

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2025

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : **KNAPP**

Prénom : **Jenny**

Section CNU : **67**

Grade : *Ingénieur de Recherche Hospitalier*

HDR : Date de soutenance...**13/11/2024**..... Discipline : ... **Biologie des Populations et Ecologie (CNU 67)**.

l'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : **Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, 3 boulevard A. Fleming, 25030 Besançon Cedex, jknapp@chu-besancon.fr, 0370632106**

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : **UMR Chrono-environnement 6249, Pr Emilie GAUTHIER.**

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : **MILLON**

Prénom : **Laurence**

Section CNU : **45-02**

Grade : **Praticien Hospitalier Professeur des Universités**

HDR : non ; oui Date de soutenance...**11/03/2003**.. Discipline : **Parasitologie-Mycologie**

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : **Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, 3 boulevard A. Fleming, 25030 Besançon Cedex, lmillon@chu-besancon.fr, 0370632353**

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : **UMR Chrono-environnement 6249, Pr Emilie GAUTHIER.**

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

Nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) :

Laboratoire Chrono-environnement UMR6249

Localisation :

UFR Sciences et techniques, UFR Santé

Nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu :

Dr Jenny KNAPP, HDR

Pr Laurence MILLION, HDR

Adresse courriel du contact scientifique :

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

Titre du projet : Génotypage prédictif des atteintes parasitaires à *Echinococcus multilocularis*

Description du projet (2 pages maximum) :

Contexte :

Les zoonoses augmentent leur succès de transmission par la capacité des organismes pathogènes à circuler parmi des communautés écologiques variées, en jouant sur une plasticité génétique importante. Comment le pathogène exploite-il ses ressources génétiques pour se développer chez l'hôte, en l'occurrence chez l'homme, pourvu de défenses immunitaires capable de le contrer ? L'échinococcose alvéolaire (EA) est une maladie rare et négligée mais qui reste cependant létale en cas d'absence de traitement adapté. En France elle est présente de façon plus marquée dans l'Est et le Centre de la France, et particulièrement en Bourgogne-Franche-Comté (>30% des cas recensés en France). De plus, une expansion du foyer historique vers des zones jusqu'alors indemnes est notée ces dernières années.

Cette maladie d'évolution lente est due au développement de la larve du parasite *Echinococcus multilocularis* essentiellement au niveau du foie, mais aussi parfois au niveau d'autres organes (poumon, cerveau, os, ...). La prise en charge est basée sur la chirurgie quand elle est possible, associée à un traitement antiparasitaire (albendazole), qui stoppe l'évolution du parasite sans l'éliminer et par conséquent doit souvent être pris à vie.

Des variations au niveau de certaines séquences de son ADN (polymorphisme génétique) pourraient expliquer que le parasite se développe de façon plus ou moins étendue, au niveau du foie et/ou d'autres organes. Ces lésions entraînent des formes cliniques de gravité différente (métastases possibles), et par la suite, la réponse au traitement antiparasitaire, liée à la viabilité du parasite, peut être plus ou moins efficace.

Nous avons choisi, par une approche NGS (Next Generation Sequencing), de nous intéresser à l'ensemble du génome mitochondrial et un panel de gènes nucléaires candidats, décrits chez *E. multilocularis* ou chez l'espèce proche, *Echinococcus granulosus*, comme pouvant être impliqués dans la diversité des formes cliniques chez l'homme. Ces gènes restent encore peu étudiés chez le parasite, mais des comparaisons inter-espèces, notamment avec des helminthes plus étudiés pourrait permettre d'identifier des gènes orthologues. Ainsi ce projet vise à réaliser un génotypage prédictif, applicable lors du diagnostic du patient, en décrivant du polymorphisme chez des souches du parasite de formes cliniques différentes (formes envahissantes, métastatiques ou extra-hépatiques strictes). Les polymorphismes observés seront également mis en relation avec l'activité parasitaire résiduelle lors du traitement par benzimidazolés (BZM), seul traitement médicamenteux disponible pour cette maladie. Ces molécules ont un effet parasitostatique, et non parasiticide, et la réponse au traitement est variable pour certains patients, pour lesquels le traitement ne permet pas de diminuer la viabilité parasitaire (patients non répondeurs, pour lesquels l'évolution clinique peut être défavorable).

Le polymorphisme de certains gènes nucléaires, codant pour des protéines et des récepteurs impliqués dans les interactions du parasite avec son hôte pourraient être liés à la survenue de formes cliniques particulières, ou à l'évolution de la viabilité parasitaire sous traitement. Son implication dans le développement du parasite pourrait être explorée, notamment pour découvrir de nouvelles voies d'immunothérapie. Parmi eux, on peut citer des gènes codant pour des protéines essentielles à la survie du parasite, ou pour des protéines ayant un rôle dans la modulation du système immunitaire et dans l'orientation de la réponse inflammatoire. Leur identification, puis leur expression et leur abondance

pourrait être explorés par des études sur l'ARN du parasite (RNA-seq) et l'abondance de ces ARN (Reverse transcriptase-digitale droplet PCR, RT-ddPCR).

Dans le génome mitochondrial, le taux de mutation est plus élevé que celui de l'ADN nucléaire. Son étude est particulièrement intéressante chez des organismes peu polymorphes, comme les *Echinococcus* hermaphrodites. Par sa petite taille (14000 pb), l'ADN mitochondrial d'*E. multilocularis* peut être étudié dans son ensemble par séquençage. Une PCR multiplex couplée à un séquençage Illumina a été élaborée au laboratoire Chrono-environnement, pour couvrir le mitogénome du parasite (Bohard et al., 2023, Lallemand et al., 2024). La plupart des mutations rencontrées au niveau mitochondrial n'ont probablement pas de lien avec les formes cliniques observées, mais elles pourraient néanmoins être des indicateurs ou biomarqueurs indirects.

Objectifs :

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'explorer le polymorphisme génétique de souches d'*E. multilocularis* provenant de biopsies ou pièces opératoires de patients atteints de différentes formes cliniques d'échinococcose alvéolaire (EA), et avec différents types d'évolution sous traitement antiparasitaire. Ce polymorphisme sera étudié sur l'ensemble du mitogénome et sur un panel de gènes nucléaires par une approche NGS, Illumina et Nanopore, de souches d'*E. multilocularis* et *E. granulosus* déjà collectées (biothèque du Centre National de Référence des Echinococcoses, CNR-Echinococcoses, CHU de Besançon) et des souches collectées en prospectif (2 ans de recrutement au CHU de Besançon et dans le réseau FrancEchino). L'expression de ces gènes ciblés pourra être étudiée par une approche RNA-seq et RT-ddPCR sur des souches cliniques.

Les objectifs secondaires seront la confrontation du polymorphisme génétique identifié avec 1) d'autres espèces d'helminthes (recherche de gènes orthologues), notamment avec *E. granulosus*, 2) de comparer les données génétiques ADN et ARN aux formes cliniques observées chez les patients français (registre FrancEchino, CNR-Echinococcoses) et 3) de comparer ces données à l'évolution clinique du patient sous traitement (répondeurs/non-répondeurs au traitement par benzimidazolés, groupes HLA, données immunologiques, etc.), afin d'émettre des pronostics sur les suites de la maladie chez le patient diagnostiqué avec une EA.

Retombées attendues :

La finalité de ce projet est d'améliorer la prise en charge des patients par la mise en évidence d'indicateurs biologiques prédictifs de l'évolution de la maladie. Le projet vise à la détection de génotypes particuliers chez le parasite *E. multilocularis*, notamment ceux associés à des formes cliniques atypiques ou encore à une évolution favorable ou défavorable sous traitement. L'étude de la diversité génétique du parasite par une exploration large de son génome permettra d'apporter de meilleures connaissances quant au rôle du polymorphisme dans la virulence de certaines souches circulant chez les patients EA.

Partenaires :

La Thèse sera réalisée au laboratoire Chrono-environnement UMR 6249, à UFR Sciences et Techniques et l'UFR Santé, sous la direction du Docteur Jenny Knapp, avec la co-direction du Pr Laurence Millon en collaboration avec le CNR des Echinococcoses, le service Informatique du CHU de Besançon, les services cliniques d'hépatogastro-entérologie, de chirurgie du CHU de Besançon et des hôpitaux du réseau FrancEchino, les plateformes de

Microbiologie Mutualisée / P2M (Institut Pasteur) et d'analyse Bio-Informatique 2B2S (UFR Santé, UFC, Besançon).

Coordination du projet (J. Knapp), encadrement de thèse (JK, LM), collecte des échantillons (JK et collaborateurs), analyses de biologie moléculaire (JK et collaborateurs), analyses de bio-informatiques (JK et collaborateurs), UMR 6249 Laboratoire CE, UFC, CNR-Echinococcoses, CHRU de Besançon (F).

Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

- Budget prévisionnel :

- Allocation de thèse (120 000€ pour 3 ans)
- Analyse de biologie moléculaire (mise au point (3000€), NGS (12 000€))
- Analyse bio-informatique (3000€)
- Frais de publication/communication (5000€)
- Frais déplacement pour congrès international (2000€)

(Total = 145,000€)

- Budget acquis : 10,000€ (CNR Echinococcoses)

- Demandes en cours :

Demande HARMI Transbio projet « DigiPath » par Laboratoire Chrono-environnement UMR6249 (50 000€) pour l'acquisition d'un appareil de PCR digitale (ddPCR).

Connaissances et compétences requises :

Le candidat devra avoir une expérience en biologie moléculaire en bioinformatique et des notions en écologie, immunologie, pharmacologie, médecine interne. Des aptitudes au travail en équipe, à la prise d'initiative et au travail en autonomie sont requis.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

(F) Les zoonoses augmentent leur succès de transmission par la capacité des organismes pathogènes à circuler parmi des communautés écologiques variées, en jouant sur une plasticité génétique importante. L'échinococcose alvéolaire est une parasitose due au développement de la larve du parasite *Echinococcus multilocularis*, principalement dans le foie mais potentiellement dans tous les organes. L'hôte naturel est un micromammifère, qui par des relations proie-prédateur transmet le parasite à un carnivore afin de perpétuer son cycle de vie. L'homme fait partie de ce cycle mais est une impasse parasitaire. La maladie peut prendre diverses formes cliniques, d'évolution plus ou moins rapide (foyer unique hépatique, atteintes de voisinage, dispersion métastatique ou extra-hépatique stricte), et peut alors conduire à un important retard au diagnostic, dans un contexte de maladie rare, encore souvent négligée. Le seul traitement médical parasitostatique permet de limiter le développement du parasite, mais ne le tue pas. L'objectif de ce projet de thèse sera la mise en évidence de marqueurs moléculaires prédictifs de l'évolution de la maladie. (i) La diversité génétique du parasite sera explorée par une approche NGS Illumina et Nanopore à partir de souches cliniques et d'étudier l'expression de gènes cibles, impliqués dans le développement du parasite, par des approches RNA-seq et RT-ddPCR. (ii) Les gènes encore mal décrits chez *E. multilocularis* seront recherchés et identifiés par comparaison avec des organismes proches, notamment *E. granulosus*. (iii) Pour terminer, la comparaison entre les données génétiques et cliniques (forme clinique au diagnostic, et évolution sous traitement antiparasitaire) sera alors réalisée, afin de proposer un génotypage prédictif aux patients EA.

(E) Zoonoses increase their transmission success through the ability of pathogenic organisms to circulate among varied ecological communities, by playing on significant genetic plasticity. Alveolar echinococcosis is a parasitosis caused by the development of the larva of the parasite *Echinococcus multilocularis*, mainly in the liver but potentially in all organs. The natural host is a small mammal, which, through a prey-predator relationship, transmits the parasite to a carnivore in order to perpetuate its life cycle. Man is part of this cycle, but is a parasitic dead end. The disease can take a variety of clinical forms, with more or less rapid evolution (single hepatic focus, neighborhood involvement, metastatic or strict extra-hepatic location), and can therefore lead to a significant delay in diagnosis, in a context of a rare disease that is still often neglected. The only medical treatment is parasitostatic, which limits the development of the parasite but does not kill it. The aim of this thesis project is to identify molecular markers predictive of disease progression. (i) In order to explore the genetic diversity of the parasite, an NGS approach Illumina and Nanopore will be performed from clinical strains and the study of target genes expression, involved in the development of the parasite, using RNA-seq and RT-ddPCR approaches. (ii) Genes not yet described in *E. multilocularis* will be researched and identified by comparison with closely related organisms, notably *E. granulosus*. (iii) Finally, these genetic data will be compared with clinical data (clinical form at diagnosis and evolution under antiparasitic treatment) to propose predictive genotyping for AE patients.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

- X Biologie
- X Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : *Echinococcus multilocularis*, échinococcose alvéolaire, polymorphisme génétique, génotypage prédictif.