



Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)

Adresse : 14 rue Pierre et Marie Curie ; 94700 Maisons-Alfort

Responsables du Laboratoire / Entreprise :

Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (UVE) : Sylvie Perelle

Laboratoire de Santé Animale, UMR 1161 Virologie : Stephan Zientara

Responsables de l'encadrement :

Sandra Martin-Latil (UVE) ; Nicole Pavio (UMR 1161 Virologie)

E-mail :

sandra.martin-latil@anses.fr

Nicole.pavio@anses.fr

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (1 page maximum) :

Etude de la réplication du virus de l'hépatite E dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2

Le virus de l'hépatite E (HEV) appartient au genre Orthohepevirus au sein de la famille des *Hepeviridae*. Il est responsable d'hépatites aiguës et il se transmet essentiellement par voie entérique après ingestion d'eau et d'aliments contaminés. En Europe, la majorité des cas sporadiques d'hépatite E résulte d'infections zoonotiques par le génotype 3 (HEV-3). De nombreuses espèces animales domestiques et sauvages sont infectées par le HEV, mais le principal réservoir animal est le porc. Les risques d'infection humaine d'origine zoonotique sont principalement associés à la consommation de viandes (insuffisamment cuites) provenant d'animaux infectés par le HEV.

Il existe plusieurs modèles de culture cellulaire du HEV dans des cellules d'origine hépatocytaire (HepaRG, PLC-PRF5) ou pulmonaire (A549) mais ces modèles manquent de sensibilité et le cycle viral reste relativement long et peu productif. La présence d'un effet cytopathique (ECP) n'a pas été observée. La transmission entérique du HEV est appuyée par la multiplication du virus dans des cellules primaires intestinales, des explants intestinaux ou dans la lignée d'origine intestinale Caco-2. A ce jour, l'étude des interactions du HEV avec la barrière intestinale est encore limitée et le modèle d'infection des cellules Caco-2 insuffisamment caractérisé.

Par ailleurs, en culture cellulaire, comme dans le sang des individus infectés, les particules de HEV sont sous la forme quasi-enveloppée (eHEV) tandis que dans les selles des individus infectés, les particules HEV sont nues (nHEV). Il y a encore peu de données sur les interactions de ces différentes particules du HEV avec les cellules intestinales.

L'objectif du projet est d'étudier la réplication des différents types de particules de HEV dans les cellules Caco-2 afin de développer un modèle cellulaire robuste et sensible.

Des résultats préliminaires obtenus récemment au laboratoire confirment la réplication d'un HEV-3 dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 non différenciées. Ainsi, des cinétiques d'infection des cellules Caco-2 avec ces deux types de particules du HEV seront

établies. Pour cela, les cellules Caco-2 seront infectées avec du HEV de génotype 3 (HEV-3) provenant de surnageants de cellules infectées (HepaRG infectées par la souche FR-HuHEVF3f : JN906974 ou A549 infectées avec la souche adaptée 47832c) traités ou non avec un détergeant (ex. tween 0,2%) pour délipider les particules eHEV-3 produites *in vitro*. Les infections seront réalisées à la même multiplicité d'infection sur des cellules non différenciées et des cellules différenciées en entérocytes. Après l'infection des cellules, la quantité de HEV dans les cellules infectées et dans leur surnageant de culture sera déterminée par RT-qPCR au cours de la cinétique d'infection. L'expression de la protéine de capsid du HEV dans les cellules infectées pourra également être recherchée par des marquages en immunofluorescence. Au cours de la réalisation de ces cinétiques d'infection, la présence d'un ECP, dû à la mort des cellules infectées, sera recherchée au microscope optique pour déterminer si le cycle viral est lytique ou persistant.

De plus, le métabolisme glucidique pouvant être modulé au cours des infections virales, une étude sera menée pour mesurer l'effet des deux types de particules du HEV-3 sur le catabolisme du glucose dans les cellules Caco-2. Pour cela, la prise du 2-deoxyglucose, analogue du glucose, sera mesurée en utilisant le kit *Glucose Uptake-Glo™ Assay* (Promega). La production de métabolites comme l'ATP (*Viral ToxGlo™ Assay* ; Promega) et le lactate (*Lactate-Glo™ Assay*) sera également évaluée.

En développant un modèle cellulaire dans lequel le HEV se réplique efficacement, ce projet permettra d'ouvrir de nombreuses perspectives de recherche en virologie sur le thème des interactions « hôte-pathogène ».