

**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 : Silvestre Anne

Unité : UMR1282 - ISP

Equipe (*si unité multi-équipes*): Apicomplexes et Immunité Mucosale

Filière de rattachement :

Email de l'encadrant : anne.silvestre@inra.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) :

2. Titre de la thèse : Caractérisation de facteurs de virulence parasitaires et de leurs cibles cellulaires dans le modèle aviaire d'infection par *E. tenella*

3. Résumé :

Contexte. Les coccidies (*Toxoplasma*, *Eimeria*) sont des parasites Apicomplexes, intracellulaires obligatoires. *Eimeria tenella*, l'un des agents de la coccidiose aviaire, envahit les cellules épithéliales digestives de l'hôte, en relargant le contenu des rhoptries (ROP), vésicules de sécrétion propres aux Apicomplexes. Les protéines des rhoptries sont impliquées dans le dialogue moléculaire entre le parasite et la cellule hôte. Le répertoire des ROP de *T. gondii* comporte des kinases (ROPK) capables de détourner les fonctions de la cellule en modulant la réponse immunitaire et en bloquant les effecteurs de la cellule hôte. Plusieurs gènes codant pour des ROPK de *T. gondii* ont été invalidés, produisant des souches parasitaires avirulentes.

Données préliminaires. Les données de la protéomique d'*E. tenella* (Oakes *et al.*, 2012) ont permis d'identifier 2 protéines (EtROP1 et EtROP2) parmi les 28 gènes de ROPK prédits dans son génome. Nous avons caractérisé la première ROPK d'*E. tenella* : EtROP1 est une kinase active qui phosphoryle la p53 cellulaire et inhibe l'entrée en apoptose de la cellule parasitée (M. Diallo *et al.*, en révision), favorisant ainsi le développement du parasite. EtROP2 est une kinase active dont les fonctions ne sont pas encore connues.

L'objectif de ce projet est de caractériser EtROP2, la seconde ROPK détectée dans le sporozoïte, le premier stade infectant d'*E. tenella*. Le doctorant devra identifier les partenaires cellulaires de cette ROPK et déterminer son importance fonctionnelle au cours du cycle parasitaire et de la physiopathologie de l'infection.

Les techniques et méthodes mises en œuvre dans ce projet relèvent de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire, de la biochimie, de l'expérimentation animale sur modèle aviaire et de la parasitologie. Dans un premier temps, le doctorant réalisera un test d'activité kinase sur des lysats de cellules épithéliales aviaires, afin de déterminer la taille des protéines cellulaires phosphorylées. Pour cela la kinase recombinante sera produite en système eucaryote et incubée avec des lysats cellulaires. La taille des signaux de phosphorylation fournira une indication pour l'identification des partenaires cellulaires, qui

sera réalisée par une approche de co-immunoprécipitation. Les cellules épithéliales aviaires seront transfectées afin de produire la kinase taguée, puis les protéines cellulaires retenues seront analysées en collaboration avec A. Brionne (URA), en se focalisant sur les tailles des signaux obtenus lors du test d'activité kinase. Les partenaires seront confirmés par un pull-down inverse. Le doctorant étudiera l'importance fonctionnelle de EtROP2 (*in vitro* et *in vivo*) au cours du cycle du cycle parasitaire et de la physiopathologie de l'infection. Des mutants d'expression (KI, souche invalidée) seront générés et la fitness globale de ces souches sera caractérisée. Les modifications cellulaires résultant de la kinase parasitaire seront analysées *in vitro*, après transfection (formes actives et mutées de la kinase) ou infection des cellules épithéliales aviaires (souches sauvages et mutées). *In vivo*, nous isolerons les stades parasitaires intracellulaires et en collaboration avec C. Dieterich et E. Heitlinger (Berlin, Cologne, Allemagne), une analyse transcriptomique à haut débit permettra l'étude exhaustive des modifications des fonctions biologiques de la cellule hôte résultant de l'activité de la kinase parasitaire.

Si les souches parasitaires invalidées sont avirulentes, elles pourraient constituer une première étape vers le développement des souches vaccinales. Si l'invalidation d'EtROP2 est létale (ce qui en ferait une excellente cible pour de nouveaux traitements anticoccidiens), nous envisagerons des alternatives : altérer le profil d'expression de la ROPK, tester des inhibiteurs spécifiques (collaboration avec le laboratoire de chimie organique de l'université de Tours et la start-up associée McSAF qui disposent d'une banque d'inhibiteurs) ou encore produire un KO conditionnel.

4. Résumé en anglais :

Characterization of virulence factors and their cellular targets in the avian model of *Eimeria tenella* infection

Coccidia (*Toxoplasma*, *Eimeria*) are obligate intracellular Apicomplex parasites. *Eimeria tenella*, one of the agents of avian coccidiosis, invades the digestive epithelial cells of the host, releasing the content of rhoptries (ROP), apicomplexan specific secretory organelles. Rhoptry proteins are involved in the molecular dialogue between the parasite and the host cell. The *T. gondii* ROP repertoire includes kinases (ROPKs) capable of hijacking cell functions by modulating the immune response and inhibiting the effectors of the host cell. Several genes encoding *T. gondii* ROPK have been deleted, producing avirulent parasitic strains.

The proteomics data from *E. tenella* (Oakes *et al.*, 2012) identified two proteins (EtROP1 and EtROP2) among the 28 predicted ROPK genes in its genome. We characterized the first *E. tenella* ROPK: EtROP1 is an active kinase that phosphorylates cellular p53 and inhibits the apoptosis of the parasitized cell (M. Diallo *et al.*, in revision), thus promoting parasite development. EtROP2 is an active kinase whose functions are not yet known.

The objective of this project is to characterize EtROP2, the second ROPK detected in the sporozoite, the first infective stage of *E. tenella*. The PhD student will identify the cellular partners of this ROPK and determine its functional importance during the parasite cycle and the physiopathology of the infection.

Techniques and methods implemented in this project are molecular biology, cell biology, biochemistry, animal experimentation on avian model and parasitology. First, the PhD student will perform a kinase activity test on avian epithelial cell lysates to determine the size of the phosphorylated cellular proteins. The recombinant kinase will be produced in eukaryotic system and incubated with cell lysates. The size of the phosphorylation signals will provide an

indication for the identification of cellular partners, which will be performed by a co-immunoprecipitation approach. The avian epithelial cells will be transfected to produce the tagged kinase, and the retained cellular proteins will be analyzed in collaboration with A. Brionne (INRA), focusing on the signal sizes obtained during the kinase activity test. The partners will be confirmed by a reverse pull-down. The PhD student will study the functional importance of EtROP2 (*in vitro* and *in vivo*) during the cycle of the parasite cycle and the physiopathology of the infection. Expression mutants (KI, deleted strain) will be generated and the overall fitness of these strains will be characterized. The cellular changes resulting from the parasite kinase will be analyzed *in vitro*, after transfection (active and mutated forms of the kinase) or infection of the avian epithelial cells (wild type and mutated strains). *In vivo*, we will isolate the intracellular parasitic stages and in collaboration with C. Dieterich and E. Heitlinger (Berlin, Cologne, Germany), a high throughput transcriptomic analysis will allow the exhaustive study of the modifications of the biological functions of the host cell resulting from the activity of the *E. tenella* kinase.

If EtROP2 knockout strains are avirulent, they could be a first step towards the development of vaccine strains. If the EtROP2 knockout is lethal (which would make it an excellent target for new anticoccidial treatments), we will consider alternatives such as, modifying the expression profile of the ROPK, evaluating specific inhibitors (collaboration with the chemistry laboratory from the University of Tours and the start-up McSAF which have a library of inhibitors).