

**ECOLE DOCTORALE "Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries"**

**UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE**

**Proposition de sujet de thèse à l'appui d'une demande de contrat doctoral 2019-2020**

**Version word sans signature pour le site et version papier signée.**

**Renseignements relatifs à l'Unité de Recherche :**

Nom et appartenance : MERIT-UMR261 (IRD-UPD)

Nom et prénom du Directeur : GARCIA André

Téléphone : 01-53-73-96-22

Courriel : andre.garcia@ird.fr

Signature obligatoire :(et avis éventuel) :

**Renseignements relatifs à l'Equipe d'Accueil (EAD) :**

Nom de l'Equipe d'Accueil : Mère et enfant en milieu tropical

Nom et prénom du responsable : HOUZE Sandrine

Qualité du responsable : PU - PH

Téléphone : 01 40 25 78 97

Courriel : sandrine.houze@aphp.fr

Signature obligatoire:

**Renseignements relatifs au sujet de thèse :**

Nom et prénom du Directeur de thèse (HDR) : HOUZE Sandrine

Qualité : PU - PH

Téléphone : 01 40 25 78 97

Courriel : sandrine.houze@aphp.fr

Signature obligatoire :

Titre du sujet proposé : **Caractérisation de l'adhérence des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* sur des cellules endothéliales de cerveau et mesure de son impact sur la barrière endothéliale.**

Mots clés disciplinaires \* : Biologie cellulaire, Parasitologie, biologie moléculaire

Nombre de thèses encadrées ou co-encadrées : 0

Préciser le secteur disciplinaire (402, 510, 530)\* principal et éventuellement secondaire : 510

Résumé succinct (5 lignes maximum) : La virulence de *Plasmodium falciparum* est liée à ses antigènes variables de surface (VSA) qui présentent une affinité pour divers récepteurs cellulaires. Les VSA majoritaires représentent la famille des PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Ces PfEMP1 sont impliquées dans la physiopathologie des formes graves dont le paludisme cérébral (CM). L'objectif de la thèse sera de caractériser les PfEMP1 : 1/ Quel récepteur est majoritairement impliqué dans l'adhérence des globules rouges parasités ? 2/ Quelle PfEMP1 y est associée et son niveau d'expression ? 3/ Quelles en sont les caractéristiques fonctionnelles ? 4/ Quel en est l'impact sur l'activation endothéliale, la réaction inflammatoire locale et l'apoptose endothéliale ?

Demande dans le cadre d'un projet ANR (donner toutes précisions utiles) : NON

**ECOLE DOCTORALE "Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries"**  
**- UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**Proposition de sujet de thèse à l'appui d'une demande de contrat doctoral 2019-2020**

Nom, prénom du directeur de l'unité de recherche : GARCIA André

Numéro de l'unité de recherche (et établissement de rattachement) : UMR261

Nom, prénom du responsable de l'équipe d'accueil (EAD) : HOUZE Sandrine

Nom, prénom du directeur de thèse : HOUZE Sandrine

**Titre du sujet de thèse proposé : Caractérisation de l'adhérence des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* sur des cellules endothéliales de cerveau et mesure de son impact sur la barrière endothéliale.**

Contenu scientifique du programme de la thèse :

L'accès palustre grave à *P. falciparum* résulte d'un ensemble de mécanismes physiopathologiques interdépendants les uns des autres comprenant la cytoadhérence des globules rouges parasités (GRPs) à la surface des cellules endothéliales, la réaction immunopathologique de l'hôte parasité et l'activation endothéliale aboutissant à une perte d'homéostasie de la barrière endothéliale entraînant sa rupture. La cytoadhérence des GRPs est médiée par une famille d'antigènes parasitaires majeurs (les PfEMP1) exprimés à la surface du GRP. Ces PfEMP1 présentent une grande variabilité de séquences composées d'une succession de domaines DBL (Duffy Binding-like) et CIDR (Cystein InterDomain Region). Nous avons contribué à l'identification d'unités fonctionnelles conservées appelées domain cassette (DC) du neuropaludisme (CM) DC8 (DBL $\alpha$ 2-CIDR $\alpha$ 1.4-8-DBL $\beta$ 12-CIDR $\gamma$ 4/6) et DC13 (DBL $\alpha$ 1.7-CIDR $\alpha$ 1.4)). Les principales interactions décrites lors d'un CM font intervenir les récepteurs endothéliaux ICAM-1 avec DBL $\beta$ 3/5 et EPCR avec CIDR $\alpha$ 1.1-8. Les PfEMP1 exprimés sont en interaction directe avec le système immunitaire de l'hôte infecté. L'interaction anticorps - PfEMP1 aboutit notamment à l'inhibition de la cytoadhérence des GRPs et favorise la clairance parasitaire. Nous avons effectué une approche multi-omique pour identifier les PfEMP1 au niveau des patients présentant soit un CM, soit une forme grave (SM) ou soit une forme simple de paludisme (UM)). En combinant l'approche de séquençage du génome entier et du transcriptome parasitaire, nous avons identifié de nouvelles séquences de PfEMP1 constituant une nouvelle base de données. Notre approche a permis d'identifier de nouveaux peptides en LC-MS / MS associés à de nouvelles séquences PfEMP1 issues de l'analyse des génomes de chaque échantillon parasitaire. Nous avons ainsi identifié 56 PfEMP1 et étudié leur structure. Deux organisations de DC (NTS-DBL $\alpha$ -CIDR $\alpha$ -DBL $\beta$  et NTS-DBL $\alpha$ -CIDR $\alpha$ -DBL $\delta$ ) ressortent principalement. Nous retrouvons davantage l'organisation NTS-DBL $\alpha$ -CIDR $\alpha$ -DBL $\beta$  au sein des PfEMP1 identifiées en LC-MS/MS en comparaison des autres séquences génomiques pour le même groupe d'échantillons, illustrant une sélection préférentielle d'expression d'une PfEMP1 au profil de cette organisation lors de la maturation parasitaire. Le tandem CIDR $\alpha$ -DBL $\beta$  est associé au potentiel de double liaison, ciblant ICAM-1 (par le biais de DBL $\beta$ ) et EPCR (par le biais de CIDR $\alpha$ ). Pour évaluer l'expression de ces protéines, nous disposons de souches parasitaires sélectionnées par leur liaison aux phénotypes HBEC-5i (cellules endothéliales du cerveau humain), ICAM-1 ou CD36 exprimés par la lignée cellulaire CHO. L'analyse multi-omique de ces souches montre des transcrits et des protéines associées à chaque phénotype, mais également des transcrits antigéniques similaires entre les phénotypes de liaison à ICAM-1 et HBEC-5i.

Malgré une meilleure connaissance des PfEMP1, un nombre croissant d'amorces construites pour l'amplification de séquences d'intérêt et l'acquisition croissante de données d'interactome par l'identification de couples ligands PfEMP1/récepteurs de l'hôte, il apparaît crucial d'approfondir le profil transcriptomique et protéique des PfEMP1 responsables d'un CM en lien avec un récepteur donné et de caractériser l'impact de cette séquestration parasitaire sur l'homéostasie de la barrière endothéliale en cours du CM.

Ce sujet de thèse permettra d'évaluer : 1/ Quel récepteur est majoritairement impliqué dans l'adhérence des GRPs ? 2/ Quelle PfEMP1 y est associée et son niveau d'expression ? 3/ Quelles en sont les caractéristiques fonctionnelles ? 4/ Quel en est l'impact sur l'activation endothéliale, la réaction inflammatoire locale et l'apoptose endothéliale ?

Pour répondre à ces questions, différents modèles co-cellulaires seront établis. Chaque lignée cellulaire d'HBEC-5i sera modifiée génétiquement par la méthode de siRNA afin de favoriser l'expression d'un seul récepteur et d'identifier le principal récepteur pour l'adhésion des GRPs. Les études de transcriptomique et protéique des PfEMP1 s'effectueront par la technologie de séquençage long read PacBio® d'une part et par spectrométrie de masse d'autre part. L'obtention de données transcriptomiques sur les gènes *var* transcrits codant pour les PfEMP1 et complémentaires des données accessibles dans différentes bases de données, permettra d'incrémenter ces banques afin d'affiner l'identification des PfEMP1. En ce qui concerne l'étude de l'impact de la cytoadhérence sur la barrière endothéliale, la caractérisation de l'activation endothéliale s'effectuera par des dosages de biomarqueurs, reflet de cette activation : PAI-1, angiopoïétine-2, sICAM-1 et Ag Von Willebrandt et par la quantification des transcrits associés impliqués dans le métabolisme du NO par qRT-PCR. La réponse inflammatoire locale sera évaluée par des dosages de cytokines et de chemokines, et l'apoptose des cellules endothéliales par dosage de biomarqueurs (E-selectine) et transcriptome des gènes de la voie de l'apoptose. L'ensemble de ces données permettra de définir des séquences antigéniques associées spécifiquement à un récepteur donné et à un profil d'activation endothéliale. Ces PfEMP1 représenteraient des cibles vaccinales potentielles très prometteuses contre le CM, qui seront validées par des études immunologiques suivant deux approches : 1/ Génération de domaines protéiques recombinants et production d'anticorps spécifiques pour étudier le rôle de ces domaines dans la cytoadhérence des GRPs, dans l'activation de l'endothélium vasculaire et la capacité inhibitrice des anticorps sur la cytoadhérence. 2/ Détection et quantification d'anticorps spécifiques de ces domaines protéiques chez des groupes de patients (CM, SM ou UM) pour corrélérer la présence et/ou le taux de ces anticorps avec un niveau de protection vis-à-vis du CM.