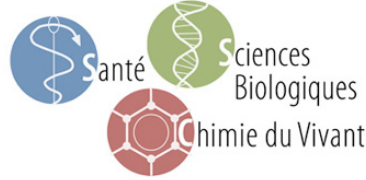




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**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 : Isabelle Virlogeux-Payant

Unité : UMR1282 Infectiologie et Santé Publique

Equipe (si unité multi-équipes): SPVB

Filière de rattachement : B

Email de l'encadrant : isabelle.virlogeux-payant@inra.fr

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

2. Titre de la thèse :

Cellules cibles et conditions d'expression in vivo de l'invasine Rck, un nouveau facteur d'entrée de *Salmonella*

3. Résumé :

Contexte scientifique et données préliminaires

Les salmonelles ont la particularité d'infecter de nombreux hôtes animaux et humain et d'induire en fonction de l'hôte des gastro-entérites, des infections systémiques létales (la typhoïde chez l'homme) ou un portage asymptomatique. L'entrée dans les cellules non phagocytaires de l'hôte est une étape primordiale de l'infection par ce pathogène intracellulaire facultatif. Jusqu'à il y a une dizaine d'années, il était admis que *Salmonella* utilisait un seul facteur d'entrée dans ces cellules, l'appareil de sécrétion de type 3 n°1. Récemment, nos travaux (1) et ceux de Lambert *et al.* (2, 3) ont montré que *Salmonella* pouvait induire sa propre internalisation grâce aux invasines Rck et PagN et que de nouveaux facteurs d'entrée restaient à identifier puisqu'un triple mutant s'avère autant invasif que la souche sauvage dans plusieurs lignées cellulaires ((4) et résultats non publiés). Ces résultats modifient profondément notre vision de l'invasion des cellules par *Salmonella* et soulèvent la question du rôle et de l'utilité de chacun de ces facteurs d'entrée. L'hypothèse que nous émettons est que les salmonelles pourraient utiliser différents facteurs d'entrée dans les cellules en fonction du type cellulaire, de l'origine animale des cellules et/ou de l'environnement rencontré par la bactérie ce qui pourrait avoir un impact sur le devenir de l'infection.

Objectifs du projet

Au cours de ce projet de thèse, nous proposons de mieux caractériser le rôle in vivo de l'invasine Rck. Des résultats préliminaires du laboratoire ont identifié une expression de Rck (Western-blot et RT-PCR) dans l'intestin de souris porteuses asymptomatiques. Sachant que l'opéron *rck* est régulé par le régulateur du quorum sensing SdiA, l'hypothèse primaire de travail est une expression intestinale de Rck.

Programme de recherche

Nous proposons au doctorant 3 tâches :

1) **Etudier, par imagerie sur animal entier, la cinétique d'expression de l'opéron *rck* par *Salmonella Typhimurium*** en modèle murin de portage asymptomatique pour mettre en évidence les organes et les temps d'infection les plus pertinents pour l'expression de Rck dans ce modèle. Cette étude sera réalisée à l'aide de fusions transcriptionnelles entre l'opéron *rck* et l'opéron *luxCDABE* conférant la luminescence lorsqu'il est exprimé.

2) **Identifier les cellules infectées de manière Rck-dépendante** aux sites d'expression et temps post-inoculation d'intérêt identifiés dans la tâche 1. Le/la doctorant(e) comparera les cellules infectées par la souche sauvage et un mutant *rck* après mono- ou co-inoculation des 2 souches fluorescentes. Les cellules infectées seront analysées en cytométrie en flux. La confirmation du type cellulaire infecté et de la présence intracellulaire de *Salmonella* dans ces cellules sera réalisée grâce à un tri cellulaire suivi d'une analyse en microscopie confocale.

3) **Compléter l'étude de l'organisation transcriptionnelle de l'opéron *rck* in vitro** en terminant la caractérisation du mécanisme de répression de cet opéron par H-NS. Cette étude permettra à plus long terme de disséquer les régulations mises en jeu in vivo permettant l'expression d'un facteur d'entrée plutôt que d'un autre. Nous avons montré que cette répression ne s'exerce pas sur les 5 promoteurs de l'opéron déjà identifiés et qu'une région de 300 nucléotides en amont de l'opéron est essentielle à la régulation par H-NS. La/le doctorant(e) devra identifier le transcrit régulé (6^{ème} promoteur de l'opéron) et caractériser le mécanisme sachant qu'une régulation directe par H-NS est suspectée.

Faisabilité

Les approches de génétique bactérienne, de cytométrie en flux, de microscopie confocale et le modèle murin d'étude sont maîtrisés dans l'équipe. L'étude de l'expression de gènes de *Salmonella* en modèle murin grâce à la bioluminescence a déjà été utilisée avec succès (5) et bénéficiera de l'expertise de la Plateforme Imagerie en Infection de l'UMR ISP.

Références : 1- Rosselin et al. (2010) Cell Res 20:647-664 ; 2- Lambert and Smith. (2008) BMC Microbiol 8:142 ; 3- Lambert and Smith. (2009) FEMS Microbiol Lett 297:209-216 ; 4- Rosselin et al. (2011) Microbiology 157:839-847 ; 5- Azriel et al. (2016) Infect Immun 84:375-384

4. Résumé en anglais :

The Rck invasin, a new invasion factor of *Salmonella* : target cells and in vivo expression

Scientific background and preliminary data

Salmonella is able to infect numerous animal hosts and human and to induce a wide range of diseases including self-limiting gastroenteritis, systemic lethal infections (typhoid fever in humans) and asymptomatic carriage. The invasion of non phagocytic cells is an essential step of the *Salmonella* infection cycle and involves several bacterial factors. Until ten years ago, it was accepted that *Salmonella* used a single entry factor in these cells, the type 3 secretion system 1. Recently, our work (1) and that of Lambert *et al.* (2, 3) showed that *Salmonella* could induce its own internalization thanks to the Rck or PagN invasins and that new entry factors remained to be identified since a triple mutant remains as invasive as the wild-type strain in several cell lines ((4) and unpublished results). These results profoundly modify our view of *Salmonella* cell invasion and raise the question of the role and utility of each of these invasion factors. Our hypothesis is that *Salmonella* could use different entry factors in cells depending on the cell type, the animal origin of the cells and the environment encountered by the bacteria, which could have an impact on the outcome of the infection.

Aim of the project

In this project, we propose to better characterize the in vivo role of the Rck invasin. Preliminary results from our laboratory identified Rck expression in the intestine of asymptomatic carrier mice. Since the quorum-sensing regulator SdiA regulates the *rck* operon, the primary working hypothesis is an intestinal expression of Rck.

This program will be developed in three tasks:

- 1) **Study, by whole animal imaging, of the *rck* operon expression kinetics by *Salmonella Typhimurium*** in a mouse model of asymptomatic carrier state to highlight the organs and the most relevant infection times for the expression of Rck in this model. This study will be performed using transcriptional fusions between the *rck* operon and the *luxCDABE* operon conferring luminescence when expressed.
- 2) **Identification of the Rck-dependent infected cells** at the expression sites and post-inoculation times of interest identified in task 1. The PhD student will compare the infected cells by the wild-type strain and a *rck* mutant after mono- or co-inoculation of the 2 fluorescent strains. The infected cells will be analyzed using flow cytometry. Confirmation of the infected cell type(s) and the intracellular presence of *Salmonella* in these cells will be achieved through cell sorting followed by confocal microscopy analysis.
- 3) **Study of the transcriptional organization of the *rck* operon** in vitro by completing the characterization of the mechanism of repression of this operon by H-NS. This study will allow deciphering in the future the regulations involved in vivo allowing the expression of one entry factor rather than another. We have shown that this repression is not exerted on the already identified operon promoters and that a region of 300 nucleotides upstream of the operon is essential for H-NS repression. The PhD student will have to identify the regulated transcript (6th promoter of the operon) and characterize the mechanism. A direct regulation by H-NS is already suspected.

Feasibility

The approaches of bacterial genetics, flow cytometry, confocal microscopy and the murine model of study are mastered in the team. The study of *Salmonella* gene expression in murine model using bioluminescence has already been used successfully (5) and will benefit from the expertise of the Infection Imaging Platform of the UMR ISP.