



Virus transmis par voie alimentaire : du fondamental à l'appliqué

Sandra Latil

► To cite this version:

Sandra Latil. Virus transmis par voie alimentaire : du fondamental à l'appliqué. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Est, 2020. <tel-04571162>

HAL Id: tel-04571162

<https://hal.science/tel-04571162v1>

Submitted on 7 May 2024

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.



Distributed under a Creative Commons CC0 1.0 - Universal - International License

Habilitation à Diriger des Recherches

Virus transmis par voie alimentaire : du fondamental à l'appliqué

Ecole Doctorale : ED 581 ABIES

Dr Sandra Martin-Latil

Soutenance le 31 mars 2020 devant le jury composé de :

- Dr Soizick LE GUYADER, rapporteur
- Pr Albert BOSCH, rapporteur
- Pr Jacques IZOPET, rapporteur
- Dr Noël TORDO, examinateur
- Pr Anne-Marie ROQUE-AFONSO, examinateur
- Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI, examinateur
- Dr Sylvie PERELLE, examinateur

Anses
Laboratoire de Sécurité des Aliments
Unité des Virus Entériques
14 rue Pierre et Marie Curie
94700 Maisons-Alfort cedex
Tel : 01 49 77 28 24

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES	5
CURRICULUM VITAE DETAILLE	6
Cursus universitaire	6
Fonction actuelle.....	6
Expérience post-doctorale	7
Expérience doctorale	7
Responsabilité de recherche.....	8
Activité de formation par la recherche.....	11
Autres activités	14
Formation	14
Valorisation.....	15
PARTIE I : SYNTHESE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE	20
TRAVAUX DOCTORAUX ET POST-DOCTORAUX	20
1. Interaction des rotavirus avec les cellules intestinales : conséquences physiopathologiques.....	20
2. Interaction du poliovirus avec les cellules neuronales : conséquences fonctionnelles	25
3. Franchissement de la barrière intestinale par HTLV-1	26
TRAVAUX REALISES A L'ANSES	27
1. Développement de méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments.....	27
2. Etude du cycle viral infectieux pour contribuer à l'évaluation du risque viral	39
CONCLUSIONS	43
PARTIE II : PROGRAMME DE RECHERCHE.....	44
EVALUATION DU RISQUE LIE A LA TRANSMISSION DU VHA ET DES NOROVIRUS HUMAINS PAR VOIE ALIMENTAIRE	46
1. Développement d'une méthode d'analyse cellulaire pour la détection des particules infectieuses du VHA et des NoV	46
2. Apports des méthodes d'analyse cellulaire à la virologie alimentaire.....	49
EVALUATION DU RISQUE LIE A LA TRANSMISSION DU HEV PAR VOIE ALIMENTAIRE	52
1. Développement d'une méthode de détection du HEV	52
2. Evaluer la méthode de quantification du HEV pour ses applications en virologie alimentaire.....	53
CONCLUSION	54
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury d'Habilitations à Diriger les Recherches et de donner de votre temps pour évaluer ce travail en tant que rapporteurs (Soizick LE GUYADER, Albert BOSCH et Jacques IZOPET) et examinateurs (Anne-Marie ROQUE-AFONSO, Noël TORDO, Pierre-Emmanuel CECCALDI et Sylvie PERELLE).

Je profite également de ce mémoire pour adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes que j'ai croisées au cours de ces années.

Je remercie les personnes rencontrées à l'INSERM U510 et plus particulièrement:

Monique VASSEUR qui m'a transmis sa passion pour le métier de chercheur et qui m'a donné envie de poursuivre en thèse.

Monique GENITEAU-LEGENDRE et jacqueline COTTE-LAFFITTE qui m'ont transmis la démarche scientifique dans un environnement bienveillant et rassurant.

Alain SERVIN, directeur de l'U510, qui m'a fait confiance et qui a toujours cru en mes capacités.

Je remercie les personnes rencontrées à l'Institut Pasteur et plus particulièrement:

Bruno BLONDEL et Florence COLBERE-GARAPIN pour leur confiance, leur disponibilité et leurs précieux conseils. J'ai beaucoup appris à vos côtés, et ce, dans une ambiance chaleureuse et sérieuse. Pierre-Emmanuel CECCALDI pour sa gentillesse, son sens de l'écoute et son aide lors des concours et entretiens que j'ai passés.

Mes collègues et amis que je revois régulièrement, Laurence, Karine, Aure, Viviane, Cyril et Patricia.

Je remercie également mes collègues du Laboratoire de Sécurité Sanitaire des Aliments, et plus particulièrement :

Laurent LALOUX, mon directeur de Laboratoire, pour sa confiance et son soutien lors de mon passage en catégorie 1.

Sylviane DRAGACCI pour ses précieux conseils lors de l'écriture de mon mémoire d'HDR.

Mes collègues actuelles de l'unité VE qui m'accompagnent depuis 10 ans et sans qui je n'aurais pas pu écrire cette si jolie histoire sur la sécurité des aliments.

Sylvie PERELLE, je te remercie infiniment pour la confiance que tu m'accordes depuis mes débuts, pour nos discussions scientifiques, pour ton soutien à toute épreuve..., pour ton côté rassurant lors de mes moments de doutes et de stress.

Catherine HENNECHART-COLLETTE qui m'accompagne depuis mes débuts à l'Anses, ce fut un réel plaisir de partager ces moments de joie avec toi et je suis ravie que tu aies pu mener à bien ta thèse, quelle ténacité !

Audrey FRAISSE pour sa rigueur scientifique, sa bonne humeur à toute épreuve et son sens de l'humour merci de m'accompagner dans les nouveaux projets que je souhaite mener !

Océane DEHAN, notre « petite » nouvelle et ancienne de l'unité EPVO à Pasteur, comme moi :) qui m'a permis de retrouver certains pasteuriens.

Merci également aux anciens de l'unité, et plus particulièrement Florian NIVEAU que j'aurais bien aimé voir rester ...

Laurent GUILLIER, je te remercie pour tous nos échanges scientifiques, notamment dans le domaine de l'évaluation du risque ; et pour tes précieux conseils lors de l'analyse statistique et la modélisation de nos données. Un grand merci pour ton soutien et ton amitié !

Mes collègues et amis de l'Anses Hélène, Véronique, Sylvie (partie en retraite), Alexandra, Léna (en Suisse maintenant), Sabine, Sandrine, Sophie, Sara, Lorraine, Sandra et Damien.

Une pensée très amicale pour les étudiants que j'ai eus plaisir à encadrer dans les différents laboratoires. Je vous adresse tous mes meilleurs vœux de réussite pour vos projets futurs professionnels et personnels et j'espère vous avoir transmis ce que j'ai reçu.

Merci à tous mes collaborateurs, co-auteurs de publications et amis.

Enfin, je tiens à remercier bien affectueusement mes amis et ma famille. Ma mère qui a cru en moi et qui m'a toujours soutenue pour aller jusqu'au bout du métier dont je rêvais, mais également mes grands-parents qui m'ont quittée et mon père parti trop tôt.

Mon mari Laurent, très indulgent et compréhensif quand ma vie professionnelle « déborde » un peu sur notre vie privée... et mon « petit ange adoré » Maxime toujours prêt à me faire rire !

ABREVIATIONS

ANOVA : Analyse de variance

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ATL : Leucémie/lymphome T de l'adulte (*Adult T-cell Leukemia*)

CEN : Comité Européen de Normalisation

BBM : Membrane de bordure en brosse (*Brush Border Membran*)

Bcl-2 : *B Cell Lymphoma 2*

CF : Carboxyfluorescéine

DEA : Diplôme d'Etudes Approfondies

DIM : Domaine d'Intérêt Majeur

DLP : Particule à Double Capside (*Double Layer Particle*)

EAC : Contrôle Externe d'Amplification (*External Control of Inhibition Amplification*)

ECP : Effet Cytopathogène

EJP : European Joint Program

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

HEV : Virus de l'Hépatite E

HTLV-1 : Virus T Lymphotrope Humain de type 1

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

InVS : Institut de Veille Sanitaire

Irstea : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'environnement et l'agriculture

ISO : Organisation Internationale de Normalisation (*International Organization for Standardization*)

JNK : c-jun NH2-terminal kinase

NGS : *Next Generation Sequencing*

NoV : norovirus

PV : poliovirus

PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase

SGLT1 : co-transporteur Na⁺-Glucose

SI : Saccharase-Isomaltase

SNC : Système Nerveux Central

SPF : Santé Publique France

TGEB : Tris Glycine Extrait de Bœuf

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

TLP : Particule à Triple Capside (*Triple Layer Particle*)

TSP/HAM : Paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (*Tropical Spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy*)

PEG : Polyéthylène Glycol

VHA : Virus de l'Hépatite A

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Entrée du rotavirus par endocytose selon un mécanisme Ca^{2+} -dépendant.	21
Figure 2. Structure de l'épithélium intestinal et différenciation crypto-villositaire des cellules épithéliales.	23
Figure 3. Altérations fonctionnelles induites par les rotavirus.	24
Figure 4. Mort cellulaire par apoptose induite par le poliovirus.	25
Figure 5. Franchissement de la barrière intestinale par HTLV-1.	26
Figure 6 : Pourcentages des foyers de TIAC ayant pour origine un agent viral entre 2006 et 2017.	27
Figure 7 : Processus analytique pour la détection des hNoV et du VHA dans l'eau et les aliments.	28
Figure 8. Efficacités d'extraction des virus entériques à partir des aliments.	30
Figure 9. Rendements d'extraction des virus pathogènes et contrôles de processus.	31
Figure 10. Digital RT-qPCR avec le système BioMark (Fluidigm).	32
Figure 11. Séquences des couples d'amorces et sondes utilisés pour la détection des 6 génotypes du VHA.	34
Figure 12. Localisation des régions du génome du VHA amplifiées par RT-qPCR.	34
Figure 13. Méthode développée pour la détection du HEV par RT-qPCR dans les figatelles.	37
Figure 14. Différence entre la quantification des génomes du HEV obtenue par RT-qPCR et celle obtenue par RT-dPCR (Log_{10} (copies génomes)).	38
Figure 15. Principe de l'utilisation des monoazides en amont de la RT-qPCR pour la détection des génomes viraux provenant de particules virales intactes.	39
Figure 16. Principe de la mesure de l'impédance cellulaire en temps réel avec le système DP xCELLigence (ACEA).	40
Figure 17. Méthode de titrage de la souche adaptée du VHA (HM175/18f) par impédancemétrie.	41
Figure 18. Développement d'outils diagnostics permettant la détection des particules virales infectieuses et leurs applications en virologie alimentaire.	45

CURRICULUM VITAE DETAILLE

Etat civil

MARTIN-LATIL Sandra, PhD

10 allée des fées

92160 Antony

Née le 9 décembre 1976 à Nantes (44)

Mariée, 1 enfant

Tel professionnel : 01 49 77 24 28

E-mail : sandra.martin-latil@anses.fr

CURSUS UNIVERSITAIRE

2000 - 2004 DOCTORAT en Sciences (Mention très honorable)

Université Paris XI

Ecole doctorale ED569, Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué

Titre de la thèse : « Interaction des rotavirus avec les cellules intestinales : conséquences fonctionnelles ».

Thèse réalisée dans l'unité INSERM U510, sous la direction du Pr Anne-Marie Quero ; Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

1999 - 2000 DEA de Microbiologie (Mention Bien)

Université Paris XI

Option Ecologie Microbienne, Pathogénie des Micro-organismes et Agents anti-infectieux

Titre du DEA : « Mécanisme d'entrée du rotavirus ».

Stage de DEA réalisé dans l'unité INSERM U510, sous la direction du Dr Monique Vasseur ; Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

FONCTION ACTUELLE

2009 - 2019 Chef de projets de recherche (Catégorie 1 depuis le 1^{er} janvier 2019)

Chargée de projets scientifiques (Catégorie 2 de 2009 à 2018)

ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons-Alfort, France

Laboratoire de Sécurité des aliments, Unité des Virus Entériques (Dr S. Perelle)

Thématiques de recherche

▪ **Virologie alimentaire**

⇒ Développement / optimisation des méthodes de détection des virus (norovirus, rotavirus, virus de l'hépatite A et E) dans l'eau et les aliments

⇒ Etude du caractère infectieux des virus entériques pour améliorer l'évaluation du risque viral

⇒ Réalisation d'études d'inactivation virale et évaluation de l'efficacité de procédés de décontamination utilisés dans les industries agroalimentaires

▪ **Etude des interactions « hôte – pathogène viral »**

⇒ Etude des mécanismes cellulaires impliqués dans l'apoptose viro-induite

⇒ Etude des mécanismes cellulaires impliqués dans le franchissement de la barrière intestinale par les virus hépatiques à transmission entérique

EXPERIENCE POST-DOCTORALE

2007 - 2009 Chercheur contractuel

Contrat post-doctoral financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR)

INSTITUT PASTEUR, Paris, France

Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes (Pr Antoine Gessain)

Thématique de recherche

Etude des interactions « hôte – pathogène viral »

Transmission de HTLV-1 de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement

- ⇒ Développement d'un modèle *in vitro* mimant la barrière intestinale humaine pour étudier le mécanisme cellulaire utilisé par le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) pour franchir l'épithélium intestinal

2004 - 2007 Chercheur contractuel

Contrat post-doctoral financé dans le cadre d'un projet avec DANONE

INSTITUT PASTEUR, Paris, France

Unité de Biologie des Virus Entériques (Dr Florence Colbère-Garapin)

Thématiques de recherche

▪ ***Etude des interactions « hôte – pathogène viral » : Conséquences physiopathologiques***

- ⇒ Etude des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par deux virus entériques : le rotavirus et le poliovirus

▪ ***Etude des interactions « hôte – pathogène viral – microbiote » : Bénéfices des probiotiques lors d'une infection virale***

Projet en collaboration avec DANONE Vitapole

- ⇒ Mise au point d'un modèle *in vitro* et *in vivo* pour réaliser le criblage de bactéries probiotiques capables d'inhiber la réplication du rotavirus et/ou de protéger les cellules infectées par le rotavirus de la mort cellulaire par apoptose
- ⇒ Transfert technologique du modèle *in vitro* développé auprès de TEXCELL

EXPERIENCE DOCTORALE

2000 - 2004 Doctorante

Allocataire de recherche MENRT, Bourse de fin de thèse de la FRM

Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, France

Unité INSERM 510 (Dr Alain Servin)

Thématique de recherche

▪ ***Etude des interactions « hôte – pathogène viral » : Conséquences physiopathologies***

- ⇒ Etude des mécanismes d'entrée du rotavirus
- ⇒ Caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'altération des enzymes de digestion (saccharase-isomaltase et lactase) et du co-transporteur Na⁺-Glucose (SGLT1)

RESPONSABILITE DE RECHERCHE

2019 - 2020 Responsable du projet intitulé « *Développement d'une méthode utilisant l'impédance cellulaire comme mesure de l'infectiosité du HEV en culture cellulaire* ».

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaboration : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie 1161 (*Maisons-Alfort*)
- ⇒ Objectifs : (i) Développer une méthode de détection des particules virales infectieuses du HEV par impédancemétrie et (ii) Evaluer son utilisation pour caractériser la présence de virus infectieux dans les matrices alimentaires contaminées (ex : matrices carnées)
- ⇒ Encadrement de stagiaire : Corine HOFFER (*étudiante en Master 2 ; stage de 6 mois*)
- ⇒ Valorisation : Mémoire de fin d'étude

2018 - 2020 Participation au projet **EJP (European Joint Program) METASTAVA** intitulé « *Standardisation and validation of metagenomics methods for the detection of foodborne zoonoses, antimicrobial resistance and emerging threats* »
WP3 : Evaluation of the analytical properties of metagenomic workflows for both viral and bacterial model targets.

Task leader 3.2: Norovirus (NoV)

- ⇒ Convention : 170269
- ⇒ Coordination : CODA-CERVA*, Veterinary and Agrochemical Research Center (Belgique)
- ⇒ Collaborations : FLI, Friedrich-Loeffler-Institut (Allemagne) ; WIV-ISP*, Scientific Institute of Public Health (Belgique) ; SVA, National Veterinary Institute (Suède) ; Anses, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (France) ; NCOH-Erasmus Medical Center, Netherlands Center for One Health
- * *SCIENSANO (since April 1st, 2018 merger of WIV-ISP and CODA-CERVA)*
- ⇒ Objectifs : Evaluer et harmoniser des approches de métagénomique pour séquencer les génomes de pathogènes (dont HEV et NoV) issus d'échantillons alimentaires

2018 - 2019 Responsable du projet intitulé « *Evaluation du risque viral lié à la transmission du rotavirus par l'eau* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaboration : Laboratoire Recherche et Développement Biologie à Eau de Paris (*Ivry sur Seine*)
- ⇒ Objectifs : (i) Valider et caractériser (*i.e.* sensibilité, quantification) la méthode de détection du rotavirus par impédancemétrie ; (ii) Evaluer l'utilisation de la méthode par impédancemétrie pour la détection des particules infectieuses du rotavirus dans l'eau
- ⇒ Encadrement de stagiaire : Nathalie BARBOSA (*étudiante en Licence Pro IPCS : Biotechnologie (Université Paris Descartes) ; contrat d'apprentissage d'un an*)
- ⇒ Valorisation : Mémoire de fin d'étude

2017 - 2020 Responsable du projet **VHA-WATERIMP** intitulé « *Evaluation de l'infectiosité du VHA par impédancemétrie lors de sa détection dans l'eau* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Objectif : Evaluer l'utilisation de la méthode de titrage de la souche adaptée du VHA par impédancemétrie pour quantifier les particules virales infectieuses issues d'échantillons d'eau
- ⇒ Valorisation : Communication orale (6)

2017 - 2020 Responsable du projet **VHA-THERMIMP** intitulé « *Evaluation de l'infectiosité du VHA par impédancemétrie lors de son inactivation thermique* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Objectifs : Evaluer l'utilisation de la méthode de titrage par impédancemétrie développée pour la souche adaptée du VHA dans le cadre d'études d'inactivation thermique
- ⇒ Valorisation : Communications orales (2 et 5)

- 2017 - 2010** Responsable du projet **IMPRAW** intitulé « *Evaluation de l'infectiosité du norovirus murin (MNV) par impédancemétrie dans les macrophages* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Objectifs : Evaluer l'utilisation de l'impédance cellulaire comme mesure de l'infectiosité du MNV dans la lignée cellulaire Raw et développer une méthode de titrage par impédancemétrie
- 2017 - 2018** Responsable du projet intitulé « *Evaluation de la mise en évidence de l'infectiosité des rotavirus par impédance cellulaire* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Objectifs : (i) Evaluer l'utilisation de l'impédance cellulaire comme mesure de l'infectiosité du rotavirus (souche simienne SA11 et humaine Wa); (ii) Etablir un lien entre le cycle de réplication du rotavirus et la modification de l'impédance cellulaire viro-induite
 - ⇒ Encadrement de stagiaire : Nathalie BARBOSA (*étudiante en BTS, 2 stages de 8 semaines*)
 - ⇒ Valorisation : Mémoires de fin d'étude
- 2015 - 2018** Responsable du projet de thèse **INFECT-VHA-ASSAY** intitulé « *Etude du cycle infectieux du virus de l'hépatite A (VHA) et développement de modèles in vitro pour mettre en évidence son infectiosité* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Collaboration : CNR du virus de l'hépatite A
 - ⇒ Objectifs : Etudier le caractère infectieux du VHA en mesurant l'impédance cellulaire et en identifiant les voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire par apoptose induite par la souche adaptée du VHA
 - ⇒ Encadrement de doctorant : Samuel LEBOURGEOIS
 - ⇒ Valorisation : Mémoire de thèse ; Article scientifique (2) ; Communications orales (1, 4 et 7) ; communication affichée (4)
- 2015 - 2018** Responsable du projet **Extract-VHE** intitulé « *Détection du HEV dans les foies de porc cru* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Objectifs : Optimiser la méthode de détection du HEV dans les matrices carnées en évaluant différents protocoles d'extraction du HEV
 - ⇒ Valorisation : Article scientifique (1) ; Communication orale (3); Communication affichée (3)
- 2015 - 2017** Participation au projet **INFECT-NOV** intitulé « *Détection des NoV infectieux* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Objectifs : Développer une méthode combinant l'utilisation de molécules chimiques (monoazides, dérivés du platine) et la RT-qPCR pour la détection des génomes des NoV humains provenant de particules virales infectieuses
 - ⇒ Valorisation : Article scientifique (3) ; Communications affichées (1 et 2)
- 2014 - 2016** Participation au projet **Extract-Fruits** intitulé « *Quantification absolue des virus entériques contaminants les fruits rouges* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Objectifs : Evaluer l'utilisation de la digital RT-PCR en microfluidique et la comparer avec la RT-qPCR conventionnelle pour quantifier les génomes du VHA et des NoV dans les fruits rouges
 - ⇒ Valorisation : Article scientifique (4)
- 2014 - 2015** Responsable du projet **CI-VHA (DIM-Malinf n°140075)** intitulé « *Etude du cycle infectieux du VHA et développement de modèles de détection de son infectiosité in vitro* »
- ⇒ Convention : D089B
 - ⇒ Collaborations : CNR du virus de l'hépatite A
 - ⇒ Objectifs : Etudier le mécanisme cellulaire impliqué dans le franchissement de la barrière intestinale par le VHA et développer des modèles *in vitro* pour mettre en évidence son infectiosité
 - ⇒ Valorisation : Communications orales (9, 11, 13 et 15)

2013 - 2016 Responsable du projet **HEPA Transmission** intitulé « *Franchissement de la barrière intestinale par le VHA* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaborations : CNR du virus de l'hépatite A (Villejuif); Unité EPVO (Institut Pasteur)
- ⇒ Objectifs : Etudier la première étape du cycle infectieux du VHA qui porte sur le franchissement de la barrière intestinale
- ⇒ Encadrement de stagiaires : Anaïs WEIBEL et Tiphany CHRUN (étudiantes en Master 2)
- ⇒ Valorisation : Mémoires de fin d'étude

2013 - 2019 Co-responsable du projet **VIRENTERIC 2** intitulé « *Détection des Virus Entériques* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaborations : CNR des virus des gastroentérites (anciennement CNR des Virus Entériques), CNR du virus de l'hépatite A
- ⇒ Objectifs : Développer / optimiser et caractériser des méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments
- ⇒ Valorisation : Articles scientifiques (5 et 9) ; Communication orale (12); Communications affichées (7 et 8)

2012 - 2015 Co-responsable du projet **Vir-Quant** intitulé « *Quantification absolue des génomes viraux* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaborations : PF-Identypath
- ⇒ Objectifs : Développer une méthode de quantification des génomes viraux (HEV) par digital RT-PCR et comparer avec la RT-qPCR conventionnelle
- ⇒ Valorisation : Article scientifique (6) ; Communications orales (8, 10, 17, 18 et 19) ; Communications affichées (5 et 6)

2011 - 2014 Participation au **projet de thèse VIROPUCE** intitulé « *Apport des biopuces au diagnostic des virus entériques transmissibles par voie alimentaire* »

- ⇒ Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Collaborations : CNR des virus entériques, CNR du virus de l'hépatite A, Plate-forme nationale Identypath du Laboratoire de Sécurité des Aliments (Anses)
- ⇒ Objectifs : i) Optimiser la méthode d'extraction du VHA à partir de végétaux ; (ii) Développer une méthode pour le typage moléculaire des souches du VHA par RT-qPCR; (iii) Développer une méthode « monoazide-RT-qPCR » pour la détection sélective des particules infectieuses du VHA et du rotavirus ; (iv) Evaluer l'apport de la digital RT-PCR pour la quantification absolue des génomes du VHA et des NoV issus de matrices alimentaires (eau, végétaux) ; et (v) Développer une « PCR on chip » pour la détection moléculaire simultanée de 21 virus entériques
- ⇒ Valorisation : Mémoire de thèse ; Articles scientifiques (8, 10, 11, 14 et 15) ; Communications orales (10, 11, 14 et 16)

2011-2012 Participation au **plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc au stade de la production**

- ⇒ Convention : A 297A
- ⇒ Collaborations : Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), Laboratoire de Santé Animale et Direction de l'évaluation des risques (Unité d'appui et études en microbiologie) (Anses, Maisons-Alfort)
- ⇒ Objectifs : Développer une méthode de détection du HEV par RT-qPCR dans les matrices carnées à risque et analyser 70 échantillons
- ⇒ Valorisation : Article scientifique (12) ; Communication orale (20) ; Communications affichées (9 et 13)

- 2006 - 2013** Co-responsable du projet **VIRENTERIC** intitulé « *Détection des Virus Entériques* »
- ⇒ Ressources propres du laboratoire
 - ⇒ Collaborations : CNR des virus entériques, CNR du virus de l'hépatite A
 - ⇒ Objectifs : Développer / optimiser et caractériser des méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments
 - ⇒ Valorisation : Articles scientifiques (13, 17 et 18) ; Communications affichées (12, 14 et 15)

ACTIVITE DE FORMATION PAR LA RECHERCHE

■ Participation à l'encadrement de doctorants

2018 Thèse soutenue le 18 décembre

Responsable du projet de thèse INFECT-VHA-ASSAY (Co-encadrante)

Doctorant : Samuel LEBOURGEOIS (Bourse Anses-AgroPariTech)

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Projet INFECT-VHA-ASSAY

Mémoire de thèse intitulé : « *Etude du cycle infectieux du virus de l'hépatite A et développement de modèles in vitro pour mettre en évidence son infectiosité* »

Université AgroParisTech, Ecole doctorale ABIES

2017 Thèse sur travaux soutenue le 4 octobre

Encadrement en tant que co-responsable du projet VIRENTERIC

Doctorant : Catherine HENNECHART-COLLETTE

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Mémoire de thèse intitulé : « *Détection des virus entériques dans les matrices alimentaires* »

Université Paris-Est, Ecole doctorale ABIES

2014 Thèse soutenue le 25 novembre

Doctorant : Coralie COUDRAY-MEUNIER

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Mémoire de thèse intitulé : « *Virus entériques transmissibles par voie alimentaire : détection, typage, pouvoir infectieux et nouvelles technologies* »

2008 Thèse soutenue le 18 juin

Doctorant : Arnaud AUTRET (Allocataire de recherche MENRT)

Lieu : Institut Pasteur, Unité de Biologie des Virus Entériques (Paris)

Mémoire de thèse intitulé : « *Étude des voies de signalisation pro- et anti-apoptotiques induites par le poliovirus dans les cellules neuronales humaines* »

Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole doctorale des Génomes aux organismes (2000-2015)

■ Responsable de l'encadrement d'étudiants

2019 Master 2 Biologie Santé (Parcours : Ingénierie Biologique et Applications Thérapeutiques)

UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims

Stagiaire : Corine HOFFER

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : « *Étude du caractère infectieux du virus de l'hépatite E dans des lignées hépatocytaires et entérocytaires* »

2018 & 2019

Licence Pro IPCS : Biotechnologie (*Contrat d'apprentissage d'un an*)

Université Paris Descartes

Stagiaire : Nathalie BARBOSA

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : *Evaluation du risque lié à la transmission du rotavirus par l'eau*

2017 & 2018

BTS biotechnologie 1^{ère} et 2^{ème} année (*deux fois 8 semaines*)

Lycée Galilée, Gennevilliers (92)

Stagiaire : Nathalie BARBOSA

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapports intitulés : *Développement d'une méthode de détection du rotavirus par impédancemétrie*

2017 L3 Biomolécules et Physiologie (7 semaines)

U.F.R Sciences du Vivant, Université Paris Diderot – Paris 7

Stagiaire : Sophie DESGRAUPES

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : *Franchissement de la barrière intestinale par le virus de l'hépatite A : développer un modèle d'étude permettant d'utiliser l'impédancemétrie pour caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans le passage du VHA*

2014 Master 2 IMVI (Mention Infectiologie: microbiologie, virologie, immunologie)

Spécialité **Microbiologie Appliquée et Génie Biologique**

U.F.R Sciences du Vivant, Université Paris Diderot – Paris 7

Stagiaire : Tiphany CHRUN

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : *Franchissement de la barrière intestinale par le virus de l'hépatite A : rôle du récepteur HAVcr1*

2013 Master 2 IMVI (Mention Infectiologie: microbiologie, virologie, immunologie)

Spécialité **Virologie moléculaire et médicale**

U.F.R Sciences du Vivant, Université Paris Diderot – Paris 7

Stagiaire : Anaïs WEIBEL

Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : *Franchissement de la barrière intestinale par le virus de l'hépatite A*

2009 Master 2 IMVI (Mention Infectiologie: microbiologie, virologie, immunologie)

Spécialité **Virologie moléculaire et médicale**

U.F.R Sciences du Vivant, Université Paris Diderot – Paris 7

Stagiaire : Nina GNADIG

Lieu : Institut Pasteur, Unité Epidémiologie et physiopathologie des Virus Oncogènes (Paris)

Rapport intitulé : *Transmission du rétrovirus HTLV-1 de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement*

▪ Participation à l'encadrement d'étudiants

2019 DUT Génie Biologique (Option Analyses Biologiques et Biochimiques) (8 semaines)

Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne

Stagiaire : Camille KEPA

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR 1161 Virologie (Maisons-Alfort)

Rapport intitulé : *Mise au point du système xCELLigence pour la recherche de molécules antivirales contre le virus West Nile*

- 2010 Master 2 IMVI** (Mention Infectiologie: microbiologie, virologie, immunologie)
 Spécialité **Microbiologie Appliquée et Génie Biologique**
 U.F.R Sciences du Vivant, Université Paris Diderot – Paris 7
 Stagiaire : Garance RIGAULT
 Lieu : Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)
 Rapport intitulé : *Contribution au développement d'un test multiparamétrique de biologie moléculaire permettant de détecter des virus entériques transmissibles par voie alimentaire*
- 2005 Master 2** « Interactions Hôtes-Agents Infectieux » ; Spécialité Virologie
 Université de Versailles - Saint-Quentin-En-Yvelines
 Stagiaire : Arnaud AUTRET
 Lieu : Institut Pasteur, Unité de Biologie des Virus Entériques (Paris)
 Rapport intitulé : *Caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le poliovirus dans les cellules de neuroblastome humain*
- 2003 Etudiante en Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales (1mois)**
 Faculté de Pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry
 Stagiaire : Agnès FRIBOURG
 Lieu : Unité INSERM 510, Faculté de Pharmacie (Châtenay-Malabry)
 Rapport intitulé : *Etude de l'altération du transporteur actif secondaire sodium-dépendant SGLT1 dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus.*
- 2002 Etudiante en DEA de Microbiologie**
 Option Ecologie Microbienne, Pathogénie des Micro-organismes et Agents anti-infectieux
 Université Paris XI, Châtenay-Malabry
 Stagiaire : Coralie RAYBAUT
 Lieu : Unité INSERM 510, Faculté de Pharmacie (Châtenay-Malabry)
 Rapport intitulé : *Etude du symporteur oligopeptide / proton PEPT-1 dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 infectées par le rotavirus.*

▪ Enseignement et actions de formation

Depuis 2014

- Cours (3 h) de virologie intitulé « *Virus transmis par voie alimentaire* » réalisé dans le cadre du Master 2 "Analyse des risques sanitaires liés à l'alimentation", Agroparistech.
- 2018** Cours (3 h) de virologie intitulé « *Virus transmis par voie alimentaire* » réalisé dans le cadre du Master 2 « Microbiologie et Génie-Biologique (MGB) », Université Paris Saclay (XI)
- 2015** Participation à la journée organisée par l'Association Régionale des Industries Alimentaires du Centre (ARIAC) dans le cadre de Club Qualité / Environnement (société MAINGOURD ; La Chapelle St Mesmin (près d'Orléans)). Communication orale : « *Virus transmissibles par voie alimentaire* ». (15 octobre)
- 2013** Intervention dans le cadre de la formation inter-entreprise « *Virus alimentaires : risques et moyens de prévention* » organisée par Aria Développement, Rennes France. Communication orale : « *Présentation des principaux virus présents sur les aliments : Etat des lieux réglementaire (CEN/DGSANCO)* » (8 octobre)
- 2012** Intervention dans le cadre d'une formation professionnelle « Filière, process et microbiologie ; filière produits de la mer » organisée par ALPA SERMHA, Lille (Institut Pasteur), France. Communication orale : « *Virus, eaux et aliments* ». (21 septembre)

2000-2003

MONITORAT, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI

Encadrement des TP de Bactériologie de 3^{ème} année de Pharmacie : 96 h / an

Initiation des étudiants aux bonnes pratiques de Bactériologie (isolement, caractérisation biochimique et immunologique, réalisation puis interprétation d'un antibiogramme)

AUTRES ACTIVITES

▪ Activités de référence

Participation aux investigations de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)

Recherche des virus entériques dans l'eau et les aliments suspectés être à l'origine de la TIAC
Validation et signature des rapports d'analyse

Participation au plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc au stade de la production (DGAL/SDSSA/N2010-8330)

Développement d'une méthode d'extraction et de détection du HEV dans les matrices carnées par RT-PCR quantitative
Caractérisation / Validation intra-laboratoire de la méthode de détection du HEV dans les matrices carnées (figatelles, saucisses de foie)
Analyse avec la méthode de RT-PCR quantitative développée de 70 échantillons répartis dans les 4 catégories ciblées par le PS-VHE (figatelli, saucisse de foie, foies de porcs salés et séchés, quenelles de foie)

▪ Activités d'expertise

Depuis 2018

Membre du comité d'experts spécialisé (CES) "Evaluation des risques biologiques liés aux aliments" (BIORISK)

2016 Participation au workshop scientifique organisé par l'EFSA et le FSA du Royaume-Uni sur les virus transmis par les aliments dont l'objectif était de définir les axes de recherche prioritaires dans ce champ thématique

Depuis 2010

Membre du groupe CEN/WG6/TC275/TAG4 « Détection of viruses in food »

Participation à la normalisation des méthodes de détection par RT-qPCR des NoVI, NoVII et VHA, dans l'eau et les aliments

Depuis 2014

⇒ **Evaluateur de revues internationales à comité de lecture (13 articles scientifiques)**

Food and Environmental Virology (Réf. FAEV-D-16-00066; FAEV-D-17-00051; FAEV-D-17-00031; FAEV-D-17-00080)

Food Microbiology (Réf. FM-2019-735)

Frontiers (Réf. 219345 (2016); 343186 (2018))

International Journal of Food Microbiology (Réf. FOOD-D-14-00262; FOOD_2018_247)

Journal of applied Microbiology (Réf. JAM-2015-056; JAM-2018-2351)

Journal of Virological Method (VIRMET_2017_164)

Letters in Applied Microbiology (LAM-2018-0934)

⇒ **Evaluateur du projet scientifique (APRest Anses 2017/1/104 VIRENA)**

▪ Autres

Depuis 2017

Membre du CA et CS de la Société Française de Virologie (SFV) (Trésorière)

Participation à l'organisation de son congrès annuel « Journées francophones de Virologie »

FORMATION

2017 Montage et coordination de projets de recherche Appel à projets

2016 Encadrement des doctorants

2011 Biostatistique Niveau 1 (logiciel StaGraphic)

2011 Formation initiale « Sauveteur Secouriste du Travail initial » (SST)

A partir de 2012 : Maintien - Actualisation des Compétences des SST

2010 - 2015 Anglais (Télélangue)

VALORISATION

▪ 30 publications scientifiques

- 1) Hennechart-Collette, C., A. Fraisse, L. Guillier, S. Perelle and S. Martin-Latil. **2019**. Evaluation of methods for elution of HEV particles in naturally contaminated sausage, figatellu and pig liver. *Food Microbiology*. 84:103235. doi: 10.1016/j.fm.2019.05.019.
- 2) Lebourgeois, S., A. Fraisse, C. Hennechart-Collette, L. Guillier, S. Perelle and S. Martin-Latil. **2018**. Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) method as a fast and accurate method for detecting infectious particles of hepatitis A virus. *Frontiers*. 8:335. doi: 10.3389/fcimb.2018.00335.
- 3) Fraisse, A., F. Niveau, C. Hennechart-Collette, C. Coudray-Meunier, S. Martin-Latil and S. Perelle. **2018**. Discrimination of infectious and heat-treated norovirus by combining platinum compounds and real-time RT-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 269:64-74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.015.
- 4) Fraisse, A., C. Coudray-Meunier, S. Martin-Latil, C. Hennechart-Collette, S. Delannoy, P. Fach and S. Perelle. **2017**. Digital RT-PCR method for hepatitis A virus and norovirus quantification in soft berries. *Int J Food Microbiol.* 243:36-45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.022.
- 5) Hennechart-Collette, C., S. Martin-Latil, A. Fraisse and S. Perelle. **2017**. Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products. *Food Microbiol.* 61:113-119. doi: 10.1016/j.fm.2016.09.001.
- 6) Martin-Latil, S., C. Hennechart-Collette, S. Delannoy, L. Guillier, P. Fach and S. Perelle. **2016**. Quantification of Hepatitis E Virus in Naturally-Contaminated Pig Liver Products. *Front Microbiol.* 7:1183. doi: 10.3389/fmicb.2016.01183.
- 7) Percher, F., P. Jeannin, S. Martin-Latil, A. Gessain, P.V. Afonso, A. Vidy-Roche and P.E. Ceccaldi. **2016**. Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses*. Feb 3;8(2). Review. doi: 10.3390/v8020040.
- 8) Coudray-Meunier, C., A. Fraisse, S. Martin-Latil, S. Delannoy, P. Fach and S. Perelle. **2016**. A novel high-throughput method for molecular detection of human pathogenic viruses using a nanofluidic real-time PCR system. *PLoS One*. 11(1). doi: 10.1371/journal.pone.0147832.
- 9) Hennechart-Collette, C., S. Martin-Latil, L. Guillier, and S. Perelle. **2015**. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *Int. J. Food Microbiol.* 202, 57-65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.029.
- 10) Coudray-Meunier, C., A. Fraisse, S. Martin-Latil, L. Guillier, S. Delannoy, P. Fach and S. Perelle. **2015**. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of hepatitis A virus and norovirus in lettuce and water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 201, 17-26. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.006.
- 11) Coudray-Meunier, C., A. Fraisse, C. Mokhtari, S. Martin-Latil, A.M. Roque-Afonso, S. Perelle. **2014**. Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays. *BMC Microbiology*. 14, 296. doi: 10.1186/s12866-014-0296-1.
- 12) Martin-Latil, S., C. Hennechart-Collette, L. Guillier, and S. Perelle. **2014**. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *Int. J. Food Microbiol.* 176, 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.016.
- 13) Hennechart-Collette, C., S. Martin-Latil, L. Guillier, and S. Perelle. **2014**. Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of Norovirus in water using murine norovirus as a process control. *J. Appl. Microbiol.* 116, 179-190. doi: 10.1111/jam.12345.
- 14) Coudray-Meunier, C., A. Fraisse, S. Martin-Latil, L. Guillier, and S. Perelle. **2013**. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiol.* 13, 216. doi: 10.1186/1471-2180-13-216.
- 15) Coudray, C., G. Merle, S. Martin-Latil, L. Guillier, and S. Perelle. **2013**. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *J. Virol. Methods*. 193: 96-102. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.05.003.
- 16) Desdouts M, Cassar O, Maisonobe T, Desrames A, Aouba A, Hermine O, Mikol J, Polivka M, Penisson-Besnier I, Marcorelles P, Zagnoli F, Papo T, Lacour A, Amoura Z, Haroche J, Cherin P, Teixeira A, Benveniste O, Herson S, Morin AS, Mortreux F, Wattel E, Huerre M, Cumont MC, Martin-Latil S, Butler-Browne G, Gout O, Taylor G, Gessain A, Ozden S, Ceccaldi PE. **2013**. HTLV-1-associated inflammatory

myopathies: low proviral load and moderate inflammation in 13 patients from West Indies and West Africa. *J Clin Virol.* 57: 70-76. doi: 10.1016/j.jcv.2012.12.016.

17) Martin-Latil, S., C. Hennechart-Collette, L. Guillier, and S. Perelle. **2012.** Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int. J. Food. Microbiol.* 157: 167-173. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.001.

18) Martin-Latil, S., C. Hennechart-Collette, L. Guillier, and S. Perelle. **2012.** Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food. Microbiol.* 31: 246-253. doi: 10.1016/j.fm.2012.03.007.

19) Martin-Latil S., Gnädig NF, Mallet A, Desdouts M, Guivel-Benhassine F, Jeannin P, Prevost MC, Schwartz O, Gessain A, Ozden S, Ceccaldi PE. **2012.** Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood.* 120: 572-580. doi: 10.1182/blood-2011-08-374637.

20) Blondel, B., A. Autret, C. Brisac, S. Martin-Latil, L. Mousson, I. Pelletier, J. Estaquier and F. Colbère-Garapin. **2009.** Apoptotic signaling cascades operating in poliovirus-infected cells. *Front Biosci.* (Landmark Ed). 14:2181-92. Review.

21) Blondel, B., A. Autret, C. Brisac, I. Pelletier, S. Martin-Latil, S. Jegouic, M. Bessaud, M.L. Joffret, J. Balanant, F. Colbère-Garapin and F. Delpoux. **2008.** Genetic evolution of poliovirus: success and difficulties in the eradication of paralytic poliomyelitis]. *Med Trop* (Mars). 2:189-202. Review. French.

22) Autret, A., S. Martin-Latil, C. Brisac, L. Mousson, F. Colbère-Garapin and B. Blondel. **2008.** Early phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation limits poliovirus-induced JNK-mediated cell death. *J Virol.* 7:3796-802. doi: 10.1128/JVI.02020-07.

23) Colbère-Garapin, F., S. Martin-Latil, B. Blondel, L. Mousson, I. Pelletier, A. Autret, A. François, V. Niborski, G. Grompone, G. Catonnet and A. van de Moer A. **2007.** Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes Infect.* 14-15:1623-31.

24) Autret, A., S. Martin-Latil, L. Mousson, A. Wirotius, F. Petit, D. Arnoult, F. Colbère-Garapin, J. Estaquier and B. Blondel. **2007.** Poliovirus induces Bax-dependent cell death mediated by c-Jun NH2-terminal kinase. *J Virol.* 14:7504-16.

25) Martin-Latil, S., L. Mousson, A. Autret, F. Colbère-Garapin and B. Blondel. **2007.** Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Virol.* 9:4457-64.

26) Labadie, K., A. Saulnier, S. Martin-Latil and F. Colbère-Garapin. **2007.** Reduced apoptosis in human intestinal cells cured of persistent poliovirus infection. *J Virol.* 6:3033-6.

27) Blondel, B., A. Autret, S. Martin-Latil, L. Mousson, I. Pelletier, T. Couderc and F. Colbère-Garapin. **2006.** Poliovirus et apoptose. *Virologie.* 10 : 7-20.

28) Martin-Latil, S., J. Cotte-Laffitte, I. Beau, A.M. Quéro, M. Géniteau-Legendre and A.L. Servin. **2004.** A cyclic AMP protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus impairs the expression and enzyme activity of brush border-associated sucrase-isomaltase in differentiated intestinal Caco-2 cells. *Cell Microbiol.* 8:719-31.

29) Lorrot, M., Martin S. and M. Vasseur. **2003.** Rotavirus infection stimulates the Cl⁻ reabsorption process across the intestinal brush-border membrane of young rabbits. *J. Virol.* 17:9305-11.

30) Martin, S., M. Lorrot, M.A. El Azher and M. Vasseur. **2002.** Ionic strength- and temperature-induced K(Ca) shifts in the uncoating reaction of rotavirus strains RF and SA11: correlation with membrane permeabilization. *J. Virol.* 2:552-9.

▪ 2 rapports

1) Martin-Latil, S., A. Fraisse, C. Hennechart-Collette, S. Perelle, AM. Roque-Afonso. Projet collaboratif DIM-MALINF 140075 : Etude du cycle infectieux du virus de l'hépatite A et développement de modèles de détection de l'infectiosité *in vitro*. Rapport intermédiaire concernant l'investissement xCELLigence (Ozyme). 15 Avril **2015**.

2) Martin-Latil, S., C. Hennechart-Collette, S. Perelle (Unité de Virologie des aliments et de l'eau, Anses Laboratoire de sécurité des aliments), N. Pavio, T. Merbah, M. Dumarest (UMR 1161 de Virologie INRA, ENVA, Anses Laboratoire de santé animale), A. Thébaud (Anses DER, AQREMSA). Rapport d'activité sur le plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc, au stade de la production - 2011. **2012**.

▪ **Communications orales à des congrès et conférences (*Orateur ; Invitation**)**

- 1) Lebourgeois S., Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. and Martin-Latil S. *Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) method as a fast and accurate method for detecting infectious particles of hepatitis A virus.* IAFP's European Symposium on Food Safety, Nantes (France), 24-26 avril **2019**.
- 2) Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. and Martin-Latil S. *A RTCA-Based Assay As an Innovative Approach for Thermal Inactivation Studies of Hepatitis A Virus.* IAFP's European Symposium on Food Safety, Nantes (France), 24-26 avril **2019**.
- 3) Hennechart-Collette C., Fraisse A., Perelle S. and Martin-Latil S. *Evaluation of methods for elution of HEV particles in naturally contaminated sausage, figatelli and pig liver.* IAFP's European Symposium on Food Safety, Nantes (France), 24-26 avril **2019**.
- 4) Lebourgeois S., Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. and Martin-Latil S. *Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) method as a fast and accurate method for detecting infectious particles of hepatitis A virus.* 6th International Society for Food & Environment Virology (ISFEV), Tempe (Arizona, Etats-Unis), 7-10 octobre **2018**.
- 5) Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. and Martin-Latil S. *A RTCA-Based Assay As an Innovative Approach for Thermal Inactivation Studies of Hepatitis A Virus.* 6th International Society For Food & Environment Virology (ISFEV), Tempe (Arizona, Etats-Unis), 7-10 octobre **2018**.
- 6) Fraisse A., Lebourgeois S., Hennechart-Collette C., Niveau F., Guillier L., Perelle S. et Martin-Latil S. *Détection du virus de l'hépatite A par impédancemétrie : applications en virologie alimentaire.* XX^{èmes} Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 22-23 mars **2018**.
- 7) Lebourgeois S., Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. and Martin-Latil S. *Développement d'une méthode de détection par impédancemétrie pour quantifier les particules infectieuses du virus de l'hépatite A (VHA).* Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, Maisons-Alfort (France), 25-26 octobre **2017**.
- 8) S. Martin-Latil*. *Quantification of HEV in food containing raw pork liver.* Meeting at Nestlé Research Center, Lausanne (Suisse), 14 septembre **2017**.
- 9) S. Martin-Latil*. *Détection des virus entériques dans les aliments et évaluation du risque infectieux.* Cycle de Séminaires : Laboratoire de Virologie Hôpital Paul Brousse, Centre National de Référence (CNR) du VHA, Villejuif (France), 1^{er} Mars **2017**.
- 10) Hennechart-Collette C., Martin-Latil S., Fraisse A and Perelle S. *Detection and quantification of hepatitis E virus in food matrices: From virus extraction until viral genome detection by RT-qPCR and digital RT-PCR.* 5th International Society for Food & Environment Virology (ISFEV), Kusatsu (Japon), 13-16 septembre **2016**.
- 11) S. Martin-Latil*. *Mise en évidence de l'infectiosité des virus entériques par impédance cellulaire.* Colloque « Virus – Aliments » organisé dans le cadre de l'UMT ACTIA VIROcontrol, Paris (France), 10 juin **2016**.
- 12) S. Martin-Latil*. *Detection and assessment of viral risk in food.* IAFP's European Symposium on Food Safety, Athènes (Grèce), 11-13 mai **2016**.
- 13) S. Martin-Latil*. *Mesure en temps réel de l'infectiosité virale : applications en virologie alimentaire.* Séminaire Département MIC du LSAI de l'Anses, Maisons-Alfort (France), 25 janvier **2016**.
- 14) S. Martin-Latil*. *High throughput qPCR as a new tool for detection of enteric viruses.* MEDVETNET 4th Annual Scientific Meeting, Maisons-Alfort (France), 7 octobre **2015**
- 15) S. Martin-Latil*. *Real-time and label-free monitoring of cellular events: applications in food virology.* xCELLigence user day à l'Institut Necker – Plateforme Imagine. Paris (France), 28 mai **2015**
- 16) S. Martin-Latil*. *qPCR on chips' and quantitative digital-PCR as a new tool for quantitative detection of enteric viruses in food.* Scientific symposium: « Next Generation PCR – Next Generation Sequencing », Berlin (Allemagne), 26-27 mars **2015**
- 17) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Delannoy S., Guillier L., Fach P. et Perelle S. **2015**. *Détection du VHE dans des produits à base de foie de porc par digital RT-PCR.* 11^e congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Paris (France), 23-25 mars **2015**.
- 18) S. Martin-Latil*. *Analyse quantitative virale des aliments : approche par plate-forme de PCR haut débit.* Participation à la journée d'échanges « Virus et Aliments » organisée par la DGAL, Maison du lait, Paris (France), 18 novembre **2014**

19) S. Martin-Latil*. *qPCR on chips' and quantitative digital-PCR as a new tool for quantitative detection of enteric viruses in food*. 24th International ICFMH conference - FOOD MICRO, Nantes (France), 1-4 Septembre **2014**

20) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L. et Perelle S. *Détection du VHE dans les matrices alimentaires à risque*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM), Lille (France), 7-8 Février **2013**

21) Martin-Latil S., Gnädig N., Mallet A., Prevost MC., Desdouits M., Schwartz O., Gessain A., Ozden S. and Ceccaldi PE. *Mother-to-child transmission of HTLV-1: In vitro study of HTLV-1 passage across a tight human epithelial barrier*. HERN (Human T-cell Leukemia Viruses European Research Network) Meeting, Lyon (France), 28-30 Mai **2010**

22) Martin-Latil S., Gnädig N., Mallet A., Prevost MC., Desdouits M., Gessain A., Ozden S. and Ceccaldi PE. *Mother-to-child transmission of HTLV-1: in vitro study of HTLV-1 passage across a tight human epithelial barrier*. Fifth Dominique Dormont International Conference (Host-Pathogen Interaction in Chronic Infections; Mother-to-child transmitted viral diseases: from transmission to children care), Paris (France), 26-28 Mars **2009**

23) Martin-Latil S., Mousson L., Autret A., Colbère-Garapin F. and Blondel B. *Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway*. Second European Rotavirus biology meeting, Stockholm (Suède), 3-6 juin **2007**

24) Martin-Latil S., Mousson L., Autret A., Colbère-Garapin F. et Blondel B. *Caractérisation des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'apoptose induite par le rotavirus dans les cellules MA104*. IXèmes Journées francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 26-27 Avril **2007**

25) Martin-Latil S., Mousson L., Autret A., Colbère-Garapin F. et Blondel B. *Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway*. Journées départementales de l'Institut Pasteur, Paris (France), Novembre **2006**

26) Martin-Latil S., Cotte-Laffitte J., Quéro A.M., Géniteau-Legendre M. and Servin A.L. *Mécanismes d'altération de la saccharase-isomaltase au cours de l'infection à Rotavirus*. Vèmes Journées francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 10-11 Avril **2003**

27) Martin-Latil S., Cotte-Laffitte J., Quéro A.M., Géniteau-Legendre M. and Servin A.L. *Altérations fonctionnelles induites dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 infectées par les Rotavirus*. XXIème réunion du CECED (Club d'études des cellules épithéliales digestives), Nantes (France), Janvier **2003**

28) Martin-Latil S., Cotte-Laffitte J., Quéro A.M., Géniteau-Legendre M. and Servin A.L. *Altérations de la lactase dans les cellules Caco-2 infectées par les Rotavirus*. **Rezorota**, Paris (France), Novembre **2002**

▪ **Communications affichées (Présentateur)**

1) Fraisse A., Niveau F., Hennechart-Collette C., Coudray-Meunier C., Martin-Latil S. and Perelle S. *Discrimination of Infectious and Heat-Treated Norovirus By Combining Platinum Compounds and Real-Time RT-PCR*. IAFP's European Symposium on Food Safety, Nantes (France), 24-26 avril **2019**

2) Fraisse A., Niveau F., Hennechart-Collette C., Martin-Latil S. et Perelle S. *Développement d'un traitement aux dérivés du platine couplé à une détection par RT-PCR en temps réel pour la discrimination entre les norovirus infectieux et les norovirus inactivés*. 13^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Paris (France), 9-11 octobre **2017**

3) Hennechart-Collette C., Fraisse A., Perelle S. et Martin-Latil S. *Comparaison de différentes méthodes d'éluion des particules virales de VHE dans des saucisses, des figatelles et des foies de porc naturellement contaminés*. XIXèmes Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 30-31 mars **2017**

4) Lebourgeois S., Fraisse A., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. et Martin-Latil S. *Mesure en temps réel de l'infectiosité du virus de l'hépatite A*. XVIIIèmes Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 24-25 mars **2016**

5) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Delannoy S., Guillier L., Fach P. et Perelle S. *Détection du virus de l'hépatite E dans des produits à base de foie de porc par digital RT-PCR*. Journées scientifiques des laboratoires de l'Anses, Maisons-Alfort (France), 5 octobre **2016**

- 6) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Delannoy S., Guillier L., Fach P. et Perelle S. *Détection quantitative du virus de l'hépatite E dans des produits à base de foie de porc par digital RT-PCR.* XVIIèmes Journées francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 9-10 avril **2015**
- 7) Hennechart Collette C., Martin-Latil S., Guillier L. et Perelle S. *Which virus may be used as process control for diagnosis of hepatitis A virus and norovirus in food and water?* IAFP's European Symposium on Food Safety, Budapest (Hongrie), 7-9 May **2014**
- 8) Hennechart Collette C., Martin-Latil S., Guillier L. et Perelle S. *Comparaison de deux virus utilisés comme contrôles de process pour la détection du virus de l'hépatite A et des Norovirus dans les aliments.* XVIèmes Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 6-7 mars **2014**
- 9) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L., Danan C., Santolini J., Bouteiller L., and Perelle S. *Development of a method for HEV detection in pig liver products: Application in a HEV French surveillance plan.* European Congress of Virology (ECV), Lyon (France), 11-14 septembre **2013**
- 10) Coudray C., Fraisse A., Martin-Latil S., Guillier L. and Perelle S. *Detection of infectious viral particles of the hepatitis A virus (HAV) by using a pre-treatment in combination with quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR).* European Congress of Virology (ECV), Lyon (France), 11-14 septembre **2013**
- 11) Coudray C., Fraisse A., Martin-Latil S. et Perelle S. *Détection des particules virales infectieuses du virus de l'hépatite A (VHA) par RT-qPCR.* Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'ANSES, Maisons-Alfort (France), 22 octobre **2012**
- 12) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L. and Perelle S. *Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR.* XVII Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC), Saint Raphaël (France), 3-7 juin **2012**
- 13) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C. et Perelle S. *Développement d'une méthode de détection du virus de l'hépatite E dans des matrices alimentaires à base de foie de porc.* XIVèmes Journées francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 29-30 mars **2012**
- 14) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L. and Perelle S. *Détection du virus de l'hépatite E dans l'eau et du norovirus murin utilisé comme contrôle de process par RT-PCR duplex.* XIIIèmes Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France) ; 28-29 Avril **2011**
- 15) Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L. and Perelle S. *Détection du virus de l'hépatite A dans des tomates semi-séchées et du norovirus murin utilisé comme contrôle de process par RT-PCR duplex.* XIIIèmes Journées Francophones de Virologie (JFV), Paris (France), 28-29 Avril **2011**
- 16) Martin-Latil S., Cotte-Laffitte J., Quéro A.M., Géniteau-Legendre M. and Servin A.L. *Rotavirus infection reduces lactase expression in human intestinal epithelial Caco-2 cells.* XIIth International Congress of Virology IUMS, Paris (France), 27 juillet-1^{er} Août **2002**
- 17) Martin-Latil S., Cotte-Laffitte J., Quéro A.M., Géniteau-Legendre M. and Servin A.L. *Altérations fonctionnelles induites dans les cellules intestinales humaines Caco-2 infectées par les Rotavirus.* Journées de l'Ecole Doctorale, Orsay (France), 22-23 Mai **2002**

PARTIE I : SYNTHÈSE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE

L'ensemble de mes travaux de recherche porte sur différents pathogènes viraux qui infectent l'Homme par voie digestive : les virus entériques qui se transmettent principalement par voie féco-orale responsables de pathologies intestinales (rotavirus, norovirus) et de pathologies extra-intestinales (poliovirus (PV), virus de l'hépatite A (VHA), virus de l'hépatite (HEV)) ; et le virus lymphotrope T humain de type 1 (HTLV-1) qui peut se transmettre de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel.

TRAVAUX DOCTORAUX ET POST-DOCTORAUX

Entre 1999 et 2004, j'ai réalisé mes travaux de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) puis de thèse au sein de l'unité INSERM 510 (dirigée par le Dr Alain Servin) à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry respectivement sous la direction du Dr Monique Vasseur et du Pr Anne-Marie Quero. Pour réaliser ces travaux j'ai bénéficié d'une allocation du ministère de la recherche technologique (allocation de thèse (MRT) pendant 3 ans et d'une bourse de fin de thèse de la Fondation pour la Recherche Médicale pour 6 mois supplémentaires.

Entre 2004 et 2009, j'ai réalisé mes travaux post-doctoraux à l'Institut Pasteur (Paris) au sein de l'unité de Biologie des Virus Entériques (dirigée par le Dr Florence Colbère-Garapin) (2005-2007) puis de l'unité d'Epidémiologie et de Physiopathologie des Virus Oncogènes (dirigée par le Pr Antoine Gessain) (2008-2009). Mes contrats post-doctoraux ont été respectivement financés dans le cadre d'un projet collaboratif avec le centre de recherche Daniel Carasso Danone Vitapole et du projet ANR GENHTLV.

Mes travaux doctoraux et postdoctoraux s'inscrivent dans le thème des interactions « hôte-pathogène ». Je me suis plus particulièrement intéressée aux conséquences physiopathologiques liées à l'infection des entérocytes et des cellules neuronales par le rotavirus et le poliovirus respectivement ; ainsi qu'aux mécanismes cellulaires impliqués dans le passage de HTLV-1 au travers de la muqueuse intestinale.

1. Interaction des rotavirus avec les cellules intestinales : conséquences physiopathologiques

Les rotavirus sont des virus non enveloppés à ARN double brin segmenté appartenant à la famille des *Reoviridae*. Ils sont l'agent étiologique majeur des gastroentérites sévères chez le jeune enfant, et ce, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Dans les pays en voie de développement, les rotavirus sont responsables d'environ 215 000 décès par an par déshydratation et dans les pays industrialisés le nombre élevé d'hospitalisations (~18 000 cas en France) pour gastroentérites en fait un véritable problème de santé publique (1, 2).

L'objectif de mes travaux était d'étudier (i) le mécanisme d'entrée du rotavirus dans sa cellule hôte (*DEA et thèse*), (ii) les mécanismes cellulaires impliqués dans la composante osmotique de la diarrhée à rotavirus (*thèse et post-doctorat 1*) et (iii) l'effet antiviral de bactéries probiotiques (*post-doctorat 1, projet collaboratif avec DANONE*).

1.1. Mécanisme d'entrée du rotavirus dans sa cellule hôte

Les rotavirus présentent un tropisme pour les entérocytes matures du sommet des villosités de l'intestin grêle. Les étapes initiales du cycle de réplication du rotavirus reposent sur la fixation de la particule virale sur ses récepteurs cellulaires et son entrée dans la cellule hôte. Un mécanisme d'entrée par voie directe a été initialement proposé dans la mesure où l'utilisation de drogues lysomotropes qui élèvent le pH intraendosomal et d'inhibiteurs du trafic endosomal intracellulaire (cytochalasine D) n'ont pas permis l'inhibition de la réplication du rotavirus (3, 4). Par la suite, l'équipe de Ruiz *et al.* a émis l'hypothèse que l'entrée du rotavirus s'effectue par endocytose selon un mécanisme calcium-dépendant (5, 6). Au cours de l'entrée, le rotavirus perd les protéines de la capsid externe (VP7 et VP4). Cette étape de décapsidation, indispensable pour la poursuite du cycle infectieux, s'effectue soit au niveau de la membrane plasmique lors d'une entrée par voie directe, soit dans l'endosome lors d'une entrée par endocytose.

Pour confirmer le mécanisme d'entrée du rotavirus, je me suis intéressée aux propriétés physico-chimiques qui permettent d'une part la décapsidation des particules à triple capsid (TLP) en particules à double capsid (DLP) transcriptionnellement actives et d'autre part la perméabilisation membranaire.

Les valeurs de la constante K_{Ca} (concentration calcique qui permet la décapsidation de 50 % des TLP) ont été déterminées pour la souche bovine RF et simienne SA11 à pH fixe en faisant varier la température et/ou la force ionique. Deux méthodes ont été utilisées pour différencier les TLP des DLP: la méthode classique en gel d'agarose permettant de séparer les deux types de particules et un analyseur de particules sub-microns ou « NanoSizer » qui permet de mesurer la taille des particules virales. En présence d'une force ionique élevée constante, la valeur de K_{Ca} augmente de 1 μ M à 20 μ M pour la souche RF et de 18 nM à 700 nM pour la souche SA11 lorsque la température augmente de 20°C à 37°C. Dans les conditions physiologiques (37°C), les souches RF et SA11 se décapsident lorsque les concentrations en calcium sont strictement inférieures à 25 μ M et à 800 nM respectivement. Sachant que la concentration du calcium dans la lumière intestinale est de 1 mM et que celle des entérocytes est de l'ordre de 100 nM, mes résultats montrent que seul le milieu intracellulaire est favorable à la décapsidation des souches RF et SA11.

La perméabilisation membranaire a été étudiée en mettant en contact les TLP (souche RF) avec les vésicules de membranes de bordure en brosse (BBM) chargées à la carboxylfluorescéine (CF) dans un tampon de force ionique élevée comprenant des concentrations en calcium variables (croissantes). Les résultats obtenus montrent que seules les conditions physico-chimiques qui favorisent la décapsidation des TLP en DLP sont celles qui permettent la libération de CF. A l'inverse, les conditions qui stabilisent le virion dans sa forme TLP inhibent ce processus.

L'ensemble de ces résultats indique que seul le milieu intracellulaire peut favoriser la décapsidation des souches de rotavirus (souche bovine RF et souche simienne SA11) et que les conditions physico-chimiques qui favorisent la décapsidation des TLP en DLP permettent également la perméabilisation membranaire. Le mécanisme d'entrée serait un système itératif impliquant un fort couplage entre la diminution de la concentration endosomale de calcium, la décapsidation du virion et la perméabilisation de la membrane endosomale qui permet la libération des DLP transcriptionnellement actives dans le cytoplasme (Figure 1). Mes travaux ont permis de renforcer l'hypothèse d'entrée du rotavirus par endocytose selon un mécanisme Ca^{2+} -dépendant.

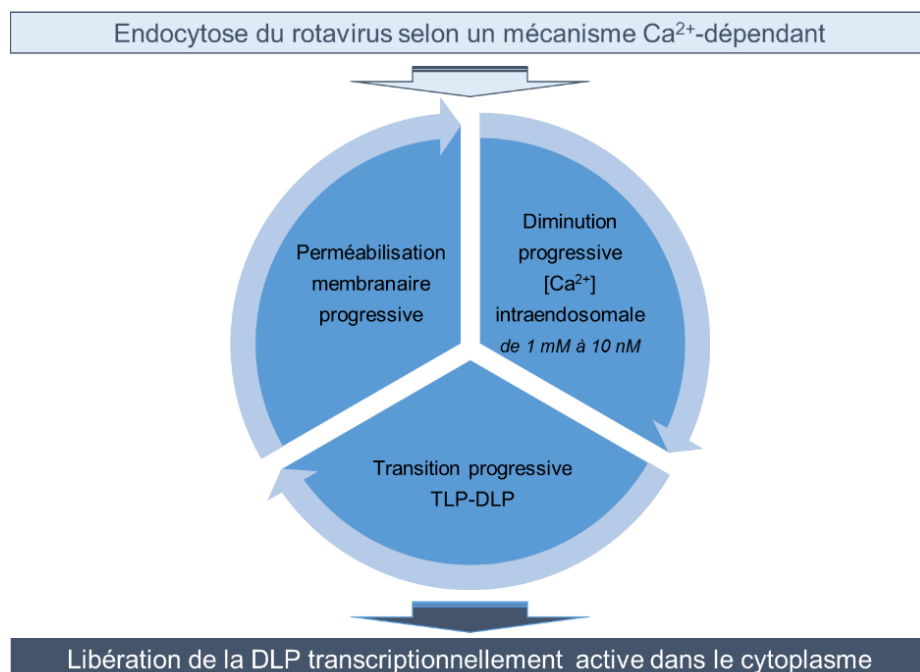


Figure 1. Entrée du rotavirus par endocytose selon un mécanisme Ca^{2+} -dépendant.

Système itératif impliquant un fort couplage entre la diminution de la concentration calcique intraendosomale, la décapsidation des particules virales à triple capsid (TLP) en particules à double capsid (DLP) et la perméabilisation de la membrane intraendosomale ce qui permet la libération des DLP transcriptionnellement actives dans le cytoplasme.

1.2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la composante osmotique de la diarrhée à rotavirus

L'infection des entérocytes matures des villosités de l'intestin grêle par le rotavirus peut conduire à des altérations fonctionnelles et/ou structurales à l'origine de la composante osmotique de la diarrhée à rotavirus (7). Les nutriments non hydrolysés et/ou non absorbés par les entérocytes persistent dans la lumière intestinale et la fermentation qui en résulte, seraient à l'origine d'une augmentation de la pression osmotique dans la lumière intestinale ayant pour conséquence une fuite hydrique et le déclenchement de la diarrhée.

Altérations des fonctions de digestion et d'absorption induites par le rotavirus

Il a été montré *in vivo*, chez l'Homme et dans de nombreux modèles animaux, que l'infection à rotavirus entraîne des altérations des fonctions de digestion et d'absorption des entérocytes de l'épithélium intestinal, et ce, indépendamment de la mort cellulaire par apoptose des cellules infectées. L'étude de biopsies duodénales d'enfants atteints de gastroentérites à rotavirus a permis de mettre en évidence la diminution de l'activité de la saccharase, la maltase et la lactase. Cependant, cette diminution n'est pas corrélée à la sévérité des altérations de la muqueuse intestinale (7). La diminution de l'activité du co-transporteur Na⁺-glucose SGLT1 a également été mise en évidence chez le lapin en l'absence de dommages histologiques apparents (8).

C'est pourquoi, je me suis intéressée aux conséquences de l'infection à rotavirus sur deux disaccharidases de la membrane en bordure en brosse, la saccharase-isomaltase (SI) et la lactase, ainsi que sur le transporteur SGLT1. Pour identifier les mécanismes cellulaires impliqués dans leurs altérations, j'ai utilisé les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2. Ces cellules ont la caractéristique de se différencier spontanément en entérocytes matures de l'intestin grêle lorsqu'elles arrivent à confluence mimant ainsi le processus de différenciation cryptovillitaire observé *in vivo*. Les enzymes de digestion et le transporteur SGLT1 sont exprimés à la membrane apicale des cellules Caco-2 différenciées.

Les travaux réalisés précédemment au laboratoire ont montré que le rotavirus induit dans les cellules Caco-2 une diminution de l'expression apicale de la **saccharase-isomaltase (SI)** suite à un blocage de son adressage à la membrane de bordure en brosse (BBM) et une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium responsable de l'altération du cytosquelette d'actine (9-11). Par la suite, j'ai montré que la réorganisation de l'actine et l'élévation de la concentration intracellulaire du calcium dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus ne sont pas à l'origine de l'altération de l'adressage de la SI. Il est connu que les cytokératines des filaments intermédiaires sont impliqués dans la formation et le maintien des microvillosités avec les microfilaments d'actine et dans l'adressage de protéines à la membrane apicale des entérocytes (12, 13). Sachant également que le rotavirus induit la phosphorylation des kératines 8 et 18 dans les cellules HT29 et que l'activation de la voie de signalisation AMPc-PKA-dépendante est impliquée dans la phosphorylation des cytokératines à l'origine de leur désorganisation, j'ai recherché si le rotavirus induisait l'activation de cette voie de signalisation (14-16). J'ai montré que le rotavirus induit une augmentation significative de l'AMPc ; et que l'activation d'une voie de signalisation AMPc-PKA-dépendante dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus est responsable d'une hyperphosphorylation de la cytokératine 18. Mes travaux démontrent également que l'altération de l'expression et de l'activité de la SI associée à la membrane apicale est due à l'activation de la voie AMPc-PKA-dépendante.

Ainsi, j'ai pu montrer pour la première fois qu'une voie de signalisation AMPc-PKA-dépendante, activée lors de l'infection à rotavirus, est impliquée dans la pathogenèse de la diarrhée à rotavirus. L'activation de cette voie pourrait être à l'origine de nombreuses autres modifications intervenant dans la physiopathologie de la diarrhée à rotavirus.

J'ai également pu mettre en évidence que le rotavirus induit dans les cellules Caco-2 une diminution de l'activité de la **lactase** exprimée dans les membranes de bordure en brosse, et ce, sans modification de son expression apicale. L'étude des paramètres cinétiques a montré que la vitesse maximale de la réaction enzymatique (V_m) est modifiée au cours de l'infection tandis que la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_m) ne l'est pas.

En étudiant l'activité de **SGLT1** dans les cellules Caco-2/TC7, j'ai pu mettre en évidence que le rotavirus induit précocement son activation, à l'origine d'une augmentation de l'absorption du glucose ; puis son inhibition à un stade plus tardif d'infection. La diminution de l'activité de SGLT1 dans les cellules infectées par le rotavirus est due à une diminution de sa capacité (V_m) sans modification de son affinité pour son substrat (K_m). Ces résultats sont en accord avec des études réalisées au laboratoire sur un modèle *ex vivo* de vésicules de BBM isolées à partir d'intestin de lapin (17).

En identifiant les mécanismes cellulaires à l'origine des altérations fonctionnelles induites par le rotavirus avant la mort cellulaire par apoptose, ces travaux ont permis une meilleure compréhension des cas où la diarrhée atteint son paroxysme avant toute lésion de la muqueuse intestinale.

Mort cellulaire par apoptose des cellules infectées par le rotavirus

La perturbation des fonctions de digestion et d'absorption des entérocytes peut également être la conséquence d'une infection lytique des entérocytes matures du sommet des villosités de l'intestin grêle (7). Il a été montré chez la souris que le rotavirus induit la mort par apoptose des entérocytes matures et accélère ainsi le renouvellement des cellules épithéliales dans l'intestin grêle (18). La migration des cellules des cryptes le long de l'axe crypte-villosité serait trop rapide pour assurer leur maturation complète et les villosités seraient repeuplées par des cellules immatures aux fonctions de digestion et d'absorption réduites (Figure 2). Ainsi, les lésions histologiques qui semblent apparaître plus tardivement seraient quant à elles impliquées dans la pérennité de la diarrhée.

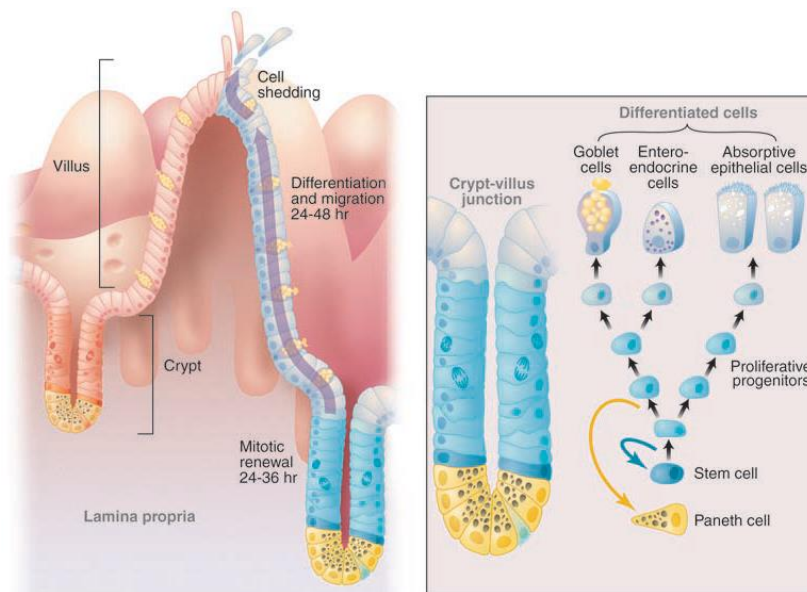


Figure 2. Structure de l'épithélium intestinal et différenciation crypto-villositaire des cellules épithéliales. Les cellules souches sont produites au niveau des cryptes et elles se différencient en entérocytes (*absorptive epithelial cells*), cellules caliciformes à mucus (*goblet cells*) et cellules entéro-endocrines (*Enteroendocrine cells*) au fur et à mesure qu'elles migrent vers le sommet des villosités. Les cellules qui migrent au fond des cryptes se différencient en cellules de Paneth. D'après (19).

J'ai mené un projet de recherche portant sur l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la mort par apoptose des cellules infectées par les rotavirus. Pour cette étude, j'ai utilisé la lignée de cellules épithéliales MA104 dans lequel le cycle du rotavirus a été bien caractérisé.

Dans un premier temps, j'ai montré que le rotavirus induit la mort cellulaire par apoptose selon un mécanisme caspase-dépendant et que la voie extrinsèque des récepteurs de mort (*via* Caspase 8) qui est activée au cours de l'infection des cellules par le rotavirus n'est pas à l'origine de l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale. En effet, l'inhibiteur des caspases (Z-Vad-fmk) a permis de diminuer le nombre de cellules infectées en apoptose, mais il n'a pas permis de bloquer la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol des cellules infectées.

J'ai donc par la suite étudié le rôle des protéines appartenant à la famille Bcl-2 (*B Cell Lymphoma-2*). Le rotavirus induit une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sans changement de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Ce résultat indique que la quantité de Bax libre augmente au cours de l'infection, ce qui pourrait faciliter son activation. Enfin, après avoir mis en évidence l'activation de Bax dans les cellules infectées par le rotavirus par immunoblot à l'aide d'un anticorps spécifique (Anticorps anti-Bax clone 6A7), j'ai montré que la suppression de son expression par une méthode d'ARN interférence réduit significativement la libération du cytochrome c dans les cellules infectées par le rotavirus. Ce résultat montre que l'activation de la voie apoptotique mitochondriale par le rotavirus est dépendante de la protéine proapoptotique Bax.

Ces travaux ont permis d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la mort cellulaire par apoptose qui intervient au stade tardif de l'infection des cellules par le rotavirus et qui contribue *in vivo* à la pérennité de la diarrhée à rotavirus.

L'ensemble de mes travaux a permis une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la diarrhée de type osmotique induite par le rotavirus (Figure 3).

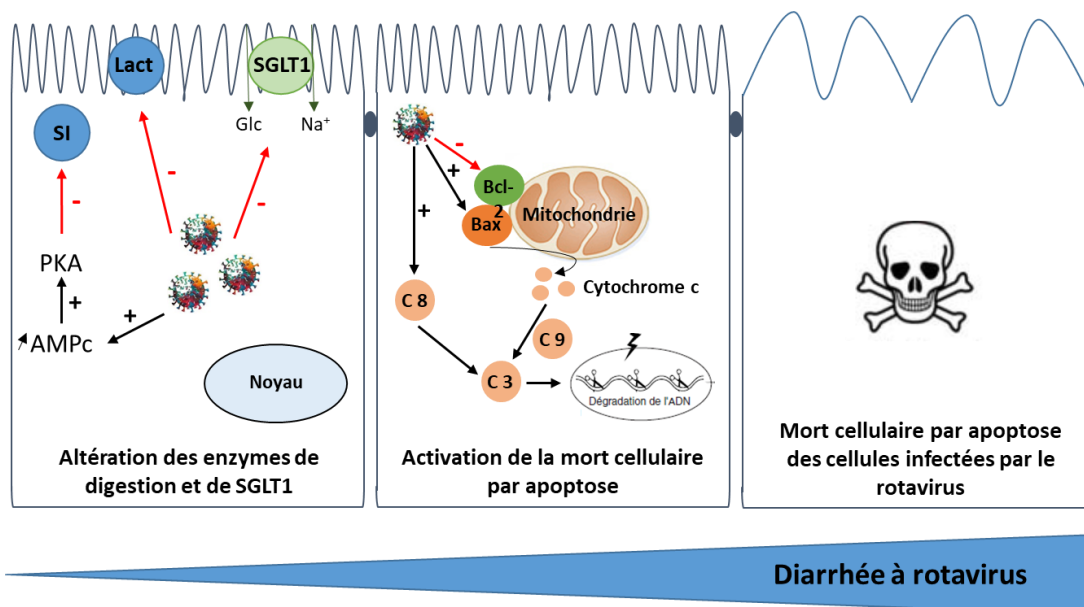


Figure 3. Altérations fonctionnelles induites par les rotavirus.

Mécanismes cellulaires impliqués dans les altérations des fonctions de digestion et d'absorption des entérocytes à l'origine de la diarrhée osmotique induite par le rotavirus.

1.3. Effet antiviral de bactéries probiotiques

Il a été décrit dans quelques études cliniques que les probiotiques peuvent écourter la durée de la diarrhée. La consommation de probiotiques pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé en prévenant les infections intestinales et/ou en restaurant plus rapidement l'homéostasie intestinale lors d'épisodes diarrhéiques (20, 21).

Pour identifier des bactéries probiotiques ayant un effet protecteur vis-à-vis des diarrhées à rotavirus, j'ai développé un modèle *in vitro* permettant de réaliser le criblage de différentes souches appartenant à la collection de DANONE.

Pour confirmer l'effet anti-rotavirus des probiotiques sélectionnés *in vitro*, nous avons mis au point un modèle *in vivo* murin. La charge virale retrouvée dans les selles de souris infectées et traitées avec le probiotique a été quantifiée par ELISA et RT-PCR quantitative et comparée à celle obtenue dans les selles de souris infectées non traitées. L'effet antiviral de certaines bactéries probiotiques a pu être confirmé sur ce modèle murin.

Si les résultats obtenus sont restés confidentiels, le modèle *in vitro* a pu être transféré à un prestataire de service pour réaliser un screening à plus grande échelle et les deux modèles d'étude ont permis d'isoler de nouvelles souches de bactéries probiotiques ayant un effet anti-rotavirus.

Projet doctoral	Travaux publiés dans <i>Journal of Virology</i> (30) et dans <i>Cellular Microbiology</i> (28)
Projet post-doctoral	Travaux publiés dans <i>Journal of Virology</i> (25)
Projet collaboratif avec DANONE	Revue publiée dans <i>Microbes and Infection</i> (23)

2. Interaction du poliovirus avec les cellules neuronales : conséquences fonctionnelles

Le poliovirus, agent étiologique de la poliomyélite paralytique aiguë, pénètre dans l'organisme par voie digestive mais ses cellules cibles privilégiées sont les neurones moteurs localisés dans le Système Nerveux Central (SNC), et plus particulièrement dans les cornes ventrales des régions cervicales et lombaires de la moelle épinière. La mort des neurones moteurs infectés par un processus apoptotique est responsable des paralysies flasques des membres correspondants et conduit à l'atrophie des muscles concernés (22).

Dans le cadre de la thèse d'Arnaud Autret, nous avons étudié les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose induite par le poliovirus (PV) dans les cellules neuronales humaines IMR5. Nous avons montré que l'activation de la voie apoptotique mitochondriale Bax-dépendante induite par le PV dans les cellules neuronales humaines IMR5 est médiée par l'activation de la voie de signalisation proapoptotique JNK (c-jun NH2-terminal kinase). Cette dernière est activée au stade précoce de l'infection des cellules IMR5 par le PV ; tandis que la mort des cellules par apoptose intervient à un stade plus tardif. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existe une balance entre des voies de signalisation pro et anti-apoptotiques. Par la suite, nous avons donc recherché si le PV induit également l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) connue pour son implication dans la survie cellulaire. Nos résultats montrent que le PV active la voie de signalisation PI3K/Akt suite à sa fixation sur son récepteur. Cette voie de signalisation cellulaire limite l'amplitude de l'activation des JNK et elle est par conséquent responsable du retard de l'apoptose des cellules IMR5 infectées par le PV (Figure 4).

Cette étude a permis de mettre en évidence un équilibre entre les facteurs viraux pro et anti-apoptotiques et les facteurs de l'hôte qui pourraient jouer un rôle déterminant dans la pathogenèse de la poliomyélite.

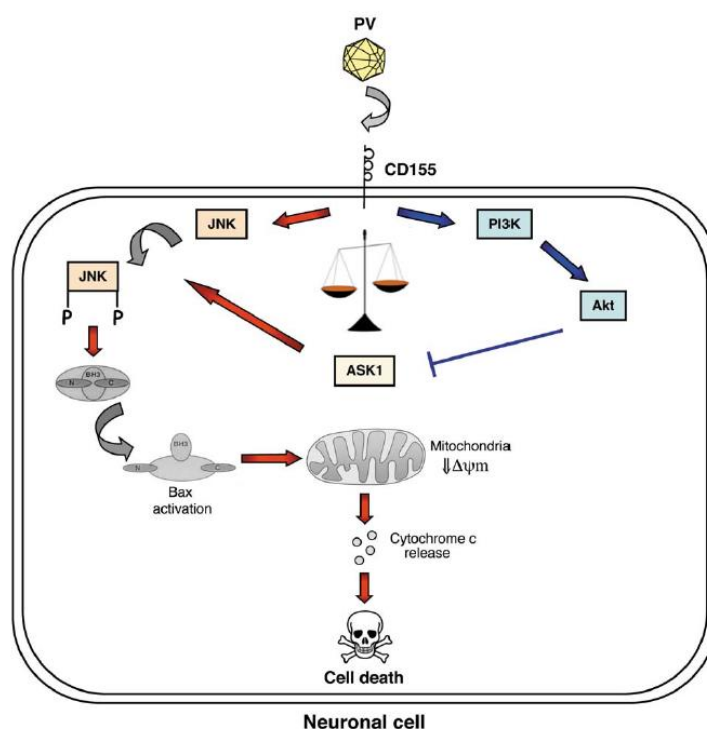


Figure 4. Mort cellulaire par apoptose induite par le poliovirus.

Induction des voies de signalisation pro- (en rouge) et anti- (en bleu) apoptotiques dans les cellules de neuroblastome infectées par le PV.

Participation à un projet de thèse	Travaux publiés dans <i>Journal of Virology</i> (22 et 24), revue dans <i>Virologie</i> (27), revue dans <i>Frontiers in Bioscience</i> (20)
---	--

3. Franchissement de la barrière intestinale par HTLV-1

Le rétrovirus humain oncogène HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATL) et de la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie (TSP/HAM). Parmi les 10-20 millions d'individus infectés (Japon, Caraïbes, Amérique centrale, Afrique sub-saharienne, Asie du Sud-Est et Océanie), environ 5 % développent une ATL et 1% une TSP/HAM après une longue latence clinique. Le principal mode de transmission de HTLV-1 est l'allaitement maternel *via* les lymphocytes infectés contenus dans le lait (23).

Pour étudier le mécanisme cellulaire impliqué dans le franchissement de la barrière digestive par HTLV-1, j'ai développé un modèle *in vitro* de barrière intestinale en cultivant les cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2) sur des filtres Transwell. Une fois différenciées, les cellules Caco-2 forment une monocouche « étanche » de cellules polarisées mimant ainsi la séparation entre la lumière intestinale (compartiment apical) et le milieu séreux (compartiment basolatéral). Sachant que la transmission de HTLV-1 s'effectue par contact cellule-cellule, j'ai établi un modèle de co-culture en ajoutant au pôle apical des cellules Caco-2 des lymphocytes infectés ou non par HTLV-1.

Mes résultats montrent que le virus HTLV-1 est capable de franchir la barrière intestinale par transcytose, et ce, sans modification de la perméabilité paracellulaire (*i.e.* absence de passage de lymphocytes et du Dextran-FITC (4 kDa) et absence de diminution de la résistance transépithéliale). En effet, après addition des lymphocytes infectés au pôle apical des cellules Caco-2, des particules virales ont pu être visualisées par microscopie électronique à transmission dans les cellules Caco-2 et la présence de HTLV-1 a été mise en évidence dans le compartiment basolatéral par ELISA. L'infectiosité des particules virales retrouvées au pôle basolatéral a été montrée sur des cellules 293T transfectées avec un plasmide codant la GFP sous contrôle du promoteur viral LTR (long Terminal Repeat). De plus, j'ai pu montrer à l'aide d'un modèle de tri-culture que des cellules dendritiques localisées à la membrane basale des cellules Caco-2 peuvent être infectées par HTLV-1.

Ce modèle d'étude a permis d'apporter des éléments sur le mode de passage utilisé par HTLV-1 pour franchir la barrière intestinale au cours de l'allaitement, mais il a également permis d'identifier les cellules cibles (lymphocytes/cellules dendritiques) infectées après le franchissement de la barrière intestinale, et ce, dans un environnement pertinent par rapport aux conditions *in vivo*. Ainsi, au cours de l'allaitement maternel, HTLV-1 pourrait franchir la barrière intestinale pour aller infecter les cellules du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT) (Figure 5).

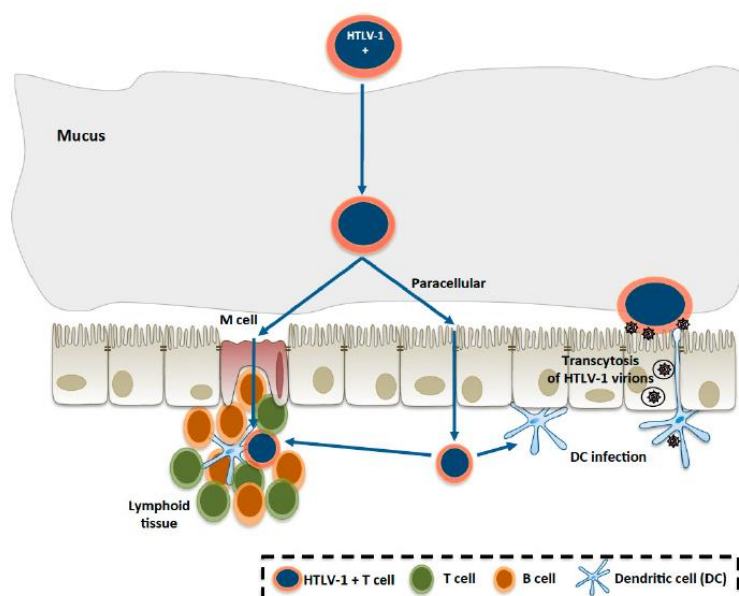


Figure 5. Franchissement de la barrière intestinale par HTLV-1.

Mécanisme de transcytose des cellules M et/ou des entérocytes ; Passage paracellulaire sans altération de l'épithélium intestinal.

Projet post-doctoral réalisé dans le cadre du projet **ANR GENHTLV**
« Identification des gènes de prédisposition à l'infection par HTLV-1
dans l'enfance »

Travaux publiés dans *Blood*
(19), revue dans *Viruses* (7)

TRAVAUX REALISES A L'ANSES

Depuis 2009, j'ai réalisé mes travaux de recherche au sein de l'unité des Virus Entériques (dirigée par le Dr Sylvie Perelle) du Laboratoire de Sécurité des Aliments (site de Maisons-Alfort) de l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

Recrutée en tant que chargée de projets scientifiques, je me suis tout d'abord investie dans les travaux de recherche de l'unité portant sur le développement et l'optimisation de méthodes de détection des virus entériques dans les aliments et l'eau. Forte de mes expériences doctorales et post-doctorales en virologie et biologie cellulaire, j'ai par la suite développé au sein de l'unité VE de nouvelles thématiques scientifiques ayant pour objectif de mieux appréhender l'évaluation du risque viral infectieux dans le domaine alimentaire. Depuis janvier 2019, je suis chef de projets scientifiques au sein de cette unité et je continue d'assurer la coordination de l'ensemble des projets et l'animation scientifique avec ma chef d'unité Sylvie Perelle.

Mes travaux visent à améliorer la **sécurité alimentaire** vis-à-vis du risque viral. Ils s'articulent autour de deux axes de recherche : le développement de méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments et l'étude du cycle viral infectieux pour contribuer à l'évaluation du risque viral.

1. Développement de méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments

En santé publique, les toxi-infections alimentaires d'origine virale sont reconnues comme une cause principale de pathologie chez l'Homme. Les données publiées annuellement par Santé Publique France (SPF ; anciennement InVS) montrent que la part des virus impliqués dans les Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) a augmenté de 1.8% à 18.1% entre 2006 et 2010. Depuis 2011, un agent étiologique viral a pu être confirmé dans 9 à 18% des foyers de TIAC (*InVS, SPF, 2003 à 2016*) (Figure 6). En Europe, le pourcentage de TIAC attribuées à un agent étiologique viral varie également de 10 à 20% entre 2010 et 2015 (EFSA). Durant la même période aux **Etats Unis**, les virus sont impliqués dans 35 à 40% des épidémies d'origine alimentaire (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)).

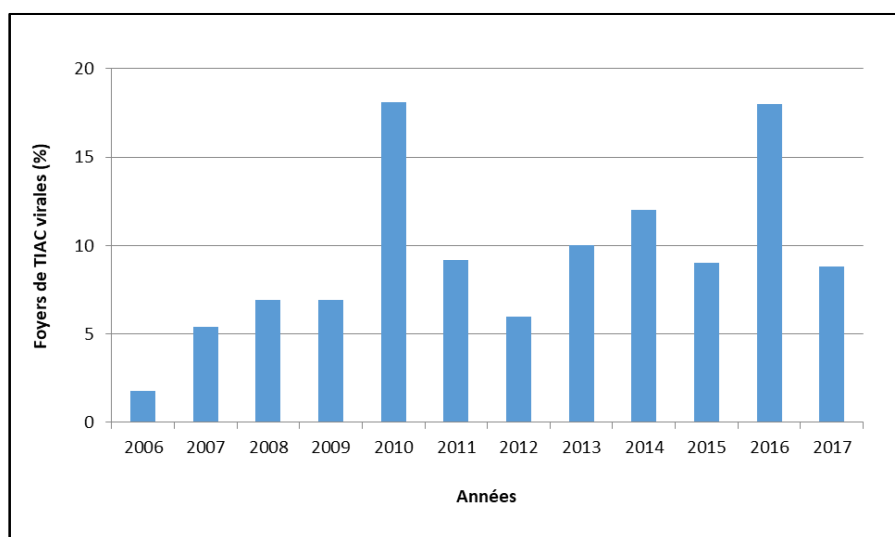


Figure 6 : Pourcentages des foyers de TIAC ayant pour origine un agent viral entre 2006 et 2017. D'après Santé Publique France.

A l'heure actuelle, les deux agents étiologiques majeurs impliqués dans les TIAC d'origine virale sont le **norovirus humain (hNoV)** (génogroupe I et II), responsable de gastroentérites ; et le **virus de l'hépatite A (VHA)**, responsable d'hépatites aiguës. Ils sont transmis par la **voie féco-orale directe par contacts inter-humains** ou **indirecte** via l'ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés par des matières fécales. La **contamination des aliments** par les virus entériques peut survenir à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, depuis leur culture (eau environnementale, eau d'irrigation) jusqu'à leur préparation (contamination manuportée ou via des surfaces contaminées), ce qui représente un réel risque pour la santé des consommateurs (24, 25).

Etant donné la difficulté à cultiver *in vitro* ces virus et le faible niveau de contamination des aliments, l'essor de la biologie moléculaire, et plus particulièrement l'apport de la RT-PCR en temps réel, a permis le développement des méthodes de détection des virus dans les aliments. **L'acquisition de méthodes performantes pour la détection des virus entériques dans l'eau et les aliments** est cruciale non seulement pour rechercher l'agent étiologique viral suspecté d'être impliqué dans une TIAC, mais également pour réaliser la surveillance des virus entériques dans les aliments afin d'assurer la sécurité des consommateurs.

1.1. Développement et optimisation des méthodes de détection des norovirus humains (hNoV) et du VHA dans l'eau et les aliments

Devant la prise de conscience du risque viral dans les maladies transmises par l'alimentation, un **groupe de travail européen de standardisation CEN/TC275/WG6/TAG4** a été mandaté et créé en 2004 par la Commission européenne pour établir des méthodes de référence normalisées et validées dans le cadre de la législation européenne dans le domaine de l'hygiène alimentaire. Les norovirus humains de génogroupe I et II (hNoV GI et GII) et le virus de l'hépatite A (VHA) dans l'eau embouteillée, les mollusques bivalves, les légumes frais et les fruits rouges ont été désignés comme étant les couples « virus-matrices » les plus importants et devant être considérés en priorité. **La norme NF EN ISO 15216-1 publiée en 2017** (26) décrit l'ensemble du processus analytique, depuis l'extraction des hNoV et du VHA à partir des matrices ciblées jusqu'à la quantification des génomes viraux par RT-qPCR, ainsi que les différents contrôles indispensables pour réaliser la recherche des virus dans les matrices alimentaires et valider l'analyse. Un **témoin négatif d'extraction** permet de vérifier l'absence de contamination au cours du processus analytique. Un **virus « contrôle de processus »** possédant les mêmes caractéristiques que le virus pathogène recherché mais non pathogène pour l'homme est ajouté à chacun des échantillons à analyser pour mesurer l'efficacité de l'extraction. Un **contrôle externe d'amplification (EAC)** qui peut être un ARN ou un ADN de même séquence que celle amplifiée pour le virus recherché permet de mesurer l'inhibition des réactions d'amplification de RT-qPCR. L'efficacité d'amplification est calculée en tenant compte des résultats de l'amplification de l'EAC seul et de l'EAC en présence de l'ARN extrait de la matrice alimentaire. La validation du résultat final dépendra de l'efficacité d'extraction du contrôle de processus qui doit être $>1\%$ et du pourcentage d'inhibition des réactions de RT-qPCR qui doit être $<75\%$ (Figure 7).

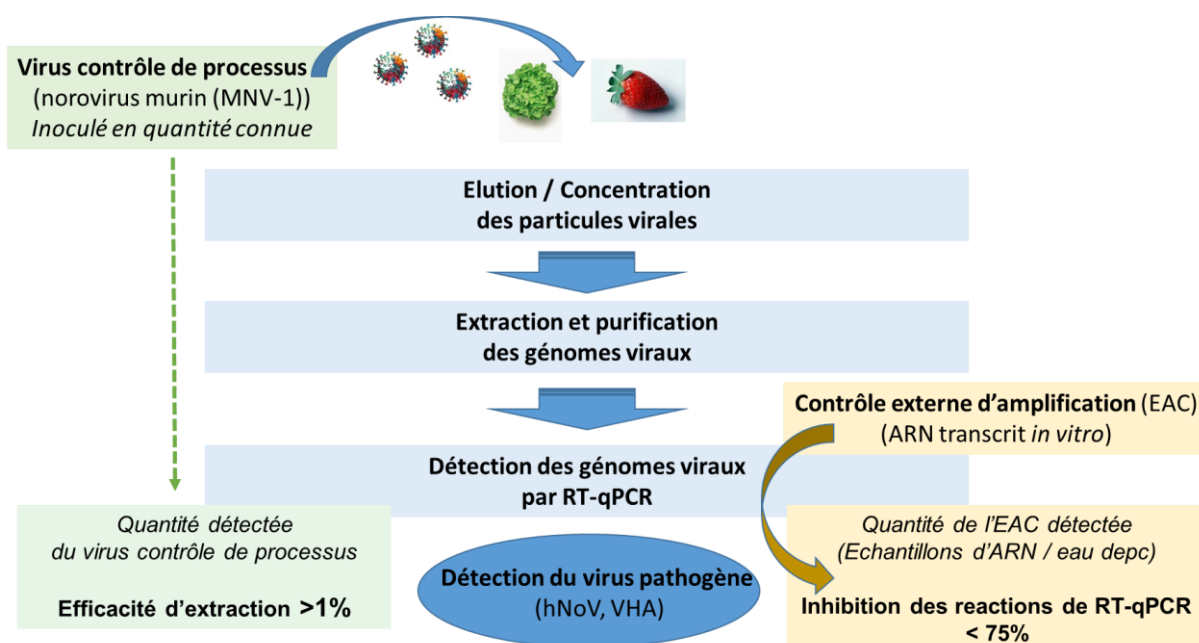


Figure 7 : Processus analytique pour la détection des hNoV et du VHA dans l'eau et les aliments. Recommandations décrites dans la norme NF EN ISO 15216-1 : validation des résultats si l'efficacité d'extraction du contrôle de processus est supérieure à 1% et si l'inhibition du contrôle externe d'amplification est inférieure à 75%.

La réalisation de mes travaux dans ce contexte de normalisation m'a permis d'apporter mon expertise sur les méthodes de détection des hNoV et du VHA dans les végétaux et les fruits rouges et de participer aux discussions portant notamment sur les critères de validation des contrôles.

Lors des investigations de TIAC que l'unité VE doit mener, la recherche des hNoV ou du VHA est le plus souvent demandée pour des **matrices alimentaires qui n'ont pas été décrites dans la norme NF EN ISO 15216-1** tels que des produits importés ou des plats préparés (salades composées, yaourt avec fruits...).

Nous avons donc entrepris des travaux portant sur le développement, l'optimisation et la validation des méthodes d'analyse pour la détection des NoV et du VHA dans les matrices ciblées par la norme ISO (hors coquillages), mais également dans des matrices beaucoup plus diverses. Les avancées technologiques en biologie moléculaire ont également permis d'ouvrir la voie vers de nouvelles méthodes de détection, quantification et typage des virus entériques applicables dans le domaine alimentaire. Ainsi, les axes d'amélioration peuvent porter sur l'une des 3 étapes du processus analytique : l'élution/concentration des particules virales provenant des matrices, l'extraction des acides nucléiques et la détection des génomes viraux par RT-qPCR.

Optimisation portant sur l'étape d'extraction des virus à partir des aliments

Nous avons développé une méthode alternative pour la détection du VHA sur les végétaux. Cette méthode a été comparée à la méthode ISO décrite pour l'analyse des laitues. La différence entre ces deux méthodes porte sur l'étape de concentration des particules virales qui est réalisée par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) pour la méthode ISO, et par filtration pour la méthode alternative. Après contaminations artificielles des laitues avec des quantités connues de VHA (souche adaptée HM175/18f), nos résultats montrent que les 2 méthodes présentent une efficacité d'extraction virale similaire (*i.e.* entre 0.67 et 6,29% pour la filtration et entre 0.07 et 8.76% pour la méthode ISO).

Dans le cadre de l'épidémie d'hépatite A liée à la consommation de tomates semi-séchées congelées provenant de Turquie (2009-2010) (27), notre unité a reçu de nombreux échantillons pour rechercher la présence du VHA. **Les tomates semi-séchées** étant considérées comme une nouvelle matrice impliquée dans la transmission du VHA par voie alimentaire, **j'ai entrepris des travaux pour évaluer l'efficacité de la méthode ISO décrite pour les fruits rouges et développé une méthode alternative pour la détection du VHA dans cette nouvelle matrice à risque.** L'étape de concentration des virus est réalisée par ultracentrifugation dans la méthode alternative, tandis que la méthode ISO utilise le PEG. Mes résultats montrent que les deux méthodes présentent une bonne efficacité d'extraction du VHA à partir de tomates semi-séchées artificiellement contaminées (*i.e.* jusqu'à 51% pour les 2 méthodes).

Notre unité est également régulièrement sollicitée pour rechercher la présence des hNoV dans des produits laitiers associés à des fruits rouges. La part des produits laitiers incriminés représente 4% des TIAC d'origine virale en France (INVS, 2014). Nous avons développé une méthode **d'extraction des NoV à partir de deux types de produits laitiers, le lait et le fromage blanc.** Cette méthode, basée sur l'utilisation du tampon d'élution Tris Glycine Extrait de Bœuf (TGEB) supplémenté en protéinase K, a permis d'obtenir des efficacités d'extraction des NoV GI et GII comprises entre 57 et 76% pour les deux matrices testées. La méthode développée est plus sensible pour la détection des NoV GII ($7,00 \times 10^3$ copies génomes / 2,5 g) que des NoV GI ($7,39 \times 10^5$ copies génomes / 2,5 g) dans les deux types de matrices.

Nos travaux ont permis de développer de nouvelles méthodes d'extraction virale pour des matrices alimentaires à risque non ciblées par la norme ISO. Ils montrent également que l'efficacité d'extraction des virus est fonction de la matrice alimentaire et de la méthode d'extraction utilisée (Figure 8). Ces méthodes ayant de très bonnes performances en termes d'efficacité d'extraction virale ont pu être utilisées au laboratoire dans le cadre d'investigations de TIAC pour la recherche de virus.

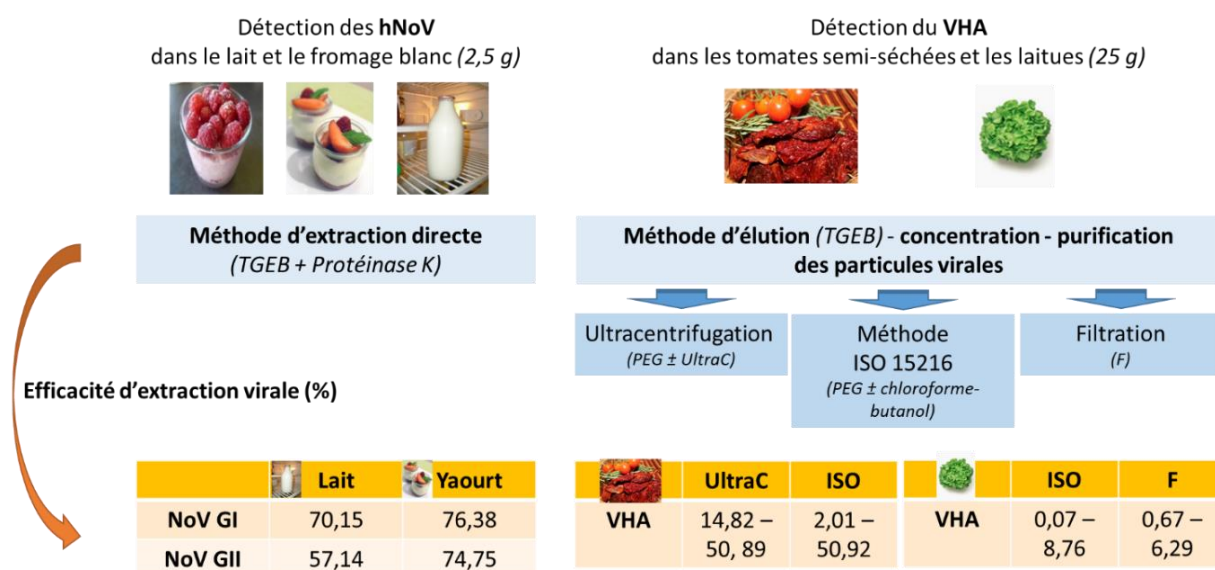


Figure 8. Efficacités d'extraction des virus entériques à partir des aliments.

Comparaison des efficacités d'extraction virale en fonction de la matrice alimentaire et de la méthode d'analyse utilisée.

Utilisation du contrôle de processus pour valider l'efficacité d'extraction

L'ajout du contrôle de processus à chaque échantillon à analyser est indispensable pour vérifier l'efficacité du processus analytique. Le choix du virus à utiliser comme contrôle de processus a fait l'objet de nombreuses discussions dans le groupe CEN.

Pour identifier le contrôle de processus le plus adapté entre le mengovirus (souche vMC0 ; (28)) et le MNV pour la réalisation des analyses en virologie alimentaire, j'ai entrepris une étude avec trois matrices alimentaires (eau embouteillée, laitue et tomate séchée), chacune analysée avec une méthode différente. La quantité de contrôle de processus à ajouter aux échantillons a été déterminée pour qu'il puisse être détecté de façon reproductible sur les trois matrices alimentaires (*i.e.* 10^9 copies génomes pour MNV et 10^8 copies génomes pour mengovirus). Les rendements d'extraction des virus pathogènes (VHA, NoV GI et NoV GII) ont été déterminés pour chaque matrice en l'absence et en présence du MNV ou du mengovirus. En réalisant une analyse statistique (ANOVA à deux facteurs), j'ai pu montrer que l'ajout du contrôle de processus n'altère pas l'efficacité d'extraction des virus pathogènes ($p = 0,7457$ pour VHA ; $p = 0,3103$ pour hNoV GI et $p = 0,6173$ pour hNoV GII) et que l'efficacité d'extraction des virus pathogènes varie en fonction des matrices alimentaires ($p < 10^{-4}$) (*i.e.* eau embouteillée (38-63%) > tomates séchées (2-65%) > salades (1.5-18.2%)) et du virus recherché pour une même matrice.

Par la suite, les rendements d'extraction obtenus pour chaque virus pathogène ont été comparés à ceux obtenus pour le mengovirus et le MNV (Figure 9). Nos résultats statistiques montrent que seul le MNV a une efficacité d'extraction similaire à celle du VHA pour les trois matrices alimentaires testées. Sachant que la recherche conjointe de NoV GI et GII est demandée dans le cadre d'une investigation de TIAC, et qu'il est préférable que l'efficacité d'extraction soit plus élevée pour les virus pathogènes, le MNV est le plus adapté pour la détection des hNoV dans les laitues et les tomates ; et le mengovirus dans l'eau embouteillée.

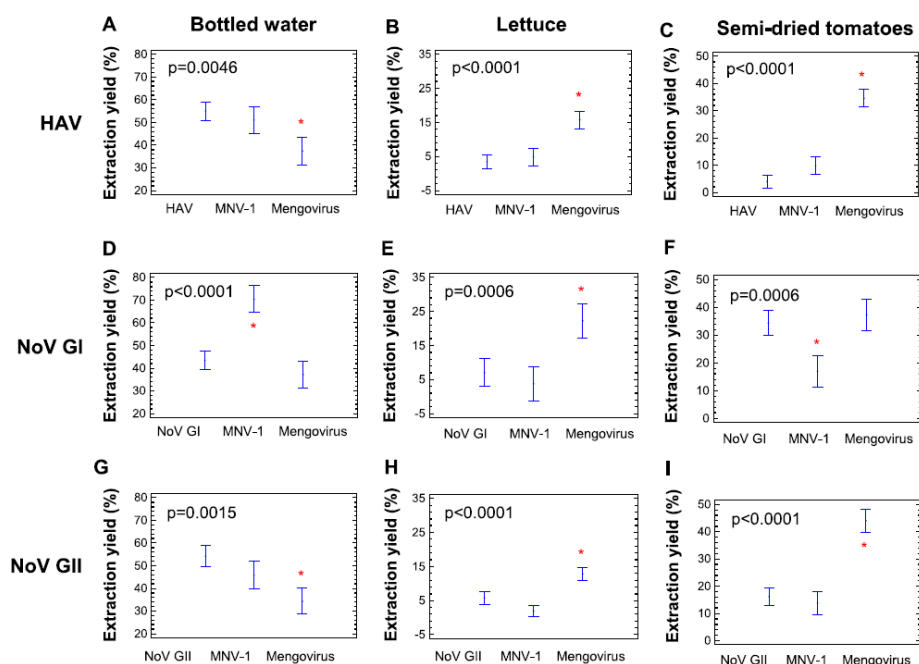


Figure 9. Rendements d'extraction des virus pathogènes et contrôles de processus.

Test de comparaison multiple des rendements d'extraction obtenus pour chaque virus pathogène (HAV, NoV GI ou NoV GII) avec ceux obtenus pour MNV-1 et mengovirus en fonction de la matrice alimentaire.

Comme l'analyse de variance (ANOVA) a montré une différence significative entre les rendements d'extraction obtenus ($p < 0.05$), un test de comparaison multiple a été réalisé (Fisher's least-significant-differences (LSD) test) avec le logiciel Stagraphics pour identifier quel contrôle de processus a des rendements d'extraction significativement différents de ceux obtenus pour le virus pathogène. Les intervalles de confiance des moyennes sont représentés : si deux intervalles ne se chevauchent pas, la différence entre les écarts types correspondants est statistiquement significative (*).

Cette étude a permis de valider l'utilisation du MNV en tant que contrôle de processus lors des investigations de TIAC que l'unité VE doit mener et d'appuyer la position d'ouverture quant au choix du contrôle de processus au cours des réunions du groupe CEN.

Evaluation d'une étape supplémentaire de purification des acides nucléiques

L'étape d'extraction des acides nucléiques est essentielle dans la mesure où de nombreuses molécules inhibitrices des réactions de RT-PCR (e.g. polysaccharides, lipides, protéines...) peuvent provenir des aliments analysés.

La dilution des extraits d'ARN provenant d'aliments permet de diminuer la quantité d'inhibiteurs interférant avec les réactions d'amplification génique et par conséquent de détecter un plus grand nombre de génomes viraux par RT-qPCR. Nos résultats obtenus sur les fruits rouges montrent que seule l'analyse des échantillons d'ARN dilués permet d'obtenir une efficacité d'extraction du MNV supérieure à 1%, et donc de valider le contrôle de processus.

Pour quantifier le pourcentage d'inhibition des réactions de RT-qPCR, nous avons utilisé un contrôle externe d'inhibition (EAC) pour chaque cible virale à amplifier (VHA, NoV GI et GII). Son utilisation lors de nos travaux a permis de confirmer que **le pourcentage d'inhibition des réactions de RT-qPCR varie en fonction des matrices alimentaires et de la cible virale.**

L'inhibition de l'amplification des ARN de NoV et du VHA est significativement plus élevée dans les extraits d'ARN provenant de laitues (> 90%) et de fruits rouges (entre 75 et 96%) que dans ceux provenant de l'eau embouteillée (< 70%) et des produits laitiers (lait (<67%) et fromage blanc (<70%)). Les analyses réalisées à partir d'eau embouteillée, de lait et de fromage blanc sont donc validées lorsque l'EAC est détecté dans des échantillons d'ARN non dilués.

Pour la matrice « fruits rouges » (fraise, framboise et mélange de fruits rouges), seule la dilution des ARN permet de valider l'ensemble des analyses réalisées. En effet, le pourcentage d'inhibition n'excède pas 40% lorsque l'EAC est détecté dans des échantillons d'ARN dilués.

En revanche, la dilution des extraits d'ARN provenant de laitues n'est pas suffisante pour lever les inhibitions et valider toutes les analyses. Le pourcentage d'inhibition dans les échantillons dilués provenant de laitues varie de 30 à 95% en fonction du génome viral à amplifier.

Nous avons évalué l'ajout d'une étape de purification des ARN viraux en utilisant le kit « **OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit** » (Zymoresearch) afin d'éliminer les inhibiteurs (co-extraits avec les ARN viraux) des réactions d'amplification par PCR. Cette étude a été réalisée sur des **fruits rouges (fraises, framboises et mélange de fruits rouges)** artificiellement contaminés avec les norovirus (GI et GII), le VHA et le contrôle de processus MNV-1. Le pourcentage d'inhibition de l'amplification des EAC détectés par RT-qPCR est significativement plus faible après la purification des extraits d'ARN à l'aide de ces colonnes. Il varie de 75 à 96% dans les extraits d'ARN non dilués tandis qu'il n'excède pas 44% après l'ajout de cette étape de purification des ARN viraux. En diminuant l'impact des inhibiteurs sur l'amplification des génomes viraux, l'utilisation de ces colonnes permet d'augmenter le nombre de génomes viraux détectés, et par conséquent les rendements d'extraction des virus. L'utilisation de ces colonnes permet donc d'obtenir des pourcentages d'inhibition des réactions de RT-qPCR inférieurs à 75% et des efficacités d'extraction du contrôle de processus MNV-1 supérieures à 1% sans avoir eu recours à leur dilution.

Nos travaux montrent que l'ajout de cette étape de purification pourrait permettre de valider l'analyse de matrices fortement inhibitrices selon les critères de la norme ISO (pour les 2 contrôles) tout en s'affranchissant de la nécessité de diluer les échantillons d'ARN.

Evaluation de la PCR digital pour la détection des NoV et VHA dans les aliments

L'amélioration des méthodes de diagnostic en virologie alimentaire peut également porter sur l'étape de détection des ARN viraux avec notamment l'apport de nouveaux outils de biologie moléculaire qui évoluent régulièrement.

Nous avons évalué l'apport de la **digital PCR (RT-dPCR)** pour la quantification des hNoV et du VHA dans l'eau embouteillée, les végétaux et les fruits rouges.

Pour réaliser nos différentes études nous avons utilisé le **système en micro-fluidique de BioMark** (Fluidigm) de la plateforme instrumentale nationale IdentityPath (PF IdentityPath) de l'Anses. Ce système digital PCR repose sur l'utilisation de puces comprenant des micro-canaux et des micro-valves qui permettent la compartimentation de chaque échantillon dans 770 micro-chambres, dans lesquelles des réactions de qPCR individuelles ont lieu, de telle sorte que chacune des chambres ne contienne qu'une ou zéro copie de génome à amplifier. L'application de la Loi de Poisson permet ensuite de quantifier le nombre de copie de génomes initialement présent dans l'échantillon (Figure 10). **L'avantage de ce système est d'avoir pu conserver les conditions réactionnelles utilisées pour la RT-qPCR** (i.e. mêmes amorces, sondes, enzymes et cyclage RT-qPCR) **préconisées par la norme ISO 15216-1.**

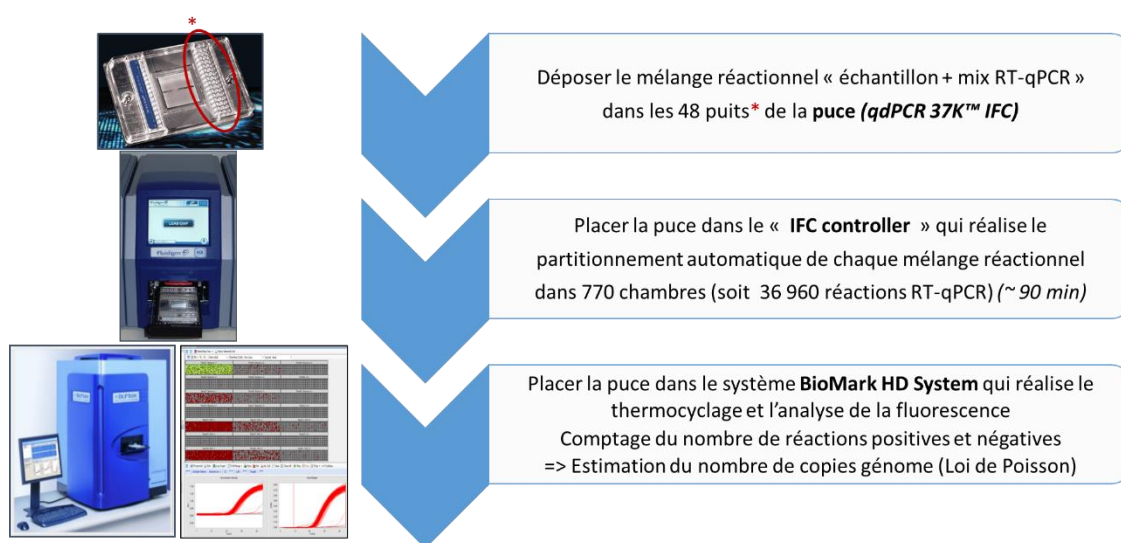


Figure 10. Digital RT-qPCR avec le système BioMark (Fluidigm).

Nos travaux montrent que la **RT-dPCR présente la même sensibilité que la RT-qPCR pour la détection des hNoV et du VHA dans les matrices alimentaires** (*i.e.* eau embouteillée, laitues et fruits rouges), et ce, malgré le plus faible volume d'échantillon à analyser (*i.e.* 0.38 µl par RT-dPCR *versus* 5 µl par RT-qPCR).

La digital PCR présente également l'avantage de pouvoir quantifier les génomes viraux en l'absence de gammes de standards. Le nombre de copies de génomes déterminé par RT-dPCR est plus faible que celui déterminé par RT-qPCR *via* la gamme standard de la RT-qPCR (*i.e.* diminution de 0,4 à 1 log₁₀ pour l'ADN et de 1,2 à 1,72 log₁₀ pour l'ARN). En effet, la quantification par spectrométrie des standards utilisés pour la détection par RT-qPCR pourrait être à l'origine d'une surestimation de la quantité de génomes présents dans les échantillons.

Les résultats que nous avons obtenus pour le contrôle d'inhibition montrent que **seule la RT-dPCR permet de valider tous les échantillons analysés provenant des matrices fortement inhibitrices** (fruits rouges et laitues). Pour l'analyse des fruits rouges, l'inhibition PCR mesurée à l'aide des EAC dans les extraits d'ARN non dilués provenant de fruits rouges est plus faible avec la RT-dPCR (de 20 à 77%) qu'avec la RT-qPCR (de 75 à 95%). La RT-dPCR a permis de valider en termes d'inhibition PCR six fois plus d'échantillons (23/27) qu'en utilisant la RT-qPCR classique (4/27). Pour l'analyse des laitues, une diminution significative de l'inhibition PCR est également observée en utilisant la RT-dPCR (< 65%) par rapport à la RT-qPCR (de 30 à 95%) après la dilution des extraits d'ARN. La digital PCR présente donc un réel avantage pour la validation des diagnostics viraux étant donné sa meilleure résistance à l'inhibition de réaction PCR comparativement à la RT-qPCR classique.

En raison de ses nombreux avantages mis en évidence au cours de nos travaux (*i.e.* sensibilité équivalente, standardisation de la quantification des génomes viraux et augmentation du seuil de tolérance aux inhibiteurs PCR), la PCR digital pourrait ultérieurement remplacer la RT-qPCR conventionnelle dans les diagnostics de routine.

Détection multiple des virus par RT-qPCR

La recherche de virus dans un échantillon alimentaire reste coûteuse en raison du grand nombre de réactions PCR nécessaire pour la détection du virus pathogène, du contrôle de processus, de l'EAC et des standards utilisés pour la quantification des génomes viraux.

Pour réduire le coût et accroître la capacité analytique, j'ai **développé des tests d'amplification génomique multiple** pour permettre la détection simultanée des génomes du virus pathogène recherché (VHA ou norovirus GI et GII) avec ceux du contrôle de processus MNV-1.

Les méthodes de détection par RT-qPCR multiplex présentent la même efficacité et la même sensibilité pour la détection du virus pathogène que celles par RT-qPCR simplex. De façon similaire, l'ajout du contrôle de processus MNV-1 ne modifie pas les paramètres de la RT-qPCR multiplex. Les méthodes de détection par RT-qPCR duplex (VHA et MNV-1) et triplex (NoV GI, GII et MNV-1) ont été respectivement appliquées pour la réalisation du projet portant sur la détection du VHA dans les tomates semi-séchées et celui portant sur la détection des NoV dans l'eau embouteillée et l'eau de réseau. Cependant, le développement des méthodes de RT-qPCR multiplex reste limité en raison du nombre restreint de fluorophores utilisables.

Apport des nouvelles technologies de RT-qPCR haut-débit pour le génotypage du VHA

Devant la multiplicité des génotypes pour une même souche virale et le nombre élevé de virus entériques qui pourraient potentiellement être impliqués dans les TIAC, les nouvelles technologies de RT-qPCR haut-débit pourraient devenir un réel avantage en virologie alimentaire.

Le virus de l'hépatite A est divisé en trois génotypes humains, chacun subdivisé en deux sous-types (IA et IB, IIA et IIB, IIIA et IIIB). Lorsque des génomes viraux du VHA ont été détectés dans un échantillon alimentaire suspecté être à l'origine de la TIAC, des analyses phylogénétiques peuvent être entreprises pour faire le lien entre la souche retrouvée chez les patients et celle retrouvée dans l'aliment (29). L'approche utilisée par le CNR est basée sur le génotypage par séquençage de la région VP1 ou VP1-2A du génome du VHA. Cependant, elle reste difficilement applicable en virologie alimentaire en raison de la faible charge virale retrouvée dans les échantillons analysés.

Pour développer une méthode de génotypage du VHA par RT-qPCR haut-débit, **nous avons dessiné six modèles moléculaires permettant la détection spécifique de chacun des génotypes du VHA** (Figure 11). La localisation des régions génomiques du VHA amplifiées par RT-qPCR pour la détection de chaque génotype recherché est indiquée sur la Figure 12.

Genotype	Reference strain		Sequence	Position
HAV IA	AB020564.1	Forward primer	GCA TTT AGG TTT TTC CTC ATT	702-722
		Reverse primer	TCA ACK GAC TGA ATC ATT	837-820
		Probe	TCC AAA CAA GGA ATT TTC CAG AC	743-765
HAV IB	M14707	Forward primer	AAG CTT ATT GTG TAY TGT TAT	2070-2090
		Reverse primer	CAG AAT CAT CTC CAA CYT	2223-2208
		Probe	TTC TCC TTC TAA CGT TGC TTC CCA	2103-2125
HAV IIA	AY644676.1	Forward primer	ACY ATG ATG AGC AGA ATT G	2978-2996
		Reverse primer	GCA TAT TTT AAT CTC TGC TT	3129-3110
		Probe	AGA CCT GGA ATC GTC AGT GGA TGA	3004-3027
HAV IIB	AY644670.1	Forward primer	GGA GAT TTG AAA GTC ATA TTG	3047-3067
		Reverse primer	TTC CTG GGC ATA CTT TAG	3135-3118
		Probe	AGT CTT AAT TCT TTG TAT GGT TTTC	3078-3094
HAV IIIA	AB279732.1	Forward primer	TCC CTT GGA TTT GAC AAT	2605-2622
		Reverse primer	RGT ATT RAA CCT AAC AGC	2763-2747
		Probe	AAT TAT AAC TGG GGC TAC TGA TGT T	2623-2647
HAV IIIB	AB279735.1	Forward primer	AAT CCG ATG CTT CTC AAG	1560-1577
		Reverse primer	GCC TTC CTG AAT GGT ATT	1841-1824
		Probe	AAA ATT ACA CAC TTY ACA ACY TGG A	1589-1613
HAV 5'UTR	M14707	Forward primer*	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	68-85
		Reverse primer*	GGA GAG CCC TGG AAG AAA G	241-223
		Probe*	CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA	169-150

Figure 11. Séquences des couples d'amorces et sondes utilisés pour la détection des 6 génotypes du VHA.

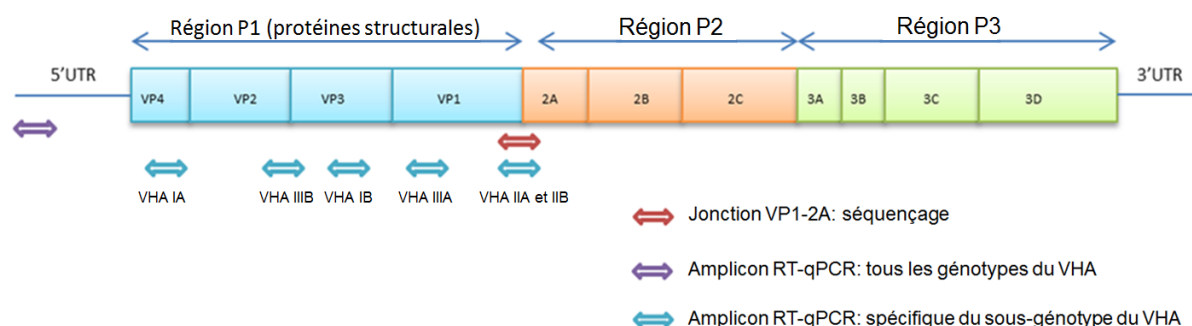


Figure 12. Localisation des régions du génome du VHA amplifiées par RT-qPCR. Modèles moléculaires utilisés pour la détection du VHA selon la norme NF EN ISO 15216-1 (flèche violette), pour la détection spécifique des 6 génotypes par RT-qPCR haut-débit (flèche bleue) et pour le génotypage du VHA par la méthode conventionnelle de séquençage (flèche rouge).

Après avoir vérifié leur spécificité et leur sensibilité, ces modèles moléculaires ont été utilisés pour la détection du VHA dans des échantillons cliniques (5 selles et 30 sera de patients infectés par le VHA) qui avaient été au préalable génotypés par le CNR. Les résultats sont concordants avec ceux obtenus par séquençage pour 34 des 35 échantillons analysés. Le résultat discordant correspond à un échantillon de sérum qui avait été séquencé comme appartenant au sous-type IB et qui n'a pu être détecté qu'avec le modèle spécifique du sous-type IA. Il peut s'agir d'une souche recombinante IA-IB dans la mesure où ces deux sous-types co-circulent et que de tels événements de recombinaisons entre ces sous-types IA et IB ont déjà été rapportées (30, 31).

L'utilisation de ces modèles moléculaires spécifiques de sous-type a également permis la mise en évidence de co-infections chez les patients. En effet, des génotypes IA et IIA ont été détectés dans un échantillon de selles séquencé comme IA ; et des génotypes IA et IB ont pu être détectés dans 5 échantillons de sérum séquencés comme IA également. De plus, les données quantitatives montrent que les génotypes supplémentaires détectés avec les modèles moléculaires spécifiques avaient une concentration de 1 à 5 log₁₀ plus faible que la souche IA. Ces résultats confirment que la technique de séquençage conventionnelle par la méthode de Sanger ne peut détecter que la souche majoritaire.

Cette méthode de génotypage moléculaire a pu être utilisée dans le cadre d'une investigation de TIAC réalisée au sein de notre unité (TIAC D-14-02147). Elle a permis d'identifier le sous-type VHA IA dans des échantillons alimentaires (tartelettes aux fruits) alors que le génotypage par la méthode conventionnelle de séquençage avait échoué. Le sous type IA était bien celui identifié chez les patients par séquençage.

Projets VIRENTERIC , VIRENTERIC 2 et Extract-Fruits	Travaux publiés dans <i>Food Microbiology</i> (5 et 18) ; <i>International Journal of Food Microbiology</i> (4 et 9) et <i>Journal of Applied Microbiology</i> (13)
Projet de thèse VIROPUCE	Travaux publiés dans <i>Journal of Virological Methods</i> (15) ; <i>BMC Microbiology</i> (11) ; <i>International Journal of Food Microbiology</i> (10)

1.2. Emergence de nouveaux risques en virologie alimentaire

Bien que les hNoV et le VHA soient les deux principaux agents impliqués dans les TIAC d'origine virale, le virus de l'hépatite E et les rotavirus sont aussi responsables d'épidémies (32). D'autres virus de moindre importance épidémiologique sont également transmissibles *via* l'eau et/ou les aliments, incluant les bocavirus humains, les cosavirus, le parvovirus B19, les picobirnavirus, les sapovirus, le TBEV (Tick-Borne Encephalitis Virus), les aichi virus, les coronavirus humains (229E, HKU1, OC43, NL63), les adénovirus entériques (40, 41), les astrovirus, les enterovirus (dont les coxsackievirus et les echovirus).

Apport des nouvelles technologies de RT-qPCR haut-débit pour la détection de pathogènes viraux multiples

Une puce micro-fluidique basée sur la technologie de PCR Array (Système BioMark ; Fluidigm) a été développée au laboratoire pour la détection par RT-qPCR des génomes de 19 virus entériques et deux virus pouvant être utilisés comme contrôles de processus (mengovirus et MNV-1). La « Viropuce » (48.48 Dynamic Arrays IFC) permet l'analyse simultanée par qPCR de 48 échantillons en regard de 21 virus recherchés. En comparant la détection de chaque cible virale par RT-qPCR et par PCR array, la limite de détection obtenue avec cette dernière est similaire pour 11 cibles virales et plus élevée de 1 à 3 log₁₀ copies génomes pour 10 cibles virales. Le criblage de 21 échantillons cliniques avec la PCR array a permis la détection du même virus que celui précédemment identifié par le CNR des virus des gastro-entérites, mais également la mise en évidence d'autres virus entériques.

Ces nouvelles méthodes de qPCR haut débit permettent d'envisager des études de prévalence à grande échelle tout en limitant le coût des analyses.

Développement et optimisation des méthodes de détection du virus de l'hépatite E dans l'eau et les matrices carnées

Le HEV est endémique dans les régions où les conditions sanitaires sont faibles et responsable d'épidémies d'hépatite virale à grande échelle. Il est également retrouvé dans les pays développés mais est à l'origine de cas sporadiques. Les génotypes 1 et 2 du HEV sont présents chez l'homme dans les régions d'endémie (pays à faible niveau d'hygiène) alors que le génotype 3, et moins fréquemment le 4, sont responsables de cas sporadiques autochtones d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés. La consommation d'eau contaminée est considérée comme la cause principale des épidémies d'hépatite virale E dans les pays en voie de développement, tandis que la transmission zoonotique (*via* les contacts directs avec des animaux infectés ou la consommation de viandes contaminées) a été associée aux cas sporadiques des pays industrialisés (33-35).

En France, les produits à base de foie de porc ont été suspectés à plusieurs reprises d'être à l'origine de cas d'hépatite E autochtones chez des patients sans histoire de séjour en zone d'endémie entre 2007 et 2009 (36). L'infection par le HEV fait partie des maladies alimentaires préoccupantes et des enquêtes font état de séroprévalence élevée variant de 20 à 71.3% dans le sud de la France (37, 38).

Le virus de l'hépatite E (HEV) n'a pas été identifié comme prioritaire en 2006 lors de l'initiation du projet de normalisation des méthodes de détection des virus dans les aliments par le groupe CEN. Néanmoins, **pour faire face à ce risque encore considéré comme émergent en 2009, j'ai pris en charge au sein de l'unité VE le développement d'un axe de recherche sur le HEV.**

J'ai développé une **méthode de détection du HEV et du contrôle de processus MNV-1 dans l'eau par RT-qPCR duplex**. Pour conserver le modèle moléculaire utilisé précédemment pour la détection du MNV-1, le modèle moléculaire décrit par *Jothikumar et al.* (39) pour la détection du HEV a été adapté. L'efficacité d'amplification et la sensibilité de détection du génome du HEV obtenues par RT-qPCR simplex sont équivalentes à celles obtenues en présence du MNV-1 lors de la RT-qPCR duplex. Par la suite, la RT-qPCR duplex a été appliquée pour détecter le HEV dans de l'eau embouteillée et de l'eau de réseau artificiellement contaminées avec du HEV et du MNV-1. En utilisant la méthode de concentration des virus par filtration, la sensibilité de détection du HEV dans de l'eau embouteillée est la même que celle obtenue dans de l'eau de réseau (700 à 3500 copies génome / 0.5 L). De plus, la présence du contrôle de processus MNV-1 ne modifie ni la sensibilité de détection du HEV, ni les rendements de récupération de ce virus pathogène. Comme montré précédemment pour les autres virus entériques, le taux de récupération du HEV à partir de l'eau embouteillée (>40%) est plus élevé que celui obtenu à partir de l'eau de réseau (>50%).

Cette méthode de détection du HEV dans l'eau a été appliquée lors d'une investigation de TIAC en juin 2015 (Demande faite par l'ARS Auvergne ; D-15-001647). Les deux échantillons analysés provenant d'eau du robinet (réseau privé de distribution) ont été retrouvés positifs pour la présence de génomes du HEV (10^4 - 10^5 / 2L).

A la demande de la DGAI, l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a émis 2 rapports (Saisines 2009-SA-0101 ; 2009-SA-0146) soulignant le risque pour le consommateur d'être infecté par le HEV suite à la consommation de figatelles (saucisses crues à base de foie de porc). Par la suite, deux nouveaux avis portant sur la proposition d'un plan d'échantillonnage pour l'organisation en 2011 d'un plan de surveillance de la contamination par le HEV des produits à base de foie de porc cru (Saisines 2010-SA-0170) et sur les capacités analytiques en matière de détection du HEV dans ces produits à risque (Saisines 2010-SA-0171) ont été émis par l'Anses en 2010. Dans ce contexte, **j'ai développé une méthode de détection du HEV par RT-qPCR dans les matrices à base de foie de porc en vue de la participation de l'unité VE au plan de surveillance du HEV (2011) (DGAI/SDSSA/N2010-8330).**

Le développement de la méthode a été réalisé sur des échantillons de figatelles (3g) inoculés avec un surnageant de selle de porc contaminé par le génotype 3f de HEV et avec le MNV-1 utilisé comme contrôle de processus. Trois méthodes comprenant successivement l'homogénéisation des échantillons au stomacher®, l'élution et la concentration des particules virales au PEG ont été évaluées pour leur efficacité d'extraction du HEV et du MNV-1. Pour deux méthodes, une étape de purification des particules virales au chloroforme-butanol a été ajoutée en amont ou en aval de l'étape au PEG. Chacune des trois méthodes a été combinée à 3 tampons d'élution (PBS, eau distillée et TGEB). Les rendements d'extraction les plus élevés ont été obtenus pour les deux virus en utilisant la méthode par précipitation au PEG associée à l'eau distillée utilisée comme tampon d'élution.

La méthode sélectionnée (Figure 13) a été par la suite caractérisée et validée par des essais intra-laboratoires pour deux types de matrices alimentaires à base de foie de porc cru, **les figatelles et les saucisses de foie**. Les échantillons ont été artificiellement contaminés avec différents niveaux d'inoculation pour le HEV et une quantité de 5×10^4 TCID₅₀ pour le MNV-1. La limite de détection (LOD) du HEV dans les figatelles et les saucisses est respectivement de $1,75 \times 10^4$ et de $8,75 \times 10^4$ copies génomes pour 3g d'échantillon. Les résultats montrent que les rendements d'extraction moyens obtenus pour le HEV et le MNV-1 sont plus élevés dans les figatelles (18,38% et 13,11% respectivement) que ceux obtenus à partir des saucisses de foie (3,94% et 2,92% respectivement). L'analyse statistique des résultats (n-way ANOVA) montre (i) que l'ajout du contrôle de processus MNV-1 ne modifie pas les rendements d'extraction du HEV; (ii) le rendement d'extraction du HEV dans les figatelles et les saucisses de foie n'est pas fonction du niveau d'inoculation de départ; et (iii) qu'il n'y a pas d'inhibition d'amplification par RT-qPCR des génomes des deux virus.

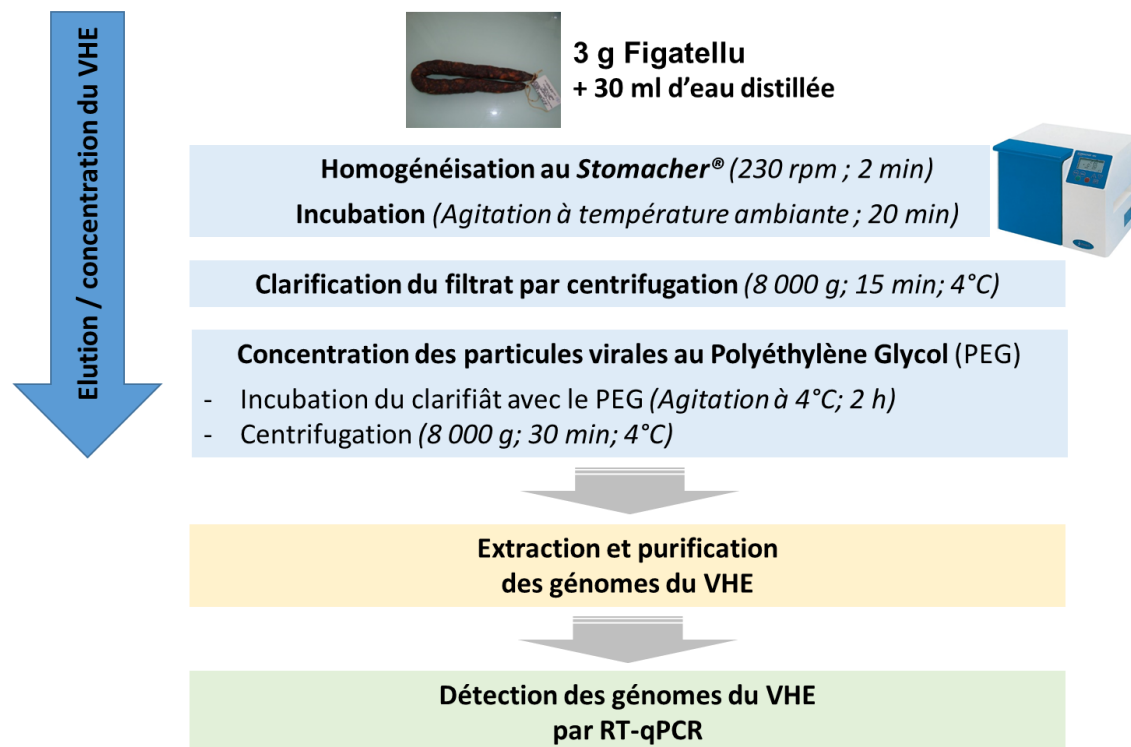


Figure 13. Méthode développée pour la détection du HEV par RT-qPCR dans les figatelles.

Dans le cadre du plan de surveillance réalisé en 2011, la méthode validée a été utilisée pour analyser 70 échantillons. Ces derniers ont été choisis de manière à conserver la répartition initiale des 400 échantillons en termes d'origine géographique et de type de produits (*i.e.* 33 figatelles, 27 saucisses de foie, 5 foies salés séchés, 5 pâtes à quenelles). Douze figatelles et dix saucisses de foie ont été testés positifs pour le génome du HEV, ce qui correspond à une prévalence d'environ 36% d'aliments contaminés par le HEV. La charge virale du HEV dans ces 22 échantillons contaminés est comprise entre 4×10^1 et 2×10^6 copies génomes du HEV / g. La quantité de HEV retrouvée est $>10^2$ copies génomes par gramme dans 95 % des échantillons positifs, $> 10^3$ copies génomes par gramme dans 55 % des échantillons positifs et $> 10^4$ copies génomes par gramme dans 27% des échantillons positifs. En montrant la forte prévalence du HEV et les niveaux élevés de contamination des produits à base de foie de porc cru, ces travaux ont permis de conforter la possibilité d'une transmission du HEV à l'homme *via* ces aliments.

Au cours de cette étude, des **rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1)** supérieurs à 1% ont été obtenus dans 76 % des figatelles et dans 89% des saucisses de foie analysées. En revanche, pour les quenelles (5 échantillons) et les foies salés séchés (5 échantillons), les rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1) obtenus sont beaucoup plus faibles ($< 1\%$). Ces résultats indiquent qu'une optimisation de la méthode est nécessaire pour l'analyse des quenelles et des foies salés séchés.

Nous avons donc évalué par la suite six méthodes pour leur efficacité à éluer les particules virales du HEV à partir de matrices naturellement contaminées issues du plan de surveillance (figatelles, saucisses et foie de porc). La contamination des foies par le HEV étant une contamination interne, l'étape d'extraction constitue une étape importante pour la détection du HEV par RT-qPCR. Les paramètres tels que la prise d'échantillonnage (3g ou 10g), la méthode d'homogénéisation (stomacher® ou FastPrep®) et le ratio entre la prise d'échantillonnage et le volume du tampon d'élution (1:5 ou 1:10) ont été étudiés. Nos résultats montrent que le taux de recouvrement du HEV est supérieur lorsque les échantillons de figatelles et saucisses de foie sont homogénéisés avec le FastPrep® dans un tampon d'élution ayant pour volume 5 fois leur poids. A l'inverse, le taux de recouvrement du HEV ne dépend pas du poids de l'échantillonnage pour les trois matrices étudiées. Nous avons également observé une plus grande variabilité des données quantitatives obtenues pour la matrice foie. Les résultats de cette étude confirment toute l'importance du protocole d'élution du HEV à partir de matrices d'origine animale (*i.e.* contamination interne) et indiquent une possible contamination hétérogène du foie de l'animal.

La quantification des génomes du HEV par RT-qPCR dans les échantillons est réalisée en utilisant une gamme standard d'ARN transcrits *in vitro* à partir de plasmides et quantifiés par spectrophotométrie. Comme nous l'avons vu précédemment, cette méthode de quantification peut être à l'origine d'une surestimation du nombre de copies de génomes des standards, rendant plus difficile la standardisation des données quantitatives obtenues entre les laboratoires. C'est pourquoi, j'ai entrepris une étude pour **évaluer l'utilisation de la digital PCR pour quantifier les génomes du HEV provenant d'échantillons de figatelles et de saucisses de foie** naturellement contaminés.

Douze échantillons testés positifs pour la présence de génomes du HEV dans le cadre du plan de surveillance (6 figatelles et 6 saucisses de foie) ont été sélectionnés pour cette étude en tenant compte de la charge virale déterminée par RT-qPCR. Les six échantillons de figatelles ou de saucisses de foie ont été classés en trois niveaux de contamination. Pour chacune des deux matrices, un échantillon n'ayant pas été détecté positif pour le HEV a été sélectionné comme contrôle négatif d'extraction. Les échantillons ont été artificiellement contaminés avec un contrôle de processus (*i.e.* MNV-1 ou mengovirus), puis la méthode développée précédemment a été utilisée pour l'extraction des génomes viraux.

La RT-qPCR a été utilisée comme méthode de détection pour évaluer l'efficacité d'extraction du contrôle de processus et pour évaluer le pourcentage d'inhibition d'amplification de l'EAC utilisé (*i.e.* ARN transcrit portant la séquence cible du HEV). Comme observé précédemment dans l'étude portant sur le contrôle de processus, mes résultats montrent que l'efficacité d'extraction est significativement plus élevée pour le mengovirus que pour le MNV dans les figatelles (ANOVA ; $p\text{-value}=0.0351$) et les saucisses de foie (ANOVA ; $p\text{-value}=0.0042$). L'efficacité d'extraction du contrôle de processus est supérieure à 1% pour la moitié des sous-échantillons analysés avec MNV et presque la totalité (85%) pour ceux analysés avec le mengovirus. En accord avec les résultats obtenus dans le cadre du plan de surveillance, l'utilisation de l'EAC dans cette étude a permis de confirmer que l'inhibition d'amplification des génomes du HEV n'est pas significative dans les extraits d'ARN provenant de figatelles et de saucisses de foie. En effet, l'inhibition PCR est comprise entre 53 et 59% dans les échantillons de figatelles et entre 16 et 44% dans les échantillons de saucisses de foie.

La méthode de quantification du HEV par RT-dPCR microfluidique a été développée en utilisant les mêmes conditions réactionnelles (mélange réactionnel, cyclage PCR, amorces/sondes) que celles de la RT-qPCR. Les deux méthodes ont permis la détection des génomes du HEV dans les échantillons de figatelles et les saucisses de foie avec la même sensibilité. Si la quantification du HEV est plus élevée en utilisant la RT-qPCR pour un même échantillon, les différences de quantification du génome du HEV dans les échantillons n'excèdent pas 1 \log_{10} (Figure 14). L'analyse statistique réalisée confirme que les données quantitatives obtenues par RT-dPCR pour les 6 figatelles et pour 4 saucisses ne sont pas significativement différentes de celles obtenues par RT-qPCR.

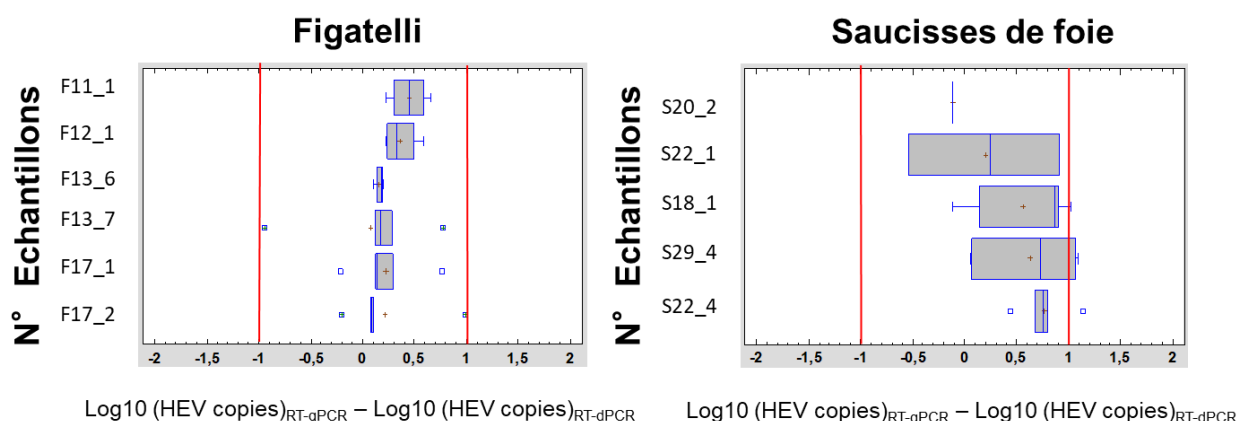


Figure 14. Quantification du HEV dans les figatelles et les saucisses de foie : RT-qPCR vs RT-dPCR. Différence entre la quantification des génomes du HEV obtenue par RT-qPCR et celle obtenue par RT-dPCR (\log_{10} (copies génomes)) dans 6 figatelles et 5 saucisses de foie.

Cette étude montre de nouveau tout l'intérêt de la digital RT-PCR qui permet la quantification des génomes viraux en s'affranchissant du besoin de gammes de standards et en limitant le coût des analyses en virologie alimentaire.

Projet de thèse VIROPUCE	Travaux publiés dans <i>PLoS One</i> (8)
Projet VIRENTERIC	Travaux publiés dans <i>International Journal of Food Microbiology</i> (17)
Projet VirQuant	Travaux publiés dans <i>Frontiers in Microbiology</i> (6)
Projet Extract-VHE	Travaux publiés dans <i>Food Microbiology</i> (1)
Plan de surveillance VHE (DGA/SDSSA/N2010-8330)	Travaux publiés dans <i>International Journal of Food Microbiology</i> (12) ; Rapport (2)

2. Etude du cycle viral infectieux pour contribuer à l'évaluation du risque viral

La méthode NF EN ISO 15216 est actuellement utilisée en routine dans le cadre d'investigations de TIAC dont l'origine virale est suspectée. L'obtention d'un résultat positif pour la présence de génomes viraux dans les aliments suspectés permet de conforter l'hypothèse d'une origine virale de la TIAC, ce qui contribue à une meilleure considération de ce risque dans le domaine de la sécurité alimentaire. En revanche, l'interprétation d'un résultat positif dans le cadre d'études de surveillance, de contrôles officiels ou d'autocontrôles menés par les entreprises agroalimentaires est beaucoup plus délicate. En effet, la présence de génomes viraux n'est pas obligatoirement corrélée à la présence de virus infectieux.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de règlement concernant les critères virologiques applicables aux denrées alimentaires. Le danger viral n'est pris en compte que de manière indirecte *via* la détection et la numération d'*Escherichia coli* utilisée comme indicateur d'hygiène. Mais, la présence de *E. coli* n'est pas corrélée avec la présence de virus entériques et inversement. La publication de la norme en 2017 pourrait conduire à la mise en place d'un critère spécifique sur les virus entériques dans le cadre d'analyses réglementaires. Mais, une surestimation du danger viral liée à l'utilisation de méthodes moléculaires risquerait d'entraîner le retrait potentiellement injustifié des aliments mis sur le marché.

Etablir un lien entre la détection de génomes viraux et la présence de particules infectieuses est à ce jour un enjeu de taille en virologie alimentaire afin de mieux apprécier le risque viral. C'est pourquoi, le développement de méthodes permettant la mise en évidence du caractère infectieux est indispensable et deux approches sont actuellement utilisées au sein de l'unité VE.

2.1. Développement de méthodes combinant l'utilisation de molécules (monoazides, platine) et la détection des génomes viraux par RT-qPCR

La première approche que nous avons évaluée porte sur une méthode combinant un traitement chimique (e.g. monoazides, dérivés du platine) des échantillons et la détection des génomes viraux par RT-qPCR. En se fixant sur l'ARN viral, les molécules chimiques empêchent l'amplification des ARN libres et des ARN provenant de capsides virales altérées (Figure 15). Pour améliorer la pénétration de ces molécules à l'intérieur de capsides virales altérées, l'utilisation de détergents (*i.e.* NP-40, Triton et Tween20) a également été évaluée. La méthode présentant la plus importante réduction du titre viral génomique après le traitement des suspensions virales à forte température (80°C) a été sélectionnée et elle varie en fonction du virus détecté. **La méthode sélectionnée pour la détection des hNoV et du MNV utilise un dérivé du platine (PtCl4) et celle sélectionnée pour le VHA et les rotavirus utilise un monoazide (PMA ou EMA).**

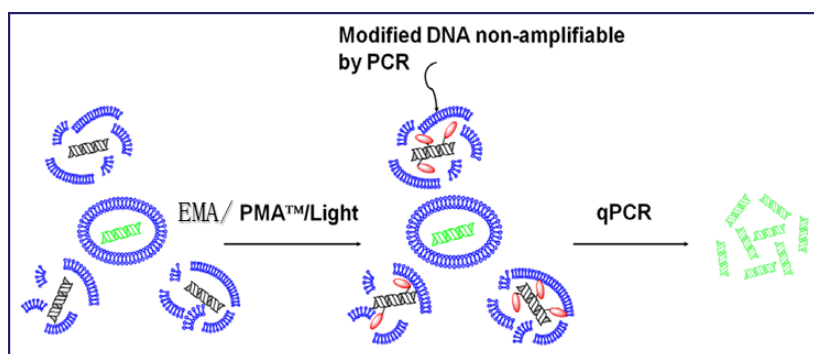


Figure 15. Principe de l'utilisation des monoazides en amont de la RT-qPCR pour la détection des génomes viraux provenant de particules virales intactes.

Les méthodes de « EMA+NP40-RT-qPCR », « EMA-RT-qPCR » et « PMA-RT-qPCR » développées respectivement pour la détection du VHA, de la souche humaine Wa et simienne SA11 du rotavirus ont été appliquées lors d'études d'inactivation thermique et comparées aux autres méthodes de titrages (titrage infectieux par culture cellulaire, titrage moléculaire par RT-qPCR).

Les titres génomiques du VHA et des deux souches de rotavirus déterminés par RT-qPCR ne sont pas corrélés aux titres infectieux quelle que soit la température d'inactivation. Le prétraitement des échantillons aux monoazides a permis d'obtenir une corrélation entre le titrage génomique et le titrage infectieux pour les fortes températures d'inactivation. En effet, l'altération de la capsid virale plus importante lors de l'inactivation à 80°C (comparativement à 68°C et 72°C) permet une pénétration plus efficace des monoazides.

Les méthodes développées pourront être utilisées pour la réalisation d'études d'inactivation virale, mais également pour la détection de virus potentiellement infectieux provenant d'aliments.

2.2. Détection du caractère infectieux par impédancemétrie

La mise en évidence du caractère infectieux d'un virus repose sur l'utilisation d'un modèle *in vivo* ou *in vitro*. Forte de mes compétences acquises précédemment pour le développement de modèles *in vitro*, c'est tout naturellement que je me suis intéressée aux systèmes d'analyse cellulaire et à leur apport dans le champ thématique de la virologie alimentaire. L'impédancemétrie a récemment été utilisée pour la mise en évidence de l'infectiosité de différents virus (40-42).

C'est pourquoi, la deuxième approche que j'ai souhaitée mettre en œuvre pour évaluer le caractère infectieux des virus entériques est **une méthode de biologie cellulaire reposant sur la mesure de l'impédance cellulaire** avec le système d'analyse cellulaire en temps réel xCELLigence (ACEA) acquis dans le cadre du projet DIM-MALINF (140075). Alliance de la micro-électronique et de la biologie cellulaire, cette technologie **sans marquage** permet de suivre **en continu** le comportement de cellules adhérentes en conditions physiologiques ou soumises à divers stimuli. Ainsi, l'impédance cellulaire (*Index cellulaire* ; *CI*), mesurée en temps réel avec le système xCELLigence, est étroitement liée à la prolifération, la viabilité et la morphologie cellulaire (Figure 16).

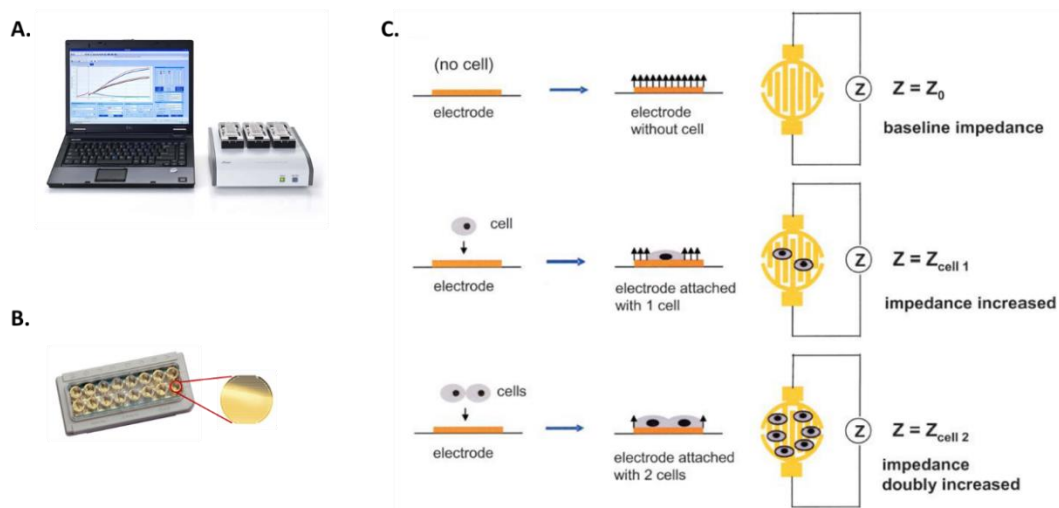


Figure 16. Principe de la mesure de l'impédance cellulaire en temps réel avec le système DP xCELLigence (ACEA).

A. Système DP xCELLigence (3 x 16 puits). **B.** Plaque de culture contenant 16 puits dont chacun est tapissé d'électrodes en or. **C.** Un courant alternatif est appliqué au sein du réseau d'électrodes et le milieu de culture joue le rôle d'électrolyte. En l'absence de cellules, les ions vont circuler librement entre les électrodes et l'impédance mesurée est de 0 (Z_0). Lorsque les cellules sontensemencées, leur présence va avoir pour effet d'affecter localement l'environnement ionique, l'impédance augmente (Z_{cell}). (source : ACEA Biosciences).

L'apport de l'impédancemétrie pour mesurer le caractère infectieux des virus transmis par voie alimentaire a tout d'abord été évalué pour des souches virales adaptées en culture qui induisent une infection lytique et qui sont couramment utilisées pour réaliser des études d'inactivation.

Souche adaptée HM175/18f du virus de l'hépatite A

A ce jour, les méthodes conventionnelles (e.g. Plages de lyse et Dilutions limites (TCID₅₀)) utilisées pour quantifier les particules virales infectieuses de la souche adaptée HM175/18f du virus de l'hépatite A sont fastidieuses et nécessitent un personnel qualifié pour la lecture des plages de lyse ou d'un effet cytopathogène (ECP). De plus, les résultats ne sont obtenus qu'au bout de 14 jours et ce type de méthode n'est pas adapté pour réaliser des titrages viraux en analyse haut-débit.

Pour évaluer l'impédancemétrie comme méthode de détection de la souche adaptée du VHA, nous avons utilisé la lignée de cellules épithéliales rénales simiennes FRhK-4. Après avoir déterminé la densité cellulaire optimale à l'ensemencement, les profils d'impédance des cellules FRhK-4 non infectées et infectées par la souche adaptée du VHA ont été établis. Une diminution du Cell index (CI) de cinq à zéro a été observée 3 jours après l'infection des cellules par le VHA (10⁵ PFU/ml) contrairement aux cellules non infectées où le CI reste stable. La diminution du CI viro-induite, corrélée à la diminution de la viabilité des cellules infectées, est observée plus précocement que la visualisation de l'effet cytopathogène (ECP) au microscope optique. Pour déterminer la sensibilité de la méthode de détection du VHA par impédancemétrie, les cellules ont été infectées avec des suspensions virales ayant une concentration comprise entre 1 PFU/ml et 10⁶ PFU/ml. Les profils d'impédance ont montré que le temps auquel est observée une diminution de 50% du CI (TCI₅₀) dépend de la quantité de l'inoculum viral. Une relation linéaire entre la quantité de VHA infectieux inoculée sur les cellules et le TCI₅₀ a pu être établie. Les résultats ont montré une quantification linéaire du VHA par impédancemétrie sur 5 logs d'amplitude, avec une sensibilité de détection de 1 PFU par essai (Figure 17).

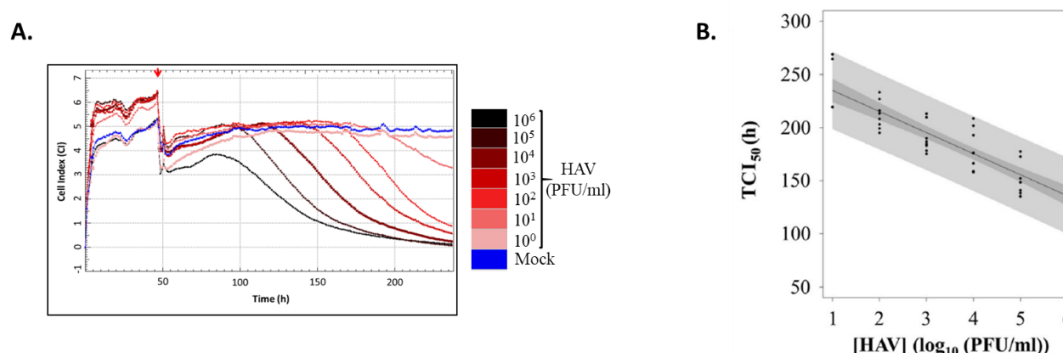


Figure 17. Méthode de titrage de la souche adaptée du VHA (HM175/18f) par impédancemétrie.

A. Courbes cinétiques du CI mesuré en temps réel dans les cellules FRhK-4 non infectées (*bleu*) et infectées par le VHA avec différentes quantités de VHA (de 0,1 (*rose*) à 10⁵ PFU/puits (*noir*)) avec le système xCELLigence. **B.** Relation linéaire entre la concentration du VHA et le temps auquel une diminution de 50% du CI est observée (TCI₅₀ (heure après ensemencement)).

La méthode de titrage par impédancemétrie de la souche adaptée du VHA est plus rapide, moins laborieuse / fastidieuse (diminution du temps de manipulation, facilité d'analyse) et moins onéreuse. Elle permet une analyse haut-débit par rapport à la méthode par plages de lyse que nous utilisions auparavant (*i.e.* Impédancemétrie, résultat en < 7 jours ; Plages de lyse, résultat en 14 jours).

Souche simienne SA11 et humaine Wa de rotavirus

Pour évaluer l'impédancemétrie comme méthode de détection du rotavirus, nous avons utilisé la lignée de cellules épithéliales rénales simiennes MA104 dans laquelle le cycle de réplication de la souche humaine adaptée à la culture cellulaire Wa et de la souche simienne SA11 a été bien caractérisé.

Après avoir identifié les conditions expérimentales optimales de croissance cellulaire, nous avons recherché si le rotavirus induisait une modification de l'impédance cellulaire. Nos résultats montrent que la souche SA11 induit une diminution du CI plus précocement que la souche Wa lorsque les cellules MA104 sont infectées avec la même charge virale et que le milieu d'infection influence le TCI₅₀ obtenu pour une même souche virale. La diminution du CI de 10 à zéro dans les cellules MA104 infectées est en corrélation avec l'apparition de l'ECP observé au microscope optique pour les deux souches virales. Les cinétiques de réplication réalisées en cycle unique confirment que la souche Wa se réplique plus lentement que la souche SA11.

La sensibilité de la méthode de détection du rotavirus par impédancemétrie a été déterminée en fonction du milieu de culture. Pour cela, les cellules ont été infectées avec des inocula de SA11 ou de Wa dilués en série dans un des quatre milieux de culture sélectionnés (de 1 à 10⁶ TCID₅₀/ml). La comparaison des limites de détection déterminées pour les deux souches virales (SA11 et Wa) souligne une meilleure sensibilité de la méthode pour détecter la souche simienne. A partir de ces données, une relation linéaire entre la concentration de la suspension virale et le TCID₅₀ a été établie pour chaque souche virale pour identifier le milieu d'infection qui permet d'établir une gamme standard ayant la plage de linéarité la plus grande pour la quantification des virus infectieux. Pour valider la méthode de détection / quantification par impédancemétrie des 2 souches de rotavirus, une étude statistique sera réalisée à partir des données obtenues.

La mesure de l'impédance cellulaire a permis de mettre en évidence en temps réel l'effet viral sur une monocouche de cellules confluentes de façon plus aisée que la visualisation de l'effet cytopathogène viral par microscopie optique. Il paraît donc intéressant d'évaluer ultérieurement la sensibilité de cette technologie novatrice pour la détection des souches sauvages du VHA et du rotavirus qui n'induisent pas d'ECP.

De par ses nombreux avantages (capacité d'analyse en haut-débit, acquisition des données en temps réel), les méthodes de titrage par impédancemétrie développées pour les souches adaptées du VHA et du rotavirus seront un atout pour la réalisation d'études d'inactivation virale.

2.3. Interaction « hôte-pathogène » et cycle infectieux du VHA

Le virus de l'hépatite A pénètre dans l'organisme par voie digestive, mais ce virus hépatotrope doit traverser la barrière intestinale pour aller infecter ses cellules cibles. Cette première étape est donc indispensable pour la poursuite du cycle infectieux du VHA. C'est pourquoi, j'ai souhaité développer un projet de recherche visant à **caractériser le mécanisme cellulaire impliqué dans le franchissement de la barrière intestinale par le VHA** afin de mieux comprendre le mécanisme à l'origine de la dissémination de ce virus hépatotrope dans l'organisme.

Pour cette étude, les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 ont été cultivées sur des filtres Transwell pour obtenir une monocouche étanche de cellules polarisées mimant ainsi la séparation physique entre la lumière intestinale (compartiment apical) et le milieu séreux (compartiment basolatéral).

Nos résultats montrent que la souche adaptée du VHA (HM175/18f) est capable de franchir l'épithélium intestinal par transcytose, indépendamment de sa réplication, et de rester infectieuse après son passage. En effet, la présence de particules virales infectieuses a pu être mise en évidence dans le milieu basolatéral dès 2h après l'infection apicale des cellules Caco-2 et le passage du VHA s'effectue en l'absence de modification morphologique et fonctionnelle de la barrière intestinale. Le passage du VHA est bloqué en présence du dynasore, inhibiteur de la fonction GTPase de la dynamine nécessaire à la fission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique. Par la suite, l'expression du récepteur du VHA (HAV-cr1) a été mise en évidence à la membrane apicale des cellules Caco-2 par la méthode de biotinylation de surface. Le blocage de ses domaines Immunoglobuline-like et Mucin-like par des anticorps réduit fortement le passage du VHA.

L'ensemble de ces résultats indique que la transcytose de la souche adaptée du VHA est initiée par un mécanisme d'endocytose dynamine-dépendant qui impliquerait également HAV-cr1 (seul récepteur identifié à ce jour pour le VHA).

Projet de thèse VIROPUCE	Travaux publiés dans <i>BMC Microbiologie</i> (14)
Projet INFECT-NOV	Travaux publiés dans <i>International Journal of Food Microbiology</i> (3)
Projet de thèse INFECT-VHA-ASSAY	Travaux publiés dans <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i> (2)
Projet HEPA Transmission	Rapports de Master 2 (Anaïs WEIBEL et Tiphany CHRUN)

CONCLUSIONS

Les thématiques abordées au cours de mon doctorat et de mon post-doctorat m'ont permis de m'investir dans les missions de recherche et de référence de l'unité VE. En effet, mon expérience acquise en recherche fondamentale à l'INSERM et à l'Institut Pasteur sur le thème des interactions « hôte-pathogène » m'a permis de mener des projets de recherche appliqués à la virologie alimentaire avec pour objectif d'améliorer la sécurité des aliments vis-à-vis du risque viral.

Au cours de mes 10 ans à l'Anses, j'ai pu participer au développement des méthodes utilisées pour la détection des virus entériques dans les aliments et à leur normalisation en tant que membre du groupe CEN/TC275/WG6/TAG4.

Les outils de diagnostic développés peuvent être utilisés dans le cadre d'études de prévalence pour évaluer le niveau de contamination des aliments par différents virus et lors des analyses réalisées par notre unité lorsqu'un agent étiologique viral est suspecté être à l'origine de la TIAC (hors matrices coquillages). Ils pourront également être proposés lors d'une future évolution des méthodes normalisées (e.g. extension à d'autres types de matrices et à d'autres virus).

Mon expérience à l'Anses m'a permis d'acquérir de l'expertise dans le domaine de la virologie alimentaire. C'est pourquoi j'ai souhaité déposer ma candidature en 2018 pour participer au comité d'évaluation des risques biologiques dans les aliments (CES BIORISK). Actuellement membre du CES, je participe à l'évaluation de dossiers et à la rédaction des avis portant sur le risque microbiologique en santé humaine lié à la consommation d'aliments.

Consciente des nouveaux challenges scientifiques à relever dans le domaine de la virologie alimentaire, je propose le programme de recherche décrit ci-après qui me permettra d'envisager des perspectives de collaboration avec des instituts de recherche au niveau national et de plus en plus au niveau européen, mais également des partenaires du secteur privé.

PARTIE II : PROGRAMME DE RECHERCHE

L'impact sanitaire et économique des virus entériques a été pendant longtemps fortement sous-estimé en hygiène alimentaire dans la mesure où l'étiologie virale n'était pas systématiquement recherchée en raison du manque d'outils de détection performants. La norme NF EN ISO 15216 publiée en 2017 constitue une avancée majeure pour identifier l'origine des TIAC et permet d'accumuler des données de prévalence harmonisées. Elle décrit des méthodes applicables pour la détection du VHA et des hNoV (GI et GII) dans des matrices alimentaires spécifiques (e.g. coquillages bivalves, fruits rouges et végétaux et eau embouteillée). Comme la contamination des aliments peut survenir tout au long de la chaîne alimentaire, les matrices impliquées dans les TIAC sont beaucoup plus diverses. Par exemple, des épidémies liées à la consommation de dattes provenant de zones d'endémies pour le VHA (Maroc, Iran) ont été reportées récemment en Europe faisant des dattes une nouvelle matrice alimentaire à risque (<https://en.ssi.dk/news/epi-news/2018/no-11---2018> ;(43)). Les aliments que nous recevons au laboratoire dans le cadre d'investigations de TIAC sont le plus souvent des matrices composites (e.g. salades composées, plats préparés en collectivité, yaourts avec coulis de fruits, gâteaux...). Cela souligne l'importance des travaux à mener pour faire évoluer les méthodes de détection des virus transmis par voie alimentaire.

Une autre difficulté rencontrée en virologie alimentaire est liée au typage des génomes viraux isolés d'échantillons alimentaires. En effet, lorsqu'un échantillon alimentaire est détecté positif pour la présence de génomes viraux, le séquençage par des méthodes classiques est rarement possible en raison de la faible quantité des ARN viraux issus d'aliments. Le développement de méthodes moléculaires pour la détection et le typage (e.g. séquençage nouvelle génération (NGS)) des virus impliqués dans les maladies alimentaires pourrait être un atout lors des investigations de TIAC pour confirmer l'origine virale, lors des études de surveillance pour identifier la source de la contamination des aliments et identifier les voies de transmission. Leur apport pourrait être également évalué pour l'étude de la diversité des souches virales présentes dans différents environnements et pour la surveillance d'éventuelles émergences.

S'il est important de faire évoluer les outils moléculaires, **le développement de méthodes permettant la mise en évidence du caractère infectieux des virus entériques isolés d'aliments est à l'heure actuelle un enjeu scientifique majeur en virologie alimentaire**. Au niveau européen, cet axe de recherche a été identifié comme prioritaire pour les trois virus entériques, les NoV humains, le VHA et le HEV qui constituent actuellement une préoccupation de santé publique importante dans l'Union Européenne (*Price-Hayward M. and Hartnell R., EFSA Journal, 2016*).

Dans les prochaines années, le programme de recherche que je propose s'inscrit dans ce champ thématique en plein essor et mon expérience acquise ces 20 dernières années me permettra de relever ce challenge pour répondre aux demandes des autorités sanitaires en ce qui concerne l'évaluation du risque viral.

Il s'agira plus particulièrement de :

- **Développer une méthode d'analyse cellulaire innovante permettant la mise en évidence du caractère infectieux pour chaque virus d'intérêt en hygiène alimentaire**
- **Evaluer l'apport de ces méthodes cellulaires en virologie alimentaire**

Pour développer une méthode d'analyse cellulaire permettant la mise en évidence du caractère infectieux, il faut disposer d'un modèle cellulaire permissif pour le virus pathogène d'intérêt et d'outils sensibles permettant de détecter les modifications cellulaires qu'il induit dans sa cellule cible. La méthode d'analyse cellulaire en temps réel (Real-Time Cell Analysis (RTCA)) basée sur la mesure de l'impédance cellulaire est à ce jour l'approche la plus prometteuse puisqu'elle permet la mise en évidence d'un effet viral plus précocement que l'observation d'un ECP au microscope optique.

Il s'agira donc à moyen terme, d'évaluer l'utilisation de l'impédance cellulaire comme mesure de l'infectiosité des souches sauvages du VHA, des hNoV et du HEV, et à plus long terme, d'étudier les modifications cellulaires induites par ces virus, afin de mettre en place des outils de diagnostic basés sur l'utilisation de système d'analyse cellulaire (BioSensor) (Figure 18).

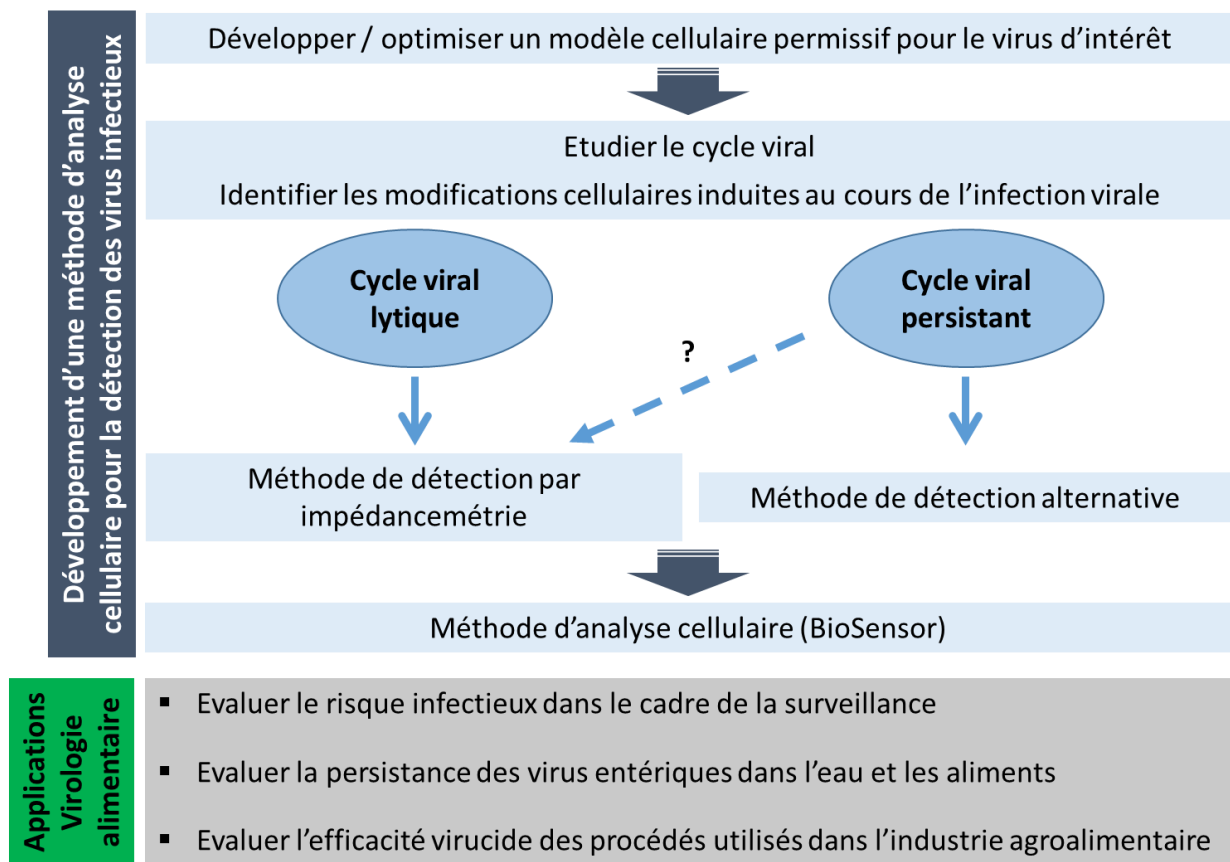


Figure 18. Développement d'outils diagnostics permettant la détection des particules virales infectieuses et leurs applications en virologie alimentaire.

L'apport de ces méthodes cellulaires à la virologie alimentaire sera évalué dans le cadre d'études de prévalence et de persistance des virus entériques soumis à des facteurs environnementaux ou à des traitements d'inactivation.

Les projets de recherche qui seront menés dans les prochaines années sont décrits ci-dessous avec les moyens qui seront mis en œuvre pour leur réalisation. A l'interface entre recherche appliquée et fondamentale, ces études permettront **d'accueillir des étudiants en Master, des doctorants et post-doctorants à moyen et long termes sur le thème des interactions « hôte-pathogène »**.

EVALUATION DU RISQUE LIE A LA TRANSMISSION DU VHA ET DES NOROVIRUS HUMAINS PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Développement d'une méthode d'analyse cellulaire pour la détection des particules infectieuses du VHA et des NoV

Souches sauvages du VHA

Les souches sauvages du VHA induisent *in vitro* une infection persistante. Elles sont difficilement cultivables : elles se répliquent très lentement en culture (libération de nouveaux virions synthétisés dans les cellules FRhK-4 à partir de 30-45 jours pour certains génotypes (données du CNR)) et n'induisent pas d'effet cytopathogène (ECP). Les méthodes conventionnelles utilisées pour la quantification de virus infectieux ne sont donc pas applicables (e.g. par plages de lyse (PFU) et dilutions limites (TCID₅₀)).

L'objectif de ce projet est de développer une méthode d'analyse basée sur l'utilisation des nouvelles technologies de biologie cellulaire pour mesurer le caractère infectieux des souches sauvages du VHA.

Il s'agira à moyen terme d'étudier l'effet du VHA sur la croissance, la morphologie et la viabilité des cellules et à plus long terme de caractériser les voies de signalisation cellulaire à l'origine de l'infection persistante des souches sauvages du VHA.

Les cellules FRhK-4 et une souche sauvage de génotype IA préalablement amplifiée en culture cellulaire (i.e. primo-culture réalisée à partir d'un surnageant de selles données par le CNR VHA) seront utilisés pour ce projet.

Dans un premier temps, nous rechercherons **si l'infection des cellules FRhK-4 par le VHA peut modifier spécifiquement le profil d'impédance**. L'effet viral sur la croissance, la morphologie et la viabilité cellulaires sera recherché en infectant les cellules FRhK-4 en phase stationnaire et/ou en phase exponentielle de croissance. Différents paramètres d'infection (i.e. densité cellulaire, milieux de culture) seront également testés pour établir les conditions optimales pour la réplication *in vitro* des souches sauvages du VHA.

Dans un deuxième temps, des études seront menées pour **identifier les voies de signalisation cellulaire modifiées par les souches sauvages du VHA pour réguler la balance entre la survie et la mort de la cellule hôte**. En effet, l'infection persistante observée *in vitro* pour les souches sauvages pourrait résulter de leur capacité à inhiber la mort cellulaire par apoptose. Pour caractériser les voies de signalisation modulées par le VHA, des approches transcriptomiques et protéomiques pourront être envisagées. Nous utiliserons également les avantages de la technologie xCELLigence (e.g. temps réel et capacité analytique haut-débit) pour cribler des inhibiteurs et identifier les voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'infection persistante du VHA (Figure 19).

Après avoir identifié les voies de signalisation à l'origine de l'infection persistante, deux approches seront évaluées pour développer un outil diagnostique mesurant l'infectiosité des souches sauvages du VHA.

La première approche consistera à mettre en place une stratégie basée sur l'utilisation d'un inhibiteur permettant aux souches sauvages d'induire la mort cellulaire qui sera visualisée par impédancemétrie.

La deuxième approche sera basée sur l'utilisation de marqueurs fluorescents ciblant une voie de signalisation activée par le VHA. Les systèmes d'imagerie cellulaire et d'analyse multiparamétrique haut-débit (HCS, *High Content Screening*) développés ces dernières années permettent d'envisager ce type de projet de recherche à long terme et pourrait être une alternative à la méthode de détection par impédancemétrie pour les infections virales persistantes.

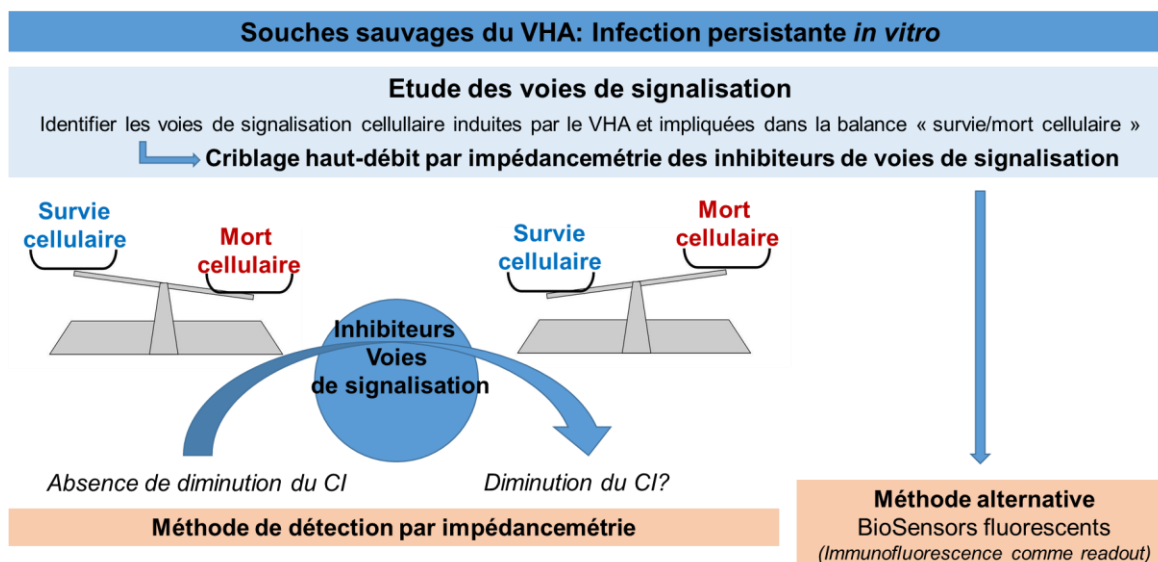


Figure 19 : Développement d'une méthode d'analyse cellulaire basée sur l'utilisation de BioSensors (Impédance cellulaire et/ou marqueurs fluorescents) pour la détection des particules infectieuses des souches sauvages du VHA.

Enfin, l'approche la plus prometteuse sera caractérisée en termes de sensibilité de détection et évaluée pour son utilisation comme méthode de détection qualitative ou quantitative des particules infectieuses du VHA dans les aliments.

Ce projet s'inscrit dans la continuité du **projet CI-VHA (DIM Malinf n°140075)** (collaboration avec le CNR VHA (Hôpital Paul Brousse ; Villejuif)) et du **projet de thèse INFECT-VHA-ASSAY**.

Pour financer ce projet, une collaboration sera initiée avec SANOFI-PASTEUR (Unité R&D Virology et Immunology, Lyon) et le VIB (Unité de recherche Molecular Signaling and Cell Death, Inflammation Research Center (IRC), Gent, Belgique) en 2020.

Pour sa réalisation, nous accueillerons deux étudiants en co-encadrement avec Franck RIQUEL (VIB) et Aure SAULNIER (SANOFI) : Fabien FILAIRE, élève ingénieur en dernière année à l'INSA de Lyon (de février à juillet 2020) et Gwenaëlle Verbrughe en Master 1 (avril-août 2020).

Norovirus

La culture *in vitro* des norovirus humains (hNoV) a été pendant longtemps impossible en raison de l'absence de lignées cellulaires permissives. Les avancées récentes en ce qui concerne la culture des hNoV permettent désormais d'envisager le développement et l'optimisation d'un modèle cellulaire permettant la mise en évidence de leur caractère infectieux. Quelques génotypes (GII.4, GII.3, GII.17 et GI.1) ont récemment été cultivés avec succès en utilisant un des trois modèles cellulaires les plus prometteurs : un modèle d'entéroïdes, la lignée de cellules intestinales humaines Caco-2 et des lignées lymphoïdes B humaines (*i.e.* BJAB et Raji) (44-47). En revanche, aucun de ces modèles cellulaires décrits dans la littérature n'est actuellement applicable en routine dans le domaine de la virologie alimentaire.

L'objectif de ce projet est de développer à moyen terme un modèle *in vitro* permissif pour les hNoV et d'étudier son cycle viral ; et à plus long terme, d'identifier les modifications cellulaires induites au cours de l'infection pour développer une méthode d'analyse cellulaire mesurant l'infectedité des hNoV.

Pour développer un modèle *in vitro*, les conditions de culture des trois modèles cellulaires décrits dans la littérature comme étant permissifs pour les hNoV seront optimisées en réalisant les courbes de croissance cellulaire par impédancemétrie. Le modèle d'entéroïdes, qui présente l'avantage d'être à l'heure actuelle le modèle *in vitro* le plus représentatif de l'épithélium intestinal, sera généré par la différenciation *in vitro* de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Les conditions de culture des iPSC et leur différenciation en entérocytes (*i.e.* culture avec un milieu de croissance complexe en 3-D sur matrigel qui est une mixture gélatineuse protéique similaire aux matrices extracellulaires) pourront être établies avec l'aide de la Plateforme IPS de Nantes. La mesure de l'impédance cellulaire permettra de définir des conditions standardisées pour une meilleure reproductibilité des expériences.

Les modèles cellulaires développés seront évalués pour leur efficacité à répliquer les hNoV. Les infections virales seront réalisées en utilisant des surnageants de selles (stérilisés par filtration) de patients infectés par les hNoV (échantillons cliniques fournis par le CNR des Virus des gastro-entérites). L'infection des cellules sera réalisée en faisant varier la composition du milieu d'infection (e.g. milieu de culture, supplémentation avec des co-facteurs comme des sels biliaires) et le temps d'adsorption du virus. Une cinétique de réplication virale sera établie en quantifiant les génomes viraux présents dans les surnageants de culture au cours de l'infection. L'infection des cellules par les hNoV sera considérée comme productive si la quantité de génomes viraux augmente d'au moins un \log_{10} en comparaison avec la quantité détectée à T0 (i.e. temps correspondant à la fin de la phase d'adsorption virale après 2 lavages du tapis cellulaire pour enlever les virus non adsorbés). Parallèlement, l'apparition d'un ECP sera recherchée au microscope optique.

Le modèle cellulaire permettant la réplication des hNoV sera utilisé pour **étudier les modifications cellulaires** (e.g. changements morphologiques, effet sur la croissance / mort cellulaire, altérations du métabolisme glucidique) induites au cours de l'infection et **les voies de signalisation à l'origine de ces altérations**.

La mesure de l'impédance cellulaire permettra d'évaluer l'effet des hNoV sur la morphologie des cellules, leur croissance et leur viabilité. La capacité d'analyse en temps réel et en haut débit du système xCELLigence sera un atout pour tester de nombreuses conditions d'infection.

Si cette étude ne permet pas de détecter une modification virus-spécifique de l'impédance cellulaire, les voies de signalisation impliquées dans la balance survie / mort de la cellule hôte infectée par le hNoV seront étudiées comme précédemment décrit pour le VHA.

Il sera également intéressant d'étudier l'effet de l'infection sur le métabolisme glucidique qui peut être détourné par un virus pour favoriser sa réplication, comme cela a été montré récemment pour le norovirus murin (48). Afin d'investiguer si le hNoV modifie l'activité métabolique des glucides (glycolyse, glycogénèse), nous mesurerons la prise de glucose (Glucose Uptake-Glo™ Assay ; Promega) dans les cellules et la production intracellulaire de métabolites comme l'ATP (Viral ToxGlo™ Assay ; Promega) et le lactate (Lactate-Glo™ Assay) au cours de l'infection des cellules par le hNoV.

L'étude des altérations cellulaires induites par le hNoV et des voies de signalisation les régissant permettra d'identifier des cibles cellulaires pouvant être utilisées comme marqueurs fluorescents pour la mise en place d'une méthode alternative à l'impédancemétrie pour la détection des hNoV infectieux.

Le norovirus murin (MNV) appartenant également à la famille des *Caliciviridae*, est actuellement utilisé comme virus « modèle » pour évaluer l'efficacité virucide d'une molécule et/ou d'un procédé d'inactivation virale utilisé dans l'industrie alimentaire. Il me paraît donc important de **développer également une méthode de détection par impédancemétrie pour le norovirus murin (MNV)**. La lignée de macrophages (RAW 264.7) sera utilisée pour cette étude puisque nous l'utilisons au laboratoire pour la quantification du MNV-1 par la méthode des dilutions limites (TCID₅₀, *Tissue culture Infective Dose*). Les conditions d'ensemencement des cellules RAW (i.e. densité cellulaire) et d'infection par le MNV-1 (i.e. milieu de culture) seront optimisées pour permettre l'établissement d'une relation linéaire entre la quantité de virus inoculée et le temps auquel apparaît la diminution du CI. Cette méthode de titrage par impédancemétrie, plus rapide et moins fastidieuse que la méthode traditionnelle, sera un atout pour réaliser des études d'inactivation virale en haut-débit grâce au système MP xCELLigence.

Le projet **IMPRaw** portant sur le norovirus murin sera mis en œuvre avec les **ressources propres de l'unité**.

Pour initier le projet portant sur les hNoV, nous envisageons de répondre à l'appel à projet générique de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) à l'automne 2020 (APPG 2021) avec l'unité SG2M de l'IFREMER (Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE), Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), Nantes (Soizick LE GUYADER et Marion DESDOUIT)).

D'autres partenaires pourraient être sollicités (ex. Plate-forme iPSC Nantes – Cellules souches pluripotentes induites (Nantes) (Laurent DAVID)).

Nous pourrions également envisager de faire une demande conjointe pour l'obtention d'un financement Anses-IFREMER d'une bourse doctorale.

2. Apports des méthodes d'analyse cellulaire à la virologie alimentaire

Détection du VHA et des NoV dans l'eau embouteillée, les végétaux et les fruits rouges

Pour appliquer les méthodes d'analyse cellulaire qui seront développées pour mesurer l'infectiosité des souches sauvages du VHA et des hNoV dans l'eau et les aliments, il est indispensable d'adapter le processus analytique. En effet, pour que les échantillons puissent être inoculés sur un modèle cellulaire, la première étape du processus analytique, qui repose sur la récupération des virus depuis la matrice alimentaire, est une étape cruciale et devra être optimisée à partir des protocoles décrits dans la norme NF EN ISO 15216 pour l'eau, les fruits et les végétaux.

L'optimisation de l'étape d'extraction virale se fera pour chaque matrice alimentaire à risque en vérifiant tout d'abord l'absence de cytotoxicité des échantillons d'origine alimentaire, puis en mesurant l'efficacité d'extraction de la souche adaptée HM175/18f du VHA en utilisant la méthode de titrage par impédancemétrie.

Pour la **détection de la souche adaptée du VHA dans de l'eau embouteillée par impédancemétrie**, des résultats préliminaires ont été obtenus dans le cadre du **projet VHA-WaterIMP**. Les particules virales du VHA inoculées dans de l'eau embouteillée ont été concentrées par filtration et éluées des filtres avec du milieu de culture cellulaire. L'infection des cellules FRhK-4 avec ces éluats induit une chute du CI jusqu'à zéro tandis que le CI des cellules inoculées avec des éluats provenant d'eau non contaminée diminue légèrement et reste stable (CI = 3) jusqu'à la fin de l'expérience. En l'absence de cytotoxicité et de contamination bactérienne des cultures cellulaires inoculées avec l'éluat provenant d'eau non contaminée, une étape supplémentaire de stérilisation des éluats par filtration (filtre 0.4 µm) ne s'est pas montrée nécessaire. Les expérimentations seront poursuivies pour valider et caractériser la méthode de détection du VHA dans l'eau par impédancemétrie. Pour déterminer la sensibilité de la méthode de détection, des échantillons d'eau embouteillée seront artificiellement contaminés avec des quantités décroissantes de VHA et la limite de détection (LOD) (correspondant à la plus petite quantité de VHA pouvant être détectée par impédancemétrie) sera recherchée. La méthode développée sera par la suite évaluée pour la détection du VHA dans de l'eau de réseau.

Pour la **détection de la souche adaptée du VHA dans les végétaux et les fruits rouges par impédancemétrie**, les particules virales éluées de la matrice alimentaire à l'aide d'un tampon basique (TGEB) seront précipitées avec le PEG et concentrées par centrifugation. Différents tampons adaptés à la culture cellulaire (DPBS, milieu de culture, Hepes...) seront utilisés pour remettre en suspension les particules virales. Des étapes supplémentaires de clarification des échantillons et de purification des particules virales (par exemple par centrifugation), de même que la stérilisation des échantillons par filtration (filtre 0,22µm) et/ou l'ajout d'antibiotiques, pourront être envisagées en fonction des résultats obtenus lors des études de cytotoxicité des échantillons provenant de matrices non contaminées (*i.e.* observation du tapis cellulaire au microscope ; cinétique de CI). Une fois les études de cytotoxicité réalisées, la détection du VHA par impédancemétrie sera évaluée sur les cellules FRhK-4 infectées avec des échantillons provenant de végétaux ou fruits rouges artificiellement contaminés avec la souche adaptée du VHA. La méthode développée sera caractérisée en termes d'efficacité d'extraction et de sensibilité de détection.

Les méthodes d'extraction des virus à partir des aliments seront par la suite évaluées pour la détection du MNV, mais également des souches sauvages du VHA et des NoV humains dès qu'une méthode d'analyse cellulaire aura été développée.

Les méthodes développées pourront être appliquées comme outil diagnostic de deuxième intention pour évaluer le risque infectieux des échantillons testés positifs lors de l'analyse par RT-qPCR. En permettant d'associer la présence de génomes viraux dans un aliment à un risque infectieux, elles seront d'une aide précieuse pour l'évaluation du risque dans le domaine de la sécurité alimentaire.

Evaluation de la persistance du VHA et des hNov dans les aliments et l'eau

Les méthodes d'analyse cellulaire développées permettront d'apporter des outils adaptés pour évaluer le risque infectieux lors d'études de surveillance et de persistance du VHA et des hNoV dans les aliments et l'eau.

Plusieurs épidémies de TIAC virales liées à la consommation de produits surgelés ont été décrites ces dernières années (49). Par exemple, 1589 cas d'hépatite A liés à la consommation de baies congelées ont été reportés entre janvier 2013 et août 2014 dans 13 pays européens (50). La congélation est l'une des techniques de conservation les plus utilisées pour prolonger la durée de vie des produits alimentaires et permet de faciliter les échanges entre zones géographiques éloignées. L'importation de produits alimentaires provenant de zones d'endémie pour le VHA représente un réel risque pour le consommateur.

S'il est connu que les virus entériques sont résistants au processus de congélation / décongélation (51), aucune étude n'a été réalisée à ce jour pour évaluer l'impact de l'histoire thermique (conditions de congélation, transport et entreposage, conditions de décongélation) des produits surgelés sur leur survie.

L'objectif du projet collaboratif porté par l'IRSTEA (déposé à AAPG (2020) de l'ANR) est d'améliorer les qualités organoleptiques et sanitaires des produits surgelés en étudiant: (i) l'impact de l'histoire thermique (conditions de congélation, transport et entreposage) des produits surgelés sur les qualités texturales et organoleptiques des produits ainsi que sur la viabilité des microorganismes pathogènes (bactéries, parasites et virus); (ii) l'impact du choix du consommateur en terme de méthodes de décongélation. Dans ce projet, nous interviendrons précisément pour évaluer par impédancemétrie la persistance des particules virales infectieuses du VHA (souche adaptée) au cours de la vie du produit congelé.

De nombreuses études publiées montrent également la persistance des génomes viraux dans les eaux usées avant et après leur traitement dans les stations d'épuration, dans les eaux environnementales (rivières, eau de mer) et dans l'eau utilisée pour l'irrigation des cultures maraîchères. Ainsi, divers aliments (mollusques bivalves, fruits et végétaux) peuvent être contaminés par voie hydrique. De plus, la réutilisation des eaux usées constitue un enjeu majeur pour les années à venir puisqu'elle peut répondre en partie à la demande croissante de ressources en eau.

Il serait donc intéressant de proposer des projets collaboratifs visant à adapter les méthodes cellulaires pour la détection du VHA et des hNoV dans les eaux et les aliments crus ou peu transformés. Cela permettrait de répondre à différentes questions portant sur le devenir des virus dans l'environnement et les aliments, ainsi que sur le risque infectieux associé.

Evaluation de l'efficacité virucide de traitements technologiques appliqués dans l'industrie alimentaire pour éliminer le danger viral

Pour contrôler les maladies virales d'origine alimentaire, il est également important de disposer de traitements efficaces permettant d'éliminer le danger viral. La maîtrise de la transmission des virus *via* l'application de procédés technologiques sur les aliments est un défi important pour réduire le fardeau des maladies virales transmises par voie alimentaire (52). L'activité virucide d'un produit dépend de plusieurs paramètres liés au produit utilisé, au virus à éliminer et à la matrice alimentaire.

L'efficacité d'un traitement ne peut être mesurée qu'en utilisant des méthodes de titrage des virus infectieux dans la mesure où le génome viral persiste plus longtemps que le caractère infectieux lorsque le virus est soumis à des facteurs environnementaux (e.g. UV, température) ou à des traitements physico-chimiques (e.g. chlore, peroxyde d'hydrogène, ozone, hautes pressions hydrostatiques (HPP)).

Actuellement, les études d'inactivation virale peuvent être réalisées sur des suspensions virales de la souche adaptée du VHA et du MNV-1 en utilisant les méthodes de titrage conventionnelles (plage de lyse et TCID₅₀). Mais le développement des méthodes de titrage par impédancemétrie pour les souches adaptées permettra de réaliser à court terme des études d'inactivation à plus grande échelle grâce à la capacité analytique haut-débit du système xCELLigence.

Au laboratoire, nous avons initié le projet **ThermIMP** pour évaluer l'utilisation de la méthode de titrage du VHA par impédancemétrie dans le cadre d'une étude d'inactivation thermique. Après traitement des échantillons à différentes températures (37°C, 50°C, 56°C, 65°C, 72°C ou 80°C), les particules infectieuses ont été quantifiées par impédancemétrie à l'aide de la gamme standard établie entre la concentration du VHA et le TCID₅₀. Les cinétiques d'inactivation du VHA obtenues en quantifiant la réduction du titre infectieux par impédancemétrie seront comparées à celles obtenues en quantifiant par la méthode des plages de lyse et les méthodes de titrage génomique (RT-qPCR *versus* EMA-RT-qPCR). La modélisation de ces données permettra de déterminer le meilleur modèle d'inactivation et de calculer les paramètres d'inactivation du VHA en fonction de la température d'incubation et de la méthode de titrage (k , correspondant à la pente d'inactivation ; et D , correspondant au temps nécessaire pour une réduction de 1 log₁₀ du titre viral).

La méthode de titrage par impédancemétrie pourra être utilisée dans le cadre de futurs projets pour évaluer l'efficacité virucide d'autres traitements d'inactivation (hautes pressions hydrostatiques (HPP), peroxyde d'hydrogène, chlore et ozone) vis-à-vis du VHA et du MNV sur des matrices simples mais également sur des matrices alimentaires.

Pour améliorer les systèmes de contrôle appliqués dans l'industrie agroalimentaire afin de mieux maîtriser le risque viral, nous envisageons de soumettre un projet en partenariat avec le Centre technique et d'expertise agroalimentaire (ACTALIA), le LCPME et des industries agroalimentaires. Il s'agira plus précisément (i) de délivrer des méthodes rapides et performantes pour mesurer l'infectiosité des virus entériques dans des produits alimentaires, (ii) d'évaluer les traitements technologiques utilisables par les industries alimentaires en fonction de la matrice alimentaire (*i.e.* l'ozone gazeux pour les fruits rouges, l'eau chlorée pour les végétaux et les fruits rouges, les UV-C pour l'eau, la température élevée et les hautes pressions hydrostatiques pour les purées de fruits) ; et (iii) de délivrer un outil (cocktail de Bactériophages) facile à utiliser dans les industries agro-alimentaires pour valider l'effet virucide de traitements technologiques appliqués aux produits alimentaires à risque. Dans ce projet, nous interviendrons précisément pour évaluer l'efficacité des traitements sur les particules virales infectieuses du VHA et des Nov.

Certains projets seront mis en œuvre avec les **ressources propres de l'unité**, comme le projet **VHA-WaterIMP** et **ThermIMP** qui sont en cours de réalisation. Une analyse statistique est en cours pour le projet **ThermIMP** dont les résultats obtenus ont été récemment valorisés dans des congrès scientifiques (Communications orales 2 et 5).

Deux projets sont actuellement envisagés dans le cadre de projets collaboratifs avec des partenaires publics et privés :

- Projet collaboratif multidisciplinaire porté par l'IRSTEA

Le projet FRISK a fait l'objet d'une réponse à l'appel à projet générique (AAPG) 2020 de l'ANR.

Titre : *"Evaluation of the impact of the cold chain and consumer behaviour on the safety, organoleptic and nutritional qualities of frozen food products."*

Partenariat : ACTALIA, AgroParisTech, Air Liquide, Anses, EA7510 and IRSTEA (Coordinateur :Fatou Toutie NDOYE).

- Projet collaboratif avec ACTALIA, LCPME et différentes industries agroalimentaires

D'autres sources de financement sont recherchés pour soumettre de nouveau ce projet.

Partenariat envisagé: LCPME (UMR 7564: Lorraine University / CNRS, Nancy, France) ; ACTALIA (Saint-Lô, France) ; NESTLE Research (Lausanne, Suisse) ; Florette France (Lessay) ; Aquasource / Suez Affiliate (Paris, France) ; Fruits Rouges & Co (Laon, France)

EVALUATION DU RISQUE LIE A LA TRANSMISSION DU HEV PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Développement d'une méthode de détection du HEV

A l'heure actuelle, plusieurs modèles de culture cellulaire ont été décrits mais le HEV se réplique difficilement *in vitro* (cycle viral long et peu productif) et la présence d'un ECP n'a pas toujours pu être mis en évidence (53).

Deux modèles cellulaires sont actuellement disponibles à l'UMR 1161 Virologie du Laboratoire de Santé Animale de l'Anses. Un modèle de réplication du HEV développé par l'UMR Virologie : les cellules HepaRG qui sont des progéniteurs bipotents dérivées d'un hépatome humain capables de se différencier en cellules biliaires et en hépatocytes (54). Le second modèle est celui développé par Reimar Johne (Accord de Transfert de Matériel avec le BfR, Berlin, Allemagne). Il s'agit de cellules d'origine pulmonaire (lignée A549) infectées de manière persistante par le HEV (A549-N5) (55). Si ces deux modèles cellulaires peuvent produire du HEV, leur infection n'entraîne pas d'ECP apparent. Les modèles cellulaires développés sont donc difficilement applicables en routine pour permettre la mise en évidence de l'infectiosité du HEV provenant d'aliments contaminés.

L'objectif principal de ce projet qui sera réalisé en collaboration avec l'UMR 1161 Virologie est de développer une méthode d'analyse cellulaire permettant de mesurer l'infectiosité du HEV.

Il s'agira plus particulièrement d'**étudier le cycle de réplication du HEV dans les modèles cellulaires sélectionnés** et d'**identifier les modifications cellulaires induites par le HEV**.

Les lignées cellulaires humaines d'origine hépatocytaire (HepaRG) et intestinale (Caco-2) seront utilisées pour ce projet en raison de leur permissivité et du tropisme du HEV. Des travaux préliminaires ont permis de définir des conditions standardisées de culture des cellules HepaRG et Caco-2 pour une meilleure reproductibilité des expériences en établissant leur courbe de croissance par impédancemétrie.

La réplication du HEV sera étudiée en infectant les cellules HepaRG et Caco-2 avec du HEV de génotype 3 provenant de surnageants de cellules infectées (HepaRG infectées par la souche FR-HuHEVF3f : JN906974 ou A549 infectées par la souche adaptée 47832c). Au cours de la cinétique d'infection, la quantité de HEV dans les cellules infectées et dans leur surnageant de culture sera déterminée par RT-qPCR. L'expression de la protéine de capside du HEV dans les cellules infectées sera également mise en évidence par immunoblot et par marquage en immunofluorescence (IF). Afin de réduire le temps nécessaire à la mise en évidence d'une réplication du virus et d'améliorer la sensibilité du modèle, les conditions d'infection seront optimisées en testant différents paramètres (densité cellulaire, état de différenciation, composition des milieux de culture). Au cours de ces expériences d'optimisation, l'apparition d'éventuels ECP sera également recherchée.

Pour évaluer l'effet du HEV sur l'impédance des HepaRG et Caco-2, ces dernières seront infectées avec la même multiplicité d'infection pendant leur phase de croissance ou après différenciation. Un premier criblage a été réalisé et des résultats prometteurs montrant une diminution virus-spécifique du CI des cellules Caco-2 non différenciées ont été obtenus (Travaux de Master 2 de Corine Hoffer, co-encadrement par les deux partenaires). Ces travaux seront poursuivis pour optimiser les conditions d'infection permettant la mise en évidence d'un effet du HEV par impédancemétrie.

Le modèle cellulaire le plus prometteur pour la mise en évidence du caractère infectieux du HEV sera sélectionné pour **développer une méthode de titrage du HEV**. La sensibilité de trois méthodes de détection du HEV sera déterminée en infectant les cellules avec des dilutions sériées d'inoculum viral. Après infection des cellules, les foyers d'infection seront révélés par IF, un ECP sera recherché en microscopie optique et une modification du CI sera mesurée par le système xCELLigence. Chacune de ces 3 méthodes sera évaluée pour son utilisation comme méthode de détection quantitative du HEV (*Focus Forming Assay*, TCID₅₀ ou impédancemétrie).

A plus long terme, nous étudierons l'effet du HEV sur le métabolisme des lipides et des glucides afin d'identifier les modifications induites au cours de l'infection sur l'activité de certains enzymes, la production de métabolites et les voies de signalisation. L'expression de gènes impliqués d'une part dans le métabolisme du cholestérol et de la signalisation des lipoprotéines (RT² Profiler™ PCR Array Human Lipoprotein Signaling & Cholesterol Metabolism, Qiagen) et d'autre part dans le métabolisme glucidique (**Human Glucose Metabolism RT2 Profiler™ PCR Array**, Qiagen) sera étudiée au cours de l'infection des cellules HepaRG et Caco-2. L'effet de l'infection par le HEV sur l'expression de ces différents composants cellulaires sera ensuite validé au niveau protéique par immunoblot.

Nous déterminerons également si la modulation de ces voies métaboliques par le HEV est nécessaire à sa réplication et est dépendante du type de cellules infectées (entérocytes vs hépatocytes).

Cette étude permettra d'identifier de nouvelles cibles cellulaires qui pourront alors être utilisées comme marqueurs d'infection pour développer une méthode alternative pour la détection des particules infectieuses du HEV.

2. Evaluer la méthode de quantification du HEV pour ses applications en virologie alimentaire

L'objectif à long terme sera d'utiliser les méthodes d'analyse cellulaire développées précédemment dans le domaine de la virologie alimentaire. Ces méthodes devront être optimisées pour permettre la détection du HEV dans des échantillons alimentaires et la réalisation d'études d'inactivation.

Optimisation du processus analytique pour la détection du HEV dans l'eau et les aliments

Les méthodes d'extraction du HEV à partir de l'eau et des aliments à risque (foie, figatelles), développées et utilisées en routine dans notre unité pour la quantification du HEV par RT-qPCR, seront adaptées pour permettre l'infection du modèle cellulaire par des échantillons provenant de matrices alimentaires.

Pour la matrice « eau », la méthode ISO 15216 qui repose sur la concentration des particules virales par filtration sera utilisée (26).

Pour la matrice « carnée », la première étape analytique repose sur l'élution et la concentration des particules virales au polyéthylène glycol (PEG) (56). Différents milieux de culture et/ou tampons seront testés pour éluer les virus adsorbés sur les filtres ou pour les remettre en suspension après l'étape au PEG. L'absence de cytotoxicité des extraits issus d'échantillons d'eau et de figatelles non contaminés par le HEV sera évaluée en utilisant le système haut-débit de mesure en temps réel de l'impédance cellulaire.

L'ensemble du processus analytique sera par la suite caractérisé et validé en utilisant des matrices artificiellement contaminées par le HEV. La sensibilité de la méthode de détection du virus infectieux dans l'eau et les matrices carnées sera déterminée après inoculation des échantillons avec des quantités décroissantes de HEV.

Evaluation de la persistance du HEV dans les matrices alimentaires et de l'efficacité virucide de traitements technologiques

Les méthodes développées pour mesurer l'infectiosité du HEV permettront de réaliser des études de surveillance pour évaluer la persistance du HEV dans l'environnement et les aliments afin de mieux caractériser les voies potentielles de transmission du HEV de l'animal à l'homme. Des échantillons environnementaux (ex. effluent) et des saucisses de foie ou figatelles testés positifs pour la présence du génome du HEV par RT-qPCR seront analysés pour la présence de virus infectieux pour valider les méthodes précédemment développées.

Des études pourront être menées pour évaluer la persistance du HEV dans le foie lors de sa conservation à des températures négatives et lors des processus de fabrication des saucisses à base de foie cru de porc (étuvage, fumage, séchage ...). Des études de « survie » du HEV dans le foie et les figatelles pourront également être réalisées à 4°C ce qui correspond à la température recommandée pour leur conservation (*i.e.* jusqu'à 4 jours après décongélation pour les foies ; jusqu'à 1 mois pour les figatelles).

Cette méthode pourra également être utilisée pour évaluer la résistance du HEV vis-à-vis des procédés d'inactivation utilisés dans les élevages ou l'industrie agroalimentaire.

Ce projet permettra de mieux répondre aux objectifs de sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis du risque émergent concernant le HEV.

Ce projet sera réalisé en collaboration avec Nicole PAVIO et Virginie DOCEUL de l'UMR 1161 Virologie (Anses, Laboratoire de Santé Animale, Anses (Maisons-Alfort)).

Il a été initié par Corine HOFFER, étudiante en Master 2 que nous avons accueillie en co-encadrement en 2019. Il est actuellement poursuivi par Célia AIT MOUHOU qui réalise son stage de Master 2 avec nous. Une demande de co-financement pour un contrat doctoral a été réalisé dans le cadre de l'AP Thèse Anses 2020.

Nous avons déposé un projet fin 2019 dans le cadre de l'appel à Manifestation d'Intérêt (AMI) - Transversalités inter-laboratoires (Anses).

CONCLUSION

Les projets de recherche que je souhaite mener dans les prochaines années apporteront **des méthodes d'analyse cellulaire qui seront d'une aide précieuse pour le contrôle des maladies virales d'origine alimentaire**. Proposées dans le cadre de la **surveillance**, les méthodes développées pourront aider les autorités sanitaires en ce qui concerne l'évaluation du risque viral infectieux. La surveillance est une préoccupation de santé publique et représente un enjeu économique important pour les filières de production conchylicoles et légumières considérées comme à risque. La maîtrise de la transmission de ces virus par voie alimentaire repose également sur **l'utilisation d'agents technologiques efficaces** permettant d'éliminer les contaminants viraux sur les aliments **afin de réduire le fardeau des maladies virales transmises par voie alimentaire**. Ainsi, ces projets de recherche permettront **de mieux répondre aux objectifs de sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis du risque viral**.

Certains projets ont pu être initiés grâce aux moyens humains et financiers de l'unité VE, aux étudiants que j'ai encadrés mais également grâce à **l'acquisition des deux appareils de mesure en temps réel de l'impédance cellulaire** (Systèmes DP et MP xCELLigence (ACEA)) financés en partie par la région Ile de France (*DIM-Malinf n°140075 et DIM-Astrea n°170027*). **Consciente que les projets de recherche doivent être financés par le biais de convention**, je me suis engagée depuis ces dernières années dans la réponse aux appels à projets au niveau national (ANR) et européens (EJP). Les méthodes de titrage par impédancemétrie développées pour les souches adaptées du VHA (57) et du rotavirus peuvent d'ores et déjà être appliquées dans le domaine de la virologie alimentaire. Evaluer la persistance de ces virus soumis aux conditions environnementales et/ou aux traitements d'inactivation permettra de mieux surveiller et contrôler les « routes » potentielles de leur transmission. Ces études seront réalisées dans le cadre de projets collaboratifs en réponse à des appels d'offre de type ANR (*par ex.*, Réponse à l'AAPG 2020 en cours) et permettront de pérenniser les partenariats actuels (CNR, ACTALIA, LCPME Nancy, Laboratoire des Eaux de Paris) et d'établir de nouvelles collaborations avec des Instituts publics de recherche (IRSTEA, INRA) et des entreprises agro-alimentaires (*par ex.*, Nestlé Research, Florette France, Aquasource / Suez Affiliate).

Les **études portant sur le cycle infectieux** du HEV, des souches sauvages du VHA et des norovirus humains seront également réalisées dans le cadre de projets collaboratifs avec nos partenaires actuels (CNR, UMR 1161 Virologie (Anses)), mais également avec de nouveaux partenariats (IFREMER, Université de Gent, SANOFI). **A l'interface entre recherche appliquée et fondamentale**, les projets proposés permettront d'ouvrir de nombreuses perspectives de recherche en virologie et **d'accueillir des étudiants en Master, des doctorants et post-doctorants** sur le thème des interactions « hôte-pathogène » et des conséquences physiopathologiques induites par les virus transmis par voie alimentaire. Dans le cadre du projet HEV réalisé en collaboration avec l'UMR 1161 Virologie, les résultats obtenus par Corine HOFFER durant son stage de Master 2 sont très prometteurs. Ces travaux seront poursuivis en 2020 par Célia AIT MOUHOU qui nous accueillera pour son stage en Master 2. Dans ce contexte favorable, un projet de thèse a été déposé conjointement à l'automne 2019 pour obtenir un co-financement Anses-ABIES.

S'il est indispensable de développer des outils innovants de biologie cellulaire pour apprécier le risque infectieux, **il est important de faire évoluer en parallèle les méthodes moléculaires de détection et le typage** (*e.g.* séquençage nouvelle génération (NGS)) des virus impliqués dans les maladies alimentaires. En participant à la coordination de l'ensemble des projets et à l'animation scientifique de l'unité des Virus Entériques avec Sylvie Perelle (Chef de l'UVE), je continuerai de participer aux projets s'inscrivant dans le premier axe de recherche de l'unité VE. Je me suis notamment engagée dans le projet européen EJP METASTAVA (*Coordonné par le SCIENSANO, Belgique*) qui vise à harmoniser et valider les diagnostics basés sur des méthodes de séquençage nouvelle génération (NGS). Il s'intéresse plus particulièrement à l'apport de la métagénomique pour la caractérisation d'agents pathogènes transmis par les aliments, des marqueurs de résistance antibiotique et des pathogènes émergents.

Notre unité a été récemment nommée Laboratoire National de Référence pour la détection des « *virus d'origine alimentaire dans les denrées alimentaires d'origine animale hors coquillages* ». Dans ce contexte, je continuerai de m'investir dans les activités de référence en participant aux validations des méthodes de détection des virus entériques dans les aliments et aux investigations de TIAC suspectées d'origine virale lorsque l'unité VE est sollicitée (en réponse aux tutelles).

En conclusion, je souhaite dans les années à venir garder cet équilibre entre recherche et référence au sein de notre unité, mais également avoir l'opportunité de développer des travaux de recherche dans d'autres domaines scientifiques (santé animale, sécurité alimentaire (risque bactérien, toxique)) bactériologie, virologie animale, étude de toxines...).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance N. 2016. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis* 62 Suppl 2:S96-S105.
2. Perez N, Mory O, Pozzetto B, Garbag-Chenon A, Pillet S, Texier N, Tehard B. 2012. [Impact of Rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization or presenting to emergency room among children less than 5 years in France]. *Pathol Biol (Paris)* 60:275-81.
3. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 62:1136-44.
4. Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N. 1985. Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch Virol* 85:25-34.
5. Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A, Cohen J, Michelangeli F. 1997. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J Gen Virol* 78 (Pt 11):2883-93.
6. Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. 2000. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 28:137-49.
7. Davidson GP, Barnes GL. 1979. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatr Scand* 68:181-6.
8. Halaihel N, Lievin V, Alvarado F, Vasseur M. 2000. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na(+)-solute cotransport activities in young rabbits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G587-96.
9. Brunet JP, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Quero AM, Geniteau-Legendre M, Servin A. 2000. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol* 74:2323-32.
10. Brunet JP, Jourdan N, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Geniteau-Legendre M, Servin A, Quero AM. 2000. Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration. *J Virol* 74:10801-6.
11. Jourdan N, Brunet JP, Sapin C, Blais A, Cotte-Laffitte J, Forestier F, Quero AM, Trugnan G, Servin AL. 1998. Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol* 72:7228-36.
12. Ameen NA, Figueroa Y, Salas PJ. 2001. Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci* 114:563-75.
13. Salas PJ, Rodriguez ML, Viciano AL, Vega-Salas DE, Hauri HP. 1997. The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in epithelial cells. *J Cell Biol* 137:359-75.
14. Baricault L, de Nechaud B, Sapin C, Codogno P, Denoulet P, Trugnan G. 1994. The network organization and the phosphorylation of cytokeratins are concomitantly modified by forskolin in the enterocyte-like differentiated Caco-2 cell line. *J Cell Sci* 107 (Pt 10):2909-18.
15. Liao J, Lowthert LA, Omary MB. 1995. Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8. *Exp Cell Res* 219:348-57.
16. Yeagle PL, Frye J, Eckert BS. 1990. Phosphorylation modulates keratin structure. *Biochemistry* 29:1508-14.
17. Halaihel N, Lievin V, Ball JM, Estes MK, Alvarado F, Vasseur M. 2000. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na(+)-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. *J Virol* 74:9464-70.
18. Boshuizen JA, Rossen JW, Sitaram CK, Kimenai FF, Simons-Oosterhuis Y, Laffeber C, Buller HA, Einerhand AW. 2004. Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin. *J Virol* 78:10045-53.
19. Radtke F, Clevers H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307:1904-9.
20. Saran S, Gopalan S, Krishna TP. 2002. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition* 18:393-6.
21. Vandenplas Y, Salvatore S, Vieira M, Devreker T, Hauser B. 2007. Probiotics in infectious diarrhoea in children: are they indicated? *Eur J Pediatr* 166:1211-8.
22. Blondel B, Colbere-Garapin F, Couderc T, Wirotius A, Guivel-Benhassine F. 2005. Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:25-56.

23. Hino S. 1989. Milk-borne transmission of HTLV-I as a major route in the endemic cycle. *Acta Paediatr Jpn* 31:428-35.
24. EFSA. 2014. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 12 3600.
25. Mathijs E, Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A, Scipioni A, Daube G, Dierick K, Herman L, Van Coillie E, Uyttendaele M, Thiry E. 2012. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food Environ Virol* 4:131-52.
26. 15216-1 NEI. 2017. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.
27. Gallot C, Grout L, Roque-Afonso AM, Couturier E, Carrillo-Santistevé P, Pouey J, Letort MJ, Hoppe S, Capdepon P, Saint-Martin S, De Valk H, Vaillant V. 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerg Infect Dis* 17:566-7.
28. Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 72:3846-55.
29. Donnan EJ, Fielding JE, Gregory JE, Lalor K, Rowe S, Goldsmith P, Antoniou M, Fullerton KE, Knope K, Copland JG, Bowden DS, Tracy SL, Hogg GG, Tan A, Adamopoulos J, Gaston J, Vally H. 2012. A multistate outbreak of hepatitis A associated with semidried tomatoes in Australia, 2009. *Clin Infect Dis* 54:775-81.
30. Costa-Mattioli M, Ferre V, Casane D, Perez-Bercoff R, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, Andre EC, Bressollette-Bodin C, Billaudel S, Cristina J. 2003. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 311:51-9.
31. Liu W, Zhai J, Liu J, Xie Y. 2010. Identification of recombination between subgenotypes IA and IB of hepatitis A virus. *Virus Genes* 40:222-4.
32. Koopmans M, Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 90:23-41.
33. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202:825-34.
34. Purcell RH, Emerson SU. 2010. Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Dis* 202:819-21.
35. Yugo DM, Meng XJ. 2013. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health* 10:4507-33.
36. AFSSA. 2009-SA-0101. AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'avis sur le risque de contamination humaine par le virus de l'hépatite E (VHE) après ingestion de figatelles (saucisses crues à base de foie de porc). Afssa – Saisine n° 2009-SA-0101.
37. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J. 2011. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 17:2309-12.
38. Mansuy JM, Saune K, Rech H, Abravanel F, Mengelle C, S LH, Destruel F, Kamar N, Izopet J. 2015. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Euro Surveill* 20:27-34.
39. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65-71.
40. Charretier C, Saulnier A, Benair L, Armanet C, Bassard I, Daulon S, Bernigaud B, Rodrigues de Sousa E, Gontherier C, Zorn E, Vetter E, Saintpierre C, Riou P, Gaillac D. 2018. Robust real-time cell analysis method for determining viral infectious titers during development of a viral vaccine production process. *J Virol Methods* 252:57-64.
41. Fang Y, Ye P, Wang X, Xu X, Reisen W. 2011. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J Virol Methods* 173:251-8.
42. Tian D, Zhang W, He J, Liu Y, Song Z, Zhou Z, Zheng M, Hu Y. 2012. Novel, real-time cell analysis for measuring viral cytopathogenesis and the efficacy of neutralizing antibodies to the 2009 influenza A (H1N1) virus. *PLoS One* 7:e31965.
43. Gassowski M, Michaelis K, Wenzel JJ, Faber M, Figoni J, Mouna L, Friesema IH, Vennema H, Avellon A, Varela C, Sundqvist L, Lundberg Ederth J, Plunkett J, Balogun K, Ngui SL, Midgley SE, Gillesberg Lassen S, Muller L. 2018. Two concurrent outbreaks of hepatitis A highlight the risk of infection for non-immune travellers to Morocco, January to June 2018. *Euro Surveill* 23.

44. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353:1387-1393.
45. Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, Graves CL, Koopmans M, Wallet SM, Tibbetts SA, Schultz-Cherry S, Wobus CE, Vinje J, Karst SM. 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc* 10:1939-47.
46. Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ. 2018. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro. *PLoS One* 13:e0178157.
47. Straub TM, Hutchison JR, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, Bruckner-Lea CJ. 2013. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Sci Technol* 67:863-8.
48. Passalacqua KD, Lu J, Goodfellow I, Kolawole AO, Arche JR, Maddox RJ, Carnahan KE, O'Riordan MXD, Wobus CE. 2019. Glycolysis Is an Intrinsic Factor for Optimal Replication of a Norovirus. *mBio* 10.
49. Tavoschi L, Severi E, Niskanen T, Boelaert F, Rizzi V, Liebana E, Gomes Dias J, Nichols G, Takkinen J, Coulombier D. 2015. Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: a historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Euro Surveill* 20:21193.
50. Severi E, Verhoef L, Thornton L, Guzman-Herrador BR, Faber M, Sundqvist L, Rimhanen-Finne R, Roque-Afonso AM, Ngui SL, Allerberger F, Baumann-Popczyk A, Muller L, Parmakova K, Alfonsi V, Tavoschi L, Vennema H, Fitzgerald M, Myrmet M, Gertler M, Ederth J, Kontio M, Vanbockstael C, Mandal S, Sadkowska-Todys M, Tosti ME, Schimmer B, J OG, Stene-Johansen K, Wenzel JJ, Jones G, Balogun K, Ciccaglione AR, L OC, Vold L, Takkinen J, Rizzo C. 2015. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Euro Surveill* 20:21192.
51. Butot S, Putallaz T, Sanchez G. 2008. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int J Food Microbiol* 126:30-5.
52. Bozkurt H, Phan-Thien KY, van Ogtrop F, Bell T, McConchie R. 2020. Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis a virus contamination in berries: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* doi:10.1080/10408398.2020.1719383:1-23.
53. Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E. 2019. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Res* 163:34-49.
54. Rogee S, Talbot N, Caperna T, Bouquet J, Barnaud E, Pavio N. 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol* 94:549-58.
55. Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Machnowska P, Sachsenroder J, Nickel P, Hofmann J. 2014. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J Viral Hepat* 21:447-56.
56. Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S. 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *Int J Food Microbiol* 176:1-8.
57. Lebourgeois S, Fraisse A, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S, Martin-Latil S. 2018. Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) Method as a Fast and Accurate Method for Detecting Infectious Particles of the Adapted Strain of Hepatitis A Virus. *Front Cell Infect Microbiol* 8:335.