

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : UMR de virologie 1161 ANSES-INRA-ENVA
Adresse : ANSES 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort
Responsable du Laboratoire : Stéphane Zientara
Responsable de l'encadrement : Emmanuel Breard
Téléphone : 01 49 77 27 07
E-mail : Emmanuel.breard@anses.fr
Co-encadrant éventuel : Corinne Sailleau

2. Description du stage (2 pages maximum) :

Titre : Développement d'un ELISA permettant la détection spécifique des anticorps dirigés contre la protéine VP2 du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine de sérotype 4 (FCO ou Bluetongue).

Mots clés : Clonage, expression de VP2 recombinante, purification, WB, ELISA.

Contexte et objectifs généraux : La fièvre catarrhale ovine (FCO) est une arbovirose transmise par des moucheron du genre Culicoides, infectant les ruminants d'élevages ou sauvages. La France continentale est infectée de façon endémique par 2 sérotypes du virus de la FCO (sérotipe 8 (depuis 2015) et 4 (depuis 2017)). Il existe 27 sérotypes du virus de la FCO, caractérisés par leur protéine virale VP2, constituant majeur de la capsid externe du virus, et qui est le déterminant antigénique spécifique du sérotipe.

Cette maladie est réglementée et les échanges commerciaux impliquant la sortie de ruminants domestiques du territoire métropolitain nécessitent le plus souvent le recours à la vaccination et à la démonstration que les animaux sont protégés contre les 2 sérotypes. La seule technique de laboratoire permettant de montrer que les ruminants sont protégés spécifiquement contre un sérotipe est la séroneutralisation. Cette méthode de diagnostic met en évidence la présence (ou absence) d'anticorps neutralisants sériques dirigés spécifiquement contre la protéine VP2. Elle nécessite la manipulation de virus vivant (en confinement A3) et 6 jours de réaction. Un test ELISA utilisant comme antigène une protéine VP2 recombinante permettrait de mettre en évidence la présence de ces anticorps neutralisant spécifiques de sérotipe en quelques heures. Un tel test ELISA a été récemment développé, seulement pour le sérotipe 8, par un fabricant de trousse vétérinaire, et est actuellement évalué dans notre laboratoire (qui est Laboratoire de Référence Nationale pour cette maladie animale). Nous proposons donc au stagiaire de Master 2 de participer au clonage et à l'expression de la protéine recombinante VP2 du sérotipe 4 et d'évaluer ses propriétés antigéniques par WB et ELISA afin, à plus long terme et en collaboration avec des fabricants de trousse vétérinaire, de disposer d'un ELISA pour le diagnostic sérologique spécifique de ce sérotipe.

Projet de stage : Le projet de ce stage est d'exprimer une protéine du virus de la FCO de sérotype 4 et d'évaluer si cette protéine recombinante est reconnue par les anticorps neutralisants spécifiques de ce sérotype. Le laboratoire possède une expérience importante dans le développement et l'évaluation d'outils de diagnostic (cf publications de Viarouge et al., Sailleau et al., Bréard et al., et Zientara et al. réalisées ces 18 dernières années). Le laboratoire dispose également d'une importante collection de virus et de sérums caractérisés. Le candidat devra donc travailler avec différentes personnes, dans des laboratoires de type P2 ou P3, et utilisera des techniques de biologie moléculaire (extraction ARN, RT-PCR conventionnelle, séquençage, clonage), de biochimie (gel acrylamide, purification), sérologique (WB, ELISA, séroneutralisation) et de culture cellulaire et bactérienne (expression de la protéine recombinante en système procaryote et/ou eucaryote).

Les objectifs de ce stage M2 sont :

- d'amplifier le gène codant la protéine VP2 en RT-PCR à partir d'ARN extraits de cultures de cellules infectées par le virus FCO de sérotype 4,
- de cloner le gène par recombinaison dans un vecteur (plasmide), lequel permettra ensuite, toujours par recombinaison, d'insérer le gène dans différents vecteurs d'expression (avec ajout d'un tag 6 histidines),
- d'exprimer la VP2 en système procaryote et/ou eucaryote (culture bactérienne et/ou de SF9 (cellules d'insecte), visualisation sur gel et WB anti-histidine),
- de purifier la VP2 à l'aide du tag 6 Histidines,
- d'évaluer les propriétés antigéniques de la VP2 recombinante par WB et ELISA.

Bibliographie :

Sélection d'autres publications de l'équipe sur le sujet:

Evaluation of an IGM-specific ELISA for early detection of bluetongue virus infections in domestic ruminants sera. Bréard E, Gorlier A, Viarouge C, Donnet F, Sailleau C, Schulz C, Hoffmann B, Comtet L, Beer M, Zientara S, Vitour D. *Transbound Emerg Dis.* 2019 Jan;66(1):537-545.

Emergence of bluetongue virus serotype 4 in mainland France in November 2017. Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Gorlier A, Leroux A, Hirschaud E, Lucas P, Blanchard Y, Vitour D, Grandcollot-Chabot M, Zientara S. *Transbound Emerg Dis.* 2018 Oct;65(5):1158-1162.

Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies. Breard E, Garnier A, Despres P, Blaise Boisseau S, Comtet L, Viarouge C, Bakkali-Kassimi L, Pourquoi P, Hudelet P, Vitour D, Rossi S, Belbis G, Sailleau C, Zientara S. *Transbound Emerg Dis.* 2017 Dec;64(6):1837-1847.

Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. Näslund K, Blomqvist G, Vernersson C, Zientara S, Bréard E, Valarcher JF. *Acta Vet Scand.* 2014 Dec 5;56:71.

Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. Bréard E, Lara E, Comtet L, Viarouge C, Doceul V, Desprat A, Vitour D, Pozzi N, Cay AB, De Regge N, Pourquoi P, Schirrmeyer H, Hoffmann B, Beer M, Sailleau C, Zientara S. *PLoS One.* 2013;8(1):e53446.

Ce stage peut-il se poursuivre par une thèse ? :

Oui, éventuellement (CIFRE)