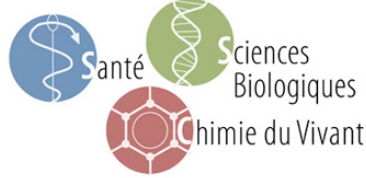




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Pascale Quéré, HDR
Unité : UMR 1282 Infectiologie et Santé publique
Equipe (*si unité multi-équipes*): Equipe Pathologie et Immunologie Aviaires
Filière de rattachement :
Email de l'encadrant : pascale.quere@inra.fr

Co-encadrant (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : Sascha Trapp
(sascha.trapp@inra.fr)

2. Titre de la thèse :

Deciphering the innate immune evasion strategies employed by highly pathogenic avian influenza viruses and their phylogenetic precursors in chicken endothelial cells

3. Résumé :

L'influenza aviaire est une maladie très contagieuse répandue dans le monde entier. L'agent pathogène en cause est un virus influenza de type A classé selon les propriétés antigéniques de ses glycoprotéines d'enveloppe, à savoir hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). Les oiseaux aquatiques (canards) constituent le réservoir sauvage où circulent les sous-types viraux combinant les différentes HA (16 sous-types) et NA (9 sous-types). Les gallinacés domestiques et les mammifères sont infectés occasionnellement par ces virus, ce qui peut permettre l'établissement de nouveaux génotypes viraux. Chez les galliformes, la présence d'un site de clivage par les protéases de l'hôte, mono- ou multi-basique, dans les hémagglutinines définit le caractère faiblement pathogène (virus influenza aviaire faiblement pathogène –VIAFP) et hautement pathogène (virus influenza hautement pathogène –VIAHP) respectivement. Les VIAFP induisent une maladie respiratoire le plus souvent bénigne alors que les VIAHP induisent une maladie systémique fatale.

Les VIAHP manifestent un tropisme endothélial caractéristique de leur pathogénicité. Le dysfonctionnement de l'endothélium se traduit par la perméabilisation de la barrière vasculaire, l'apparition d'œdème, de thrombose, de coagulopathie et un recrutement cellulaire inflammatoire excessif dans les tissus où le virus se réplique. Jusqu'à présent les mécanismes expliquant pourquoi la réplication des IAV dans les cellules endothéliales aviaires est restreinte aux VIAHP sont mal connus.

La thèse d'Adrien Lion (ED SSBCV, 2013-2017 : co-encadrement P. Quéré et S. Trapp) a conduit à la caractérisation de deux nouveaux modèles cellulaires d'endothélium de poulet obtenus dans l'équipe, à savoir culture primaire de cellules d'aorte embryonnaire (pchAEC) et une lignée cellulaire dérivée à partir de ces cellules (chAEC). Ces modèles cellulaires

originaux nous permettent d'étudier la sensibilité des cellules endothéliales de poulet à l'infection par les virus influenza aviaires (VIA), leur capacité à les répliquer et à montrer une réponse innée. Nous avons démontré que la réplication productive des VIA dans les cellules endothéliales (EC) dépend de la présence d'un site de clivage HA multibasique, caractéristique exclusive des VIAHP des sous-types H5 et H7. Au contraire, si tous les VIALP testés sont capables d'initier une réplication dans les cellules endothéliales, seuls certains virus (ce qui inclut un précurseur des virus H7N1 hautement pathogènes) peuvent s'y répliquer de façon productive, et ceci exclusivement en présence de trypsine. Cette adaptation des VIAHP (et de leurs précurseurs) à se répliquer dans les cellules endothéliales aviaires semble résulter d'une capacité à échapper à la réponse innée de l'hôte (atténuation des réponses immunes interféron de type I et cytokines pro-inflammatoires, régulées par le facteur de transcription NF- κ B) (Lion et al, 2018, Virology). Suite à ces travaux, nous posons l'**hypothèse** que l'échappement à la réponse immunitaire innée par suppression de certaines voies de signalisation est le prérequis pour que les VIA puissent se répliquer de façon efficace dans les cellules endothéliales et donc acquièrent un pouvoir pathogène accru chez les galliformes. L'élucidation des mécanismes impliqués ouvrira de nouvelles opportunités pour établir des stratégies de maîtrise des flambées d'influenza chez la volaille domestique (traitement, vaccination, sélection génétique).

L'**objectif du présent projet de thèse** sera donc de décortiquer les facteurs cellulaires et viraux impliqués dans les interactions VIA-cellules endothéliales en comparant VIALP et VIAHP, avec deux questions biologiques :

- Quels sont les voies de signalisation et les facteurs de régulation qui sont activés ou réprimés de façon différentielle dans les cellules endothéliales de poulet selon l'infection par des VIAHP très réplicatifs (et par leurs précurseurs) ou les VIALP non réplicatifs ?
- Quels sont les facteurs viraux (ou motifs moléculaires) responsables de l'échappement des VIAHP (et de leurs précurseurs) à la réponse immunitaire innée ?

(1) Pour identifier les voies de signalisation (et les facteurs de régulation) induites et régulées de façon différentielle par les VIAHP et VIALP chez le poulet, nous allons tirer parti du panel de VIA sauvages et mutants que nous avons étoffé dans l'équipe (H1N1-MZ et H7N1-Tk99 : Trapp et al, 2014, Soubies et al, 2013, Hoffmann et al, 2012, Munier et al, 2010, ou H5N8 2016/2017 : Collaborations établies avec B. Lambrecht, CODA-CERVA et M. Ducatez, INRA UMR1225 IHAP). La réponse à l'infection par ces virus va pouvoir être comparée dans les cellules clé de la pathogénie chez le poulet, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales respiratoires puisque nous disposons d'outils cellulaires uniques (CLEC-213, Esnault et al, 2011, Virus Research ; chAEC, Lion et al, 2018, Virology). Les méthodes envisagées pour mesurer la réponse innée de l'hôte, maîtrisées dans l'équipe ou à développer sont complémentaires: analyse haut-débit du transcriptome (collaboration R. Le Goffic, INRA UR VIM) ; PCR quantitative de l'expression de gènes ciblés et mise au point d'une puce fluidigm (collaboration P. Velge, UMR1282 ISP). La preuve fonctionnelle de l'implication des gènes clé identifiés se fera par invalidation/activation selon la technique CRISP/Cas9 dans les cellules endothéliales chAEC et/ou les cellules épithéliales CLEC213 (collaboration F. Grey, Roslin Institute, UK) et étude de la réplication des VIAHP versus VIALP associé au profil d'expression des gènes de la réponse immunitaire innée.

(2) En parallèle, la génération de différents virus VIALP mutants (H7N1-tk99 mutant avec un site de clivage HA multibasique ; virus mutants H1N1-MZ et H7N1-tk99 avec une permutation de segments, collaboration M. Richard, EMC Rotterdam, Pays-Bas) et l'étude de

leur capacité à répliquer dans les cellules endothéliales chAEC permettra d'identifier des facteurs (ou motifs moléculaires) viraux responsables de la meilleure efficacité de réplication et de l'échappement à la réponse innée.

Le financement de ces travaux sera assuré par le projet européen H2020 VetBioNet (Joint research activities ; Coordinateurs F. Lantier et S. Trapp). Toutes Les expériences seront effectuées dans un confinement L3 (UMR 1282 ISP).

4. Résumé en anglais :

Endotheliotropism is a hallmark of terrestrial poultry infections with highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses and a feature that distinguishes HPAI from low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses. Yet, to date, the detailed mechanisms that dictate the apparent restriction of endothelial cell (EC) permissiveness to HPAI viruses in chickens and other galliform birds are still largely unknown.

Our team has recently demonstrated that productive replication of avian influenza viruses in chicken EC is critically determined by the presence of a multibasic hemagglutinin cleavage site, and is thus an exclusive trait of HPAI viruses. However, we also found evidence for a link between limited (i.e. trypsin-dependent) replication of certain LPAI viruses (incl. a direct HPAI virus precursor), and the viruses' ability to dampen interferon-I and NFKappaB signalling responses in infected chicken EC. Strikingly, this cell response pattern was also detected in HPAI virus-infected chicken EC, suggesting that that the capacity of certain avian influenza viruses to escape the innate antiviral immune response in EC is a prerequisite for efficient (and ultimately productive) viral replication in the vascular endothelium as a herald of increased viral pathogenicity in terrestrial poultry.

Further studies are now needed to identify the cellular and viral factors being critically involved in the LPAI/HPAI virus-EC interplay, and to determine whether the adaptation of LPAI viruses to the hostile antiviral environment in the vascular endothelium of galliform birds might be a mechanism that drives the evolution of HPAI viruses in the field. The PhD project proposed here seeks to identify both the cellular and viral factors that critically determine the outcome of LPAI/HPAI virus infections in chicken EC (robust antiviral response vs. viral innate immune escape). Identifying these factors shall help to devise novel strategies for the prevention and control of HPAI virus outbreaks in terrestrial poultry and to better predict the risk of HPAI virus pathotype evolution in the field.

The proposed work-programme consists of two specific aims:

Specific Aim 1: To identify the principal cellular signalling pathways and regulatory factors that are differentially triggered or repressed in LPAI/HPAI virus-infected chicken EC.

Specific Aim 2: To identify the virus-encoded factors (and/or molecular motifs) permitting efficient innate antiviral immune escape of HPAI (LPAI precursor) viruses in chicken EC.

We will take advantage of our original chicken cellular models (Lion et al, 2018, Virology; Esnault et al, 2011, Virus Research) and a panel of wild/mutant LPAI/HPAI viruses (obtained by the team or through established international collaborations).

The acquired technical competences will be in the following areas:

- Virology; cell biology; immunology

- Molecular techniques (qPCR, qPCR array technology, CRISPR/Cas9 genome editing, luciferase reporter assays); bioinformatics (analysis of transcriptomics data); cell culture; virological techniques (cell culture infection, replication kinetics).
- Experimental works in a BSL3 laboratory

The work-programme outlined above is an integral part of the Joint Research Activities (JRA) in the framework of the H2020 VetBioNet project (2017-22): JRA Task 7.5: Alternative in vitro, ex vivo, and in ovo infection models; JRA Task 8.1: Development of novel transcriptomic analytical tools.