

**Année 2023-2024 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom du directeur de thèse : **Sonia LAMANDÉ (HDR)**

Co-directeur de thèse (éventuellement) :

Unité, Equipe : **ISP UMR 1282, équipe AIM**

Filière de rattachement : **Infectiologie, Immunologie, Physiopathologie (2IP)**

Email de l'encadrant : **sonia.lamande@inrae.fr ; julie.tottey@inrae.fr**

Co-encadrant éventuel (NB : limité à un seul co-encadrant(e) et à deux en cas de co-direction de thèse) : **Julie TOTTEY**

2. Titre de la thèse : Caractérisation fonctionnelle de cathepsines à cystéine chez le parasite apicomplexe *Cryptosporidium parvum*

3. Mots-clés : *Cryptosporidium parvum* ; parasite apicomplexe ; interactions hôte-pathogène ; facteurs de virulence ; cathepsines à cystéine

4. Résumé :

Cryptosporidium parvum est un parasite apicomplexe responsable de la cryptosporidiose, une maladie zoonotique d'intérêt en santé humaine et vétérinaire. Cette maladie diarrhéique, et les symptômes cliniques qui en résultent, peuvent s'avérer sévères et conduire à la mort dans certains cas, notamment chez les nouveau-nés et les individus immunodéprimés. Les molécules actuellement autorisées pour traiter la cryptosporidiose ne sont pas totalement efficaces car ne permettent pas une clairance totale du parasite, et aucun vaccin n'est disponible. Une meilleure compréhension de la biologie du parasite et des interactions hôte-*Cryptosporidium* est cruciale pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et développer de nouveaux moyens de contrôle.

Les cathepsines à cystéine sont des enzymes protéases catalysant l'hydrolyse de la liaison peptidique d'autres protéines ou peptides substrats. Chez différents modèles de protozoaires, certaines ont pu être associées à des rôles clés liés à la pathogénicité des parasites (ex : invasion des cellules/tissus, hydrolyse de protéines de l'hôte ou du parasite, modulation de la réponse immunitaire), en faisant ainsi des cibles thérapeutiques très intéressantes.

Le génome de *C. parvum* contient cinq gènes codant des cathepsines à cystéines (nommées 'cryptopaines') putatives mais ces dernières n'ont été que très peu étudiées à ce jour. Ce projet de thèse vise à décrire les activités cathepsines qui sont exprimées par le parasite *C. parvum* et à caractériser de manière fonctionnelle le(s) rôle(s) qu'elles jouent dans le cycle parasitaire grâce à des approches biochimiques et moléculaires. Les résultats obtenus permettront d'accroître nos connaissances vis-à-vis de la biologie de *C. parvum* et de caractériser de nouveaux facteurs de virulence parasitaires chez cette espèce.

5. Thématique, Domaine, Objectifs, Contexte, Méthode, Résultats attendus et Références bibliographiques

Thématique/Domaine : Le sujet de thèse s'inscrit dans le domaine de l'infectiologie, plus particulièrement dans l'étude de la biologie d'un agent pathogène et des interactions entre cet agent et son hôte.

Contexte : Les cathepsines à cystéine jouent des rôles clefs chez une grande variété d'organismes, notamment dans la pathogénicité de parasites protozoaires affectant la santé humaine et/ou animale, chez qui elles constituent des facteurs de virulence [1,2]. En outre, des études ont pu montrer que le ciblage de ces cathepsines parasitaires par des inhibiteurs spécifiques ou des approches vaccinales constituait une stratégie thérapeutique prometteuse. Cinq cathepsines à cystéine sont prédites dans le génome du parasite apicomplexe *C. parvum* [3,4] mais leurs fonctions respectives dans le cycle de développement et la pathogénicité de ce parasite ne sont pas connues. Dans ce contexte, et dans le but de mettre en évidence des cibles thérapeutiques pertinentes pour pallier le besoin de nouveaux moyens de contrôle de la cryptosporidiose, le sujet de thèse vise à caractériser cette famille de protéases parasitaires.

Objectifs : Le projet de recherche a pour objectif global de caractériser à la fois biochimiquement et fonctionnellement les cinq cathepsines à cystéine exprimées par *C. parvum*. Le premier objectif sera de déterminer les types d'activité cathepsine exprimées par différents stades parasitaires, ainsi que les structures tridimensionnelles des cinq cryptopaïnes dans le but de mettre en évidence des propriétés communes et/ou spécifiques. Dans un second objectif, la régulation des gènes codant ces cinq protéases au cours du cycle de vie parasitaire sera évaluée en incluant également le gène codant leur inhibiteur endogène putatif [5]. L'implication ou non des cryptopaïnes dans certaines étapes clefs du cycle parasitaire sera également déterminée. Enfin, la localisation subcellulaire ainsi que la fonction biologique d'une cryptopaïne d'intérêt (cryptopaïne-1) seront étudiées au cours de cette thèse.

Méthode : Ce projet de thèse nécessitera tout d'abord des approches biochimiques et transcriptomiques pour décrire respectivement les types d'activité cathepsine (à l'aide de divers inhibiteurs et substrats) et les niveaux de transcription (par RT-qPCR) associés aux gènes codant les cryptopaïnes. L'évaluation de l'implication des cryptopaïnes dans certaines étapes clefs du cycle parasitaire sera réalisée *in vitro* en culture de cellules épithéliales intestinales grâce aux tests d'invasion et de développement parasitaire préalablement développés [6]. Enfin, l'étude fonctionnelle de la cryptopaïne-1 impliquera des analyses de microscopie confocale ainsi que l'évaluation du phénotype de souches parasitaires recombinantes (obtenues par la technique de transgénèse déjà maîtrisée dans le laboratoire [6]) à la fois *in vitro* et *in vivo* dans nos modèles classiques d'étude de la cryptosporidiose.

Résultats attendus : Les nouvelles données acquises permettront d'améliorer notre compréhension du ou des rôle(s) joué(s) par les cathepsines à cystéine chez le parasite *C. parvum* responsable d'une zoonose ayant un fort impact en santé humaine et animale. Le projet de thèse permettra de clarifier l'implication de ces protéases dans le cycle de vie du parasite, d'identifier si elles peuvent constituer des facteurs de virulence clés pour *C. parvum*, et ainsi d'apprécier quel pourrait être leur potentiel en tant que future nouvelle cible thérapeutique.

Références :

- [1] Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall LI, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL, Rosenthal PJ. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Aug 23;12(8):e0006512. doi: 10.1371/journal.pntd.0006512
- [2] Rawat A, Roy M, Jyoti A, Kaushik S, Verma K, Srivastava VK. Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. *Microbiol Res*. 2021 Aug;249:126784. doi: 10.1016/j.micres.2021.126784
- [3] Na BK, Kang JM, Cheun HI, Cho SH, Moon SU, Kim TS, Sohn WM. Cryptopain-1, a cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*, does not require the pro-domain for folding. *Parasitology*. 2009 Feb;136(2):149-57. doi: 10.1017/S0031182008005350
- [4] Ndao M, Nath-Chowdhury M, Sajid M, Marcus V, Mashiyama ST, Sakanari J, Chow E, Mackey Z, Land KM, Jacobson MP, Kalyanaraman C, McKerrow JH, Arrowood MJ, Caffrey CR. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):6063-73. doi: 10.1128/AAC.00734-13
- [5] Kang JM, Ju HL, Yu JR, Sohn WM, Na BK. Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 2012 Jul;139(8):1029-37. doi: 10.1017/S0031182012000297
- [6] Swale C, Bougdour A, Gnahoui-David A, Tottey J, Georgeault S, Laurent F, Palencia A, Hakimi MA. Metal-captured inhibition of pre-mRNA processing activity by CPSF3 controls *Cryptosporidium* infection. *Sci Transl Med*. 2019 Nov 6;11(517):eaax7161. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7161

6. Title, key words and abstract in english :

Functional characterisation of cysteine cathepsins in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum ; apicomplexan parasite ; host-pathogen interactions ; virulence factors ; cysteine cathepsins

Cryptosporidium parvum is an apicomplexan parasite responsible for cryptosporidiosis, a zoonotic disease affecting both human and animal health. This diarrhoeal disease, and its associated clinical symptoms, can be severe and lead to death in some cases, in particular in neonates and immunocompromised individuals. The authorised drugs that are currently used to treat cryptosporidiosis are not completely effective as they do not provide a total clearance of the parasite, and no vaccine is available. A better understanding of the biology of the parasite, and of the host-*Cryptosporidium* interactions, is crucial in order to identify new therapeutic targets and develop new control strategies.

Cysteine cathepsins are proteolytic enzymes that hydrolyse a peptide bond on a substrate protein using the thiol group of a cysteine residue as a nucleophile. Cysteine cathepsins expressed by different protozoan parasites have been shown to play key roles in their associated pathogenesis (e.g. invasion of host cells or tissues, hydrolysis of proteins from the host or from the parasite itself, modulation of the host immune response), making them attractive chemotherapeutic and vaccine targets.

The genome of *C. parvum* harbours five genes encoding putative cysteine cathepsins (also named ‘cryptopains’), but these proteases have only been scarcely studied so far. This PhD project aims at describing the cathepsin activities that are expressed by *C. parvum* and functionally characterising their role(s) in the parasite’s life cycle by means of biochemical and molecular approaches. The expected results will expand our knowledge of the biology of *C. parvum* and identify new virulence factors in this parasite species.

7. Thèses encadrées au cours des 4 dernières années (par l’encadrant et l’éventuel co-encadrant) :

Nom du doctorant : [Mégane FERNANDEZ](#)

Encadrant responsable de la thèse : [Sonia LAMANDÉ](#)

Date de début - date de soutenance : [01/10/2020 - 07/12/2023](#)

Financement de la thèse : [Région Centre-Val de Loire](#)

Publications du doctorant : [1 article en révision ; 1 article en préparation](#)

Brevets :

Devenir du doctorant après la thèse : [Post-doctorat à l’Institut Pasteur de Paris à partir de janvier 2024](#)

Nom du doctorant : [Ambre BAILLOU](#)

Encadrant responsable de la thèse : [Sonia LAMANDÉ](#) et [Fabrice LAURENT](#)

Date de début - date de soutenance : [01/01/2018 - 02/02/2022](#)

Financement de la thèse : [Thèse CIFRE](#)

Publications du doctorant : [1 article publié en 2021 \(doi: 10.3390/vetsci8090170\)](#)
[1 article soumis](#)

Brevets :

Devenir du doctorant après la thèse : [Master 2 en Bio-informatique à l’Université de Rennes](#)

8. Thèses en cours (par l’encadrant et l’éventuel co-encadrant) :

Nom du doctorant :

Encadrant responsable de la thèse :

Date de début - date de soutenance :

Financement de la thèse :

Publications du doctorant :

Brevets :

9. Cinq publications principales ou brevets de l’encadrant (et de l’éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :

[Tottey J](#), [Etienne-Mesmin L](#), [Chalançon S](#), [Sausset S](#), [Denis S](#), [Mazal C](#), [Blavignac C](#), [Sallé G](#), [Laurent F](#), [Blanquet-Diot S](#), [Lacroix-Lamandé S](#). Impact of physicochemical parameters of the human digestive tract on *Cryptosporidium parvum* infection. *en préparation*

[Guesdon W](#), [Pezier T](#), [Menard S](#), [Nicolosi A](#), [Le Vern Y](#), [Silvestre A](#), [Diana J](#), [Laurent F](#), [Lacroix-Lamandé S](#) (2020). *Cryptosporidium parvum* subverts antimicrobial activity of CRAMP by reducing its expression in neonatal mice. *Microorganisms*, 8(11):1635. doi: 10.3390/microorganisms8111635.

Swale C, Bougdour A, Gnahoui-David A, **Tottey J**, Georgeault S, Laurent F, Palencia A, Hakimi MA (2019). Metal-captured inhibition of pre-mRNA processing activity by CPSF3 controls *Cryptosporidium* infection. *Sci Transl Med*, 11 (517), pii: eaax7161, doi: 10.1126/scitranslmed.aax7161

Lacombe A, Maclean AE, Ovcariakova J, **Tottey J**, Mühleip A, Fernandes P, Sheiner L (2019). Identification of the *Toxoplasma gondii* mitochondrial ribosome, and characterisation of a protein essential for mitochondrial translation. *Mol Microbiol*, 112(4), 1235-1252, doi: 10.1111/mmi.14357

Diallo MA, Sausset A, Gnahoui-David A, Ribeiro e Silva A, Brionne A, Le Vern Y, Bussière FI, **Tottey J**, **Lacroix-Lamandé S**, Laurent F, Silvestre A (2019). *Eimeria tenella* ROP kinase EtROP1 induces G0/G1 cell cycle arrest and inhibits host cell apoptosis. *Cell Microbiol*, e13027, doi: 10.1111/cmi.13027

10. Principaux contrats de recherche obtenus par l'encadrant (et l'éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :

AAP Institut Carnot France Futur Elevage - Pasteur Microbes et Santé **2021-2023** ; **S. LACROIX-LAMANDE** & C. WERTS ; TIINEO : « Targeting Innate Immunity during the NEOnatal period as a novel strategy to fight zoonoses »

AAP Incitatif Dép. Santé Animale INRAE **2021** ; **J. TOTTEY** ; DigestCrypto : « Etude de la contribution des paramètres physico-chimiques digestifs humains dans la sensibilité à la cryptosporidiose »

AAP Recherche d'Initiative Académique Région Centre-Val de Loire **2019-2023** ; **S. LACROIX-LAMANDE** ; ANIMALT : « Réduire le nombre d'ANIMaux en recherche : Développement de modèles ALTERNatifs *ex-vivo* »

11. Remarques éventuelles à signaler :

Un **projet ANR PRC** correspondant à cette thématique de recherche a été déposé en octobre 2023 dans le cadre de l'appel à projets générique 2024 : projet CYCAVIR 'Functional characterisation of CYsteine CAthepsins as new VIRulence factors in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*'; Coordinatrice : **Julie TOTTEY**. Ce projet est actuellement en cours d'évaluation.