

Projet de thèse – 2021-2023

(see English version below)

ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LE BOURGEONNEMENT DU VIRUS DE L'HEPATITE E ET LA PROPAGATION DE L'INFECTION DANS LES HEPATOCYTES POLARISES

Établissement : **Université Toulouse III - Paul Sabatier**

École doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Unité de recherche : **CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan**

Directeur de la thèse : **Jacques IZOPET** Codirectrice : **Sabine CHAPUY-REGAUD**

Financement : **ANRS**

Début de la thèse : d'ici le 1^{er} janvier 2021

Date limite de candidature : **15 octobre 2020**



Mots clés

Virus de l'hépatite E (HEV), hépatocyte, polarisation épithéliale, exosome, autophagie, lipides

Profil et compétences recherchées

Culture cellulaire (BSL3), biologie cellulaire, biochimie et biologie moléculaire

Description du projet

Le virus de l'hépatite E (HEV) est la cause la plus fréquente d'hépatites aiguës dans le monde. Les souches infectant l'homme appartiennent à l'espèce *Orthohepevirus A*. Les génotypes 3 et 4 sont notamment responsables d'hépatites chroniques chez la personne immunodéprimée et le génotype 1 d'hépatite fulminante chez la femme enceinte. Le HEV est un virus à ARN simple brin de polarité positive, retrouvé sous forme d'une particule nue dans les selles des patients et le milieu extérieur mais qui quitte la cellule infectée et circule dans le sang sous la forme d'une particule associée aux lipides. Les mécanismes qui conditionnent le bourgeonnement de cette particule, dite quasi-enveloppée, sont encore mal connus. Le bourgeonnement des particules HEV emprunte des éléments de la voie des exosomes ; nos résultats préliminaires indiquent aussi un rôle de l'autophagie dans le cycle du HEV. Nous avons développé un système de culture du HEV sur hépatocytes polarisés en culture qui reproduit les principales caractéristiques physiologiques de l'hépatocyte et permet d'analyser les sécrétions apicale (biliaire) et basolatérale (vasculaire). Nous avons montré que le HEV est sécrété sous une forme quasi-enveloppée aux deux pôles de l'hépatocyte mais que les particules infectieuses sont préférentiellement sécrétées du côté biliaire. Exocytose, autophagie et polarisation épithéliale sont liées par certaines protéines communes. L'objectif du travail de thèse sera d'explorer le rôle de l'autophagie dans le bourgeonnement du HEV en tenant compte de la polarisation de l'hépatocyte.

Ce travail de thèse se déclinera en plusieurs étapes :

(I) Déterminer quelle(s) étape(s) de l'autophagie (est) sont impliquée(s) dans le bourgeonnement du HEV. L'expression de protéines clés de la voie d'autophagie sera éteinte par la transfection de shRNA dans les cellules polarisées et leur effet sera évalué par la quantification de l'ARN HEV intra- et extracellulaire et de l'infectiosité des particules sécrétées. Des analyses de colocalisation des protéines virales ORF2 et ORF3 avec des marqueurs des vésicules impliquées dans l'autophagie et l'exocytose seront réalisées à partir d'images obtenues en microscopie confocale. L'analyse fine de ces colocalisations sera ensuite réalisée par microscopie de super-résolution.

(II) Etudier l'interaction d'ORF2 et de la protéine de l'autophagie LC3B par coimmunoprécipitations et mutagenèse dirigée.

(III) Déterminer si les sites membranaires enrichis en phosphatidylinositol(4,5) biphosphate [PtdIns(4,5)P₂] au pôle apical sont ceux où s'accumulent les protéines ORF2 et ORF3. Les phosphoinositides (PI) font partie des molécules ségréguées lors du processus de polarisation avec un enrichissement en PtdIns(4,5)P₂ au pôle apical et en PtdIns(3,4,5)P₃ au pôle basolatéral. Nous étudierons en outre la distribution de la PI kinase de classe I et de PTEN (PI3P phosphatase), les enzymes qui assurent la transition du PtdIns(4,5)P₂ au PtdIns(3,4,5)P₃ et inversement, ainsi que celle du cholestérol.

(IV) Déterminer la composition des particules virales sécrétées à chaque pôle par des expériences de protéomique et de lipidomique et quantifier les différentes formes de phosphoinositides dans ces particules virales, pour comprendre les différences de densité et d'infectiosité que nous avons observées entre le pôle apical et le pôle basolatéral.

Ce travail permettra de mieux comprendre les voies de sécrétion biliaire et vasculaire que détourne le HEV pour se propager. La détermination d'acteurs clés du cycle viral pourrait ouvrir la voie à la mise en évidence de nouvelles molécules antivirales, agissant sélectivement sur les voies de sécrétion polarisées pour limiter l'infection de l'hôte et la propagation du HEV.

Contexte de l'étude

Le HEV est un virus "quasi-enveloppé" dont le cycle cellulaire est encore incomplètement connu. Nous avons montré sa libération préférentielle au pôle biliaire de l'hépatocyte. Plusieurs protéines de la voie d'exocytose (Tsg101, Rab27a,...) sont impliquées dans le bourgeonnement du HEV. Nos résultats préliminaires sont en faveur d'un rôle de l'autophagie. Nous cherchons à comprendre les mécanismes permettant la libération du HEV de l'hépatocyte et les interactions entre les voies d'exocytose et d'autophagie dans des cellules polarisées.

Méthodes

Culture cellulaire (BSL3), biologie moléculaire, Western-blots, lipidomique, protéomique, imagerie photonique

Le doctorant mettra en œuvre des méthodes existantes au laboratoire (culture cellulaire, biologie moléculaire,...) ou développera de nouvelles méthodes (étude de l'autophagie, imagerie super-

résolution) pour analyser la sortie polarisée et la propagation de l'infection par le HEV dans les hépatocytes.

Résultats attendus

Meilleure compréhension des mécanismes permettant la sortie polarisée du HEV de l'hépatocyte et la propagation de l'infection.

Références

Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., and Dalton, H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17086.

Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K.L., and Lemon, S.M. (2014). Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annual Review of Virology* 1, 539–560.

Chapuy-Regaud, S., Dubois, M., Plisson-Chastang, C., Bonnefois, T., Lhomme, S., Bertrand-Michel, J., You, B., Simoneau, S., Gleizes, P.-E., Flan, B., et al. (2017). Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141, 70–79.

Capelli, N., Marion, O., Dubois, M., Allart, S., Bertrand-Michel, J., Lhomme, S., Abravanel, F., Izopet, J., and Chapuy-Regaud, S. (2019). Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *Journal of Virology* 93, e01207-18.

Xu, J., Camfield, R., and Gorski, S.M. (2018). The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J. Cell. Sci.* 131.

Complément sur le sujet

<http://www.cptp.inserm.fr> (<http://www.cptp.inserm.fr>)

Contact

Sabine Chapuy-Regaud

chapuy-regaud.s@chu-toulouse.fr

Tél. +33 (0) 567 690 431

ROLE OF AUTOPHAGY IN HEPATITIS E VIRUS BUDDING AND INFECTION SPREADING IN POLARIZED HEPATOCYTES

University **Université Toulouse III - Paul Sabatier**

Doctoral school **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spéciality **MICROBIOLOGIE**

Research Center **CPTP - Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan**

PhD Direction **Jacques IZOPET** Codirection **Sabine CHAPUY-REGAUD**

Financial support **ANRS**

Beginning by January 1st 2021

Application deadline **October 15th, 2020**



Keywords

Hepatitis E virus (HEV), hepatocyte, epithelial polarization, exosome, autophagy, lipids

Profile and required skills

Cell culture (BSL3), cell biology, biochemistry and molecular biology

Project description

The hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of acute hepatitis worldwide. HEV strains infecting humans belong to the *Orthohepevirus A* species. Genotypes 3 and 4 are responsible of chronic hepatitis in immunocompromised patients while genotype 1 triggers fulminant hepatitis in pregnant women. HEV is a positive single strand RNA virus, naked in patients' stools and in the environment but leaving the infected cell and circulated in the blood in a lipid-associated (so-called quasienveloped) form. Mechanisms underlying the budding of this quasienveloped form are not fully understand yet. HEV budding hijacks elements of the exocytosis pathway; our preliminary results show that autophagy also plays a role in this process. We developed a system of HEV culture on hepatocytes polarized in culture that mimics the main physiological characteristics of the hepatocyte and allows the analysis of secretions at the apical (bile) and basolateral (blood) sides. We showed that HEV is released from the cell in a quasienveloped form at both sides but that infectious particles are preferentially released to the bile side. Exocytosis, autophagy and polarization are linked by common proteins.

The objective of the PhD student will be to study the role of autophagy in HEV budding in the context of a polarized cell. It will be led in several steps:

(I) The expression of key proteins of the autophagy pathway will be knocked down by transfecting shRNA in polarized cells. Their effect will be evaluated by the quantification of extra- and intracellular HEV RNA and of the infectivity of secreted particles. Colocalisation analyses of the viral proteins ORF2 and ORF3 with markers of vesicles involved in the autophagy and exocytosis pathways will be performed from confocal microscopy images. Then, superresolution microscopy will be used for a finest analysis of these colocalisations.

(II) The student will also analyze the interaction of ORF2 and LC3B by coimmunoprecipitations and directed mutagenesis.

(III) Phosphoinositides (PI) are molecules segregated during the polarization process with an enrichment of phosphatidylinositol(4, 5) diphosphate [PtdIns(4,5) P2] at the apical side and in PtdIns(3, 4, 5) P3 at the basolateral side. We aim to determine if apical membrane sites enriched in PtdIns(4,5)P2 are those where ORF2 and ORF3 accumulate. The student will analyze the distribution of class I PI kinase (PI3K) and PTEN (PI3P phosphatase), enzymes ensuring the transition from PtdIns(4,5)P2 to PI(3, 4, 5)P3 and vice versa. We will also study the distribution of cholesterol.

(IV) In order to further understand the differences in density and infectivity of HEV particles between the apical and basolateral poles, the student will analyze the lipid and protein composition of HEV particles using lipidomics and proteomics and quantify the different forms of phosphoinositides in these particles.

This work will allow a better understanding of the bile and blood secretion pathways that HEV hijacks for its budding. The determination of key actors of the HEV cycle could pave the way for the design of new molecules, selectively targeting polarized release pathways to limit host infection and HEV spreading.

Context

HEV is a quasi-enveloped virus which life cycle is not fully known. We showed its preferential release to the bile pole of the hepatocyte. Several proteins of the exocytosis pathway (Tsg101, Rab27a,...) are involved in HEV budding. Our results suggest a role of autophagy. We aim to understand the mechanisms allowing HEV hepatocyte release and the interplay between exocytosis and autophagy in polarized cells.

Methods

Cell culture (BSL3), molecular biology, Western-blot, lipidomics, proteomics, photon imaging

The student will use existing methods in the laboratory (cell culture, molecular biology,...) or develop new methods (autophagy, superresolution imaging) to analyze the polarized egress and infection spreading of HEV from the hepatocyte.

Expected results

Improved understanding of the mechanisms leading to the polarized egress and infection spreading of HEV from the hepatocyte.

References

- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., and Dalton, H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17086.
- Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K.L., and Lemon, S.M. (2014). Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annual Review of Virology* 1, 539–560.
- Chapuy-Regaud, S., Dubois, M., Plisson-Chastang, C., Bonnefois, T., Lhomme, S., Bertrand-Michel, J., You, B., Simoneau, S., Gleizes, P.-E., Flan, B., et al. (2017). Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141, 70–79.

Capelli, N., Marion, O., Dubois, M., Allart, S., Bertrand-Michel, J., Lhomme, S., Abravanel, F., Izopet, J., and Chapuy-Regaud, S. (2019). Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *Journal of Virology* 93, e01207-18.

Xu, J., Camfield, R., and Gorski, S.M. (2018). The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J. Cell. Sci.* 131.

See also

<http://www.cptp.inserm.fr> (<http://www.cptp.inserm.fr>)

Contact

Sabine Chapuy-Regaud

chapuy-regaud.s@chu-toulouse.fr

Tél. +33 (0) 567 690 431