic pigs in Corsica have also shown a higher seropositive rate than on the continental French. Finally, *ficatellu*, which is widely consumed on the island has been repeatedly implicated to be at the origin of human cases and frequently reported positive for the detection of viral RNA.

In this context, the objectives of the thesis were to confirm the hyper-endemicity of Corsica for the human and animal population with a solid number of samples and to determine what were the risk factors associated with the detection of the markers of infection. For this, we have conducted three main studies: (i) a seroprevalence study among blood donors population with anti-HEV IgG quantification, (ii) a seroprevalence study in three Corsican adult populations with a specific questionnaire and (iii) a study of infection of domestic Corsican pigs within the traditional pigs breeding.

We have calculated very high detection rates of infection markers in human and animal populations, thus confirming the hyperendemicity of Corsica. In addition, we have shown that the exposure on the island seemed to be homogeneous, across the different geographical areas of the island, the different adult populations studied and the different pig farms. We have identified new risk factors such as *fittonu* consumption and skinning/butchering, but also confirmed factors already described in the literature such as *ficatellu* consumption and the effect of increasing age on IgG anti-HEV detection. Our results also showed trends in the possible environmental secondary route of transmission (mountain spring water, wild berries, etc.).

Among traditional pig farms, we confirmed that the critical period for HEV swine infection was at the age of 3-4 months and that no pigs older than 9 months were positive for the RNA HEV detection. We also identified the two genotypes circulating in Corsica, genotypes 3c and 3f. These results suggest that, despite the high exposure of pigs to the virus in Corsica, the late slaughtering typical of traditional breeding could mean that products from this sector are less at risk than the industrial sector. All the results of this thesis have improved the understanding of the HEV epidemiology in Corsica and to set up coherent research perspectives for the future, including the environmental aspect.

Key words: Hepatitis E virus - Seroprevalence - Epidemiology - Corsica - Pigs - Real-time PCR - Serology - Viral RNA

Résumé

Le virus de l'hépatite E (HEV) est un virus à ARN simple brin positif d'environ 7,2kb et responsable de 20 millions d'infections et de 70 000 décès par an dans le monde. Dans les pays industrialisés comme la France, les génotypes en cause sont les génotypes 3 et 4, les cas humains sont sporadiques et majoritairement d'origine zoonotique. Le rôle des suidés dans ces transmissions est maintenant avéré dans la littérature, que ce soit par le contact avec les animaux, la consommation de produit carnés, ou à base de foie de porc. Une étude française de 2016 chez les donneurs de sang a montré une séroprévalence des IgG anti-HEV régionale de 60% sur l'île (mais avec un échantillon faible). De plus, des études sur les porcs domestiques en Corse ont également démontré un taux de porcs séropositifs plus élevé que sur le continent. Enfin, le *ficatellu*, qui est largement consommé sur l'île a été de nombreuses fois mis en cause dans la littérature pour être à l'origine de cas humains et positif pour la détection de l'ARN viral.

C'est dans ce contexte que les différents travaux de thèse ont été menés afin d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie du HEV dans cette région supposée hyperendémique. Les objectifs de la thèse ont été de confirmer l'hyper endémicité de la Corse que ce soit pour la population humaine et animale avec un nombre d'échantillons solide et de déterminer quels étaient les facteurs de risques associés à la détection des marqueurs d'infection. Pour cela nous avons mis en place et mené trois études principales : (i) une étude de séroprévalence chez les donneurs de sang et la quantification des anticorps IgG anti-HEV, (ii) une étude de séroprévalence au sein de trois populations adultes corses avec un questionnaire spécifique et (iii) une étude de l'infection des porcs domestiques corses au sein de la filière porcine traditionnelle.

Nos résultats ont permis de calculer des taux de détection des marqueurs d'infection très élevés en population humaine et animale, confirmant ainsi l'hyperendémicité de la Corse. De plus, nous avons pu démontrer que l'exposition sur l'île semblait être homogène, que ce soit à travers les différentes zones géographiques de l'île, les différentes populations adultes étudiées et les différents élevages porcins. Nous avons déterminé de nouveaux facteurs de risque comme la consommation de *fittonu* et la pratique du dépeçage/éviscération, mais également confirmé des facteurs déjà décrits dans la littérature comme la consommation du *ficatellu* et l'effet de l'âge sur la détection des anticorps IgG anti-HEV. Certains de nos résultats ont également montré des tendances sur l'éventuelle présence du virus au niveau environnemental (eau de source en montagne, baies sauvages, etc.). Au sein des élevages porcins, nous avons pu confirmer que la période critique pour l'infection des porcs se situait à l'âge de 3-4 mois et qu'aucun des porcs âgés de plus de 9 mois n'était positif à la détection de l'ARN viral. Nous avons également identifié les deux souches circulant en Corse, génotypes 3c et 3f. Ces résultats suggèrent que malgré une forte exposition des porcs au virus en Corse, l'âge d'abattage tardif propre à l'élevage traditionnel pourrait signifier que les produits issus de cette filière sont moins à risque que la filière industrielle. L'ensemble des résultats de cette thèse a permis de mieux comprendre l'épidémiologie du HEV en Corse et de mettre en place des perspectives de recherche cohérentes pour l'avenir incluant fortement l'aspect environnemental.

Mots clés : Virus de l'hépatite E – Séroprévalence – Epidémiologie – Corse – Porcs – PCR en temps réel – Sérologie – ARN viral