

PROPOSITION D'UN PROJET DE THÈSE A L'ÉCOLE DOCTORALE « Écologie, Géosciences, Agronomie, ALimentation »

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Titre de la thèse : Séquençage des répertoires en anticorps du porc : identification de séquences CDR3 marqueurs et obtention de séquences complètes d'anticorps. Application aux virus du complexe respiratoire porcine et aux pestivirus porcins
Acronyme : SeqAPorc
Champ disciplinaire 1 : Alimentation Champ disciplinaire 2 : Choisissez un élément.
Trois mots-clés : anticorps – diversité - infections virales
Unité d'accueil : Génétique Virale et Biosécurité (GVB) – ANSES Ploufragan
Nom, prénom du directeur de thèse (HDR indispensable): Daniel DORY Adresse mail : daniel.dory@anses.fr Nom, prénom du co-directeur (le cas échéant) (HDR indispensable): John Hammond Adresse mail : john.hammond@pirbright.ac.uk
Financement (origine et montant) : Acquis, Anses (48 k€) – Saint-Brieuc Armor Agglomération (24 k€) – Conseil Départemental des Côtes d'Armor (24 k€)
Contact(s) (adresse postale) : ANSES, 41 rue de Beaucemaine, 22440 Ploufragan
Mode de recrutement Le mode de recrutement du doctorant dépend de la nature du financement du projet de thèse. Pour identifier le mode de recrutement, veuillez consulter le site web de l'ED EGAAL - cliquez ici . Le projet de thèse ne sera pas publié si cette information est manquante. <input type="checkbox"/> Concours <input checked="" type="checkbox"/> Entretien <input type="checkbox"/> Autre (précisez) :

**Toutes les rubriques de ce document doivent être remplies.
Une fois complété, merci d'enregistrer ce document au format pdf avec le nom suivant :
Nom du Directeur thèse_Unité_Acronyme du sujet_FR.pdf**

DESCRIPTION SCIENTIFIQUE DU PROJET DE THÈSE

Contexte socio-économique et scientifique : (10 lignes)

En Bretagne, il y a plus 1100 exploitations porcines, des grands abattoirs et des coopératives ou groupements d'éleveurs. La production de viande porcine représente donc un des piliers de l'économie locale qui fait vivre directement et indirectement des milliers de personnes. Les enjeux de la santé des élevages porcins sont variés et vont du bien-être animale à la prévention des risques économiques associés aux maladies des animaux. Pour préserver cette santé animale, il est indispensable de se doter de nouveaux outils à la fois de diagnostic des maladies infectieuses et d'identification de nouveaux vaccins potentiels. La stratégie qui sera suivie ici est basée sur l'analyse des répertoires en anticorps des porcs. Ces répertoires reflètent en effet le vécu infectieux des animaux et la réponse naturelle de l'animal mise en place pour combattre ces pathogènes. Par ailleurs, la technologie qui sera développée ici est une technologie universelle applicable potentiellement à d'autres espèces animales de rente (par exemple les bovins et les volailles).

Hypothèses et questions scientifiques (8 lignes)

Le répertoire en anticorps représente l'ensemble des anticorps codés par un individu contre des épitopes immunogènes d'origines diverses : infectieuses, vaccinales ou allergiques. L'ensemble des anticorps est donc fonction du vécu de cet individu vis-à-vis des immunogènes. Ce répertoire reflète aussi la réponse protectrice naturelle de l'individu vis-à-vis des pathogènes. Un des points particuliers à prendre en compte ici est le mécanisme de maturation des anticorps chez le porc qui est basé sur des taux importants de mutation hypersomatiques. Les outils d'analyse des répertoires devront être adaptés à ce phénomène. L'analyse des répertoires en anticorps chez les porcs infectés par certains virus d'intérêt à l'ANSES devrait permettre (1) de disposer de nouveaux outils diagnostics (signature anticorps) et (2) devrait servir de base au développement de nouveaux vaccins.

Principales étapes de la thèse et démarche (10-12 lignes)

1. Collecte et préparation des échantillons de répertoires en anticorps porcins

Des prélèvements sanguins de porc serviront à préparer ces répertoires en anticorps. Ils seront réalisés à partir de porcs infectés par un virus du complexe respiratoire porcin ou des pestivirus. A ce niveau, ces prélèvements correspondent à des cellules (lymphocytes B). Pour chaque prélèvement, ces cellules seront lysées pour extraire l'ARN et congelées jusqu'au séquençage.

2. Séquençage haut-débit et analyse des répertoires B porcins à partir des différents prélèvements

Les ARN codant les anticorps seront préparés pour le séquençage haut-débit et séquencés. Puis les séquences des anticorps seront analysées. Dans un premier temps l'analyse ne se focalisera que sur un site particulier des anticorps, le site CDR3, qui concentre la partie la plus variable de chaque anticorps. Rappelons ici que ces anticorps ont été ajustés par le système immunitaire de l'animal infecté pour qu'ils puissent être le plus efficaces possible dans la lutte contre ce pathogène. Ces anticorps sont en fait le produit de recombinaisons de gènes et de mutations hypersomatiques. Il est donc indispensable d'utiliser des outils d'analyse de séquences d'anticorps qui prennent en compte tous ces phénomènes pour rechercher des anticorps retrouvés chez plusieurs individus (= anticorps dits publics).

3. Séquençage complet d'un anticorps d'intérêt et production d'un anticorps de synthèse

Il s'agira dans un dernier temps de réaliser du séquençage appelé « cellule unique » sur un ou quelques échantillons qui ont présenté un intérêt dans l'étape 2. Ce séquençage sera complet car il permettra d'obtenir la séquence complète de l'anticorps d'intérêt, pour lequel une signature immunologique plus haut. La séquence de cet anticorps pourra par la suite permettre de générer un anticorps de synthèse pour rechercher l'antigène contre lequel il est dirigé. Ceci ouvrira de nouvelles perspectives pour le développement de nouveaux vaccins, en se basant sur la réponse naturelle de l'animal vis-à-vis de ce pathogène.

Approches méthodologiques et techniques envisagées (4-6 lignes)

- Préparation des cellules sanguines pour l'analyse des répertoires en anticorps : isolement des PBMC, stimulation in vitro, lyse des cellules et extractions de l'ARN.
- RT-PCR, préparation de bibliothèques pour le séquençage NGS
- Interactions avec la plateforme NGS et les bioinformaticiens
- Analyse bioinformatique des répertoires en anticorps
- Préparation des cellules pour l'analyse transcriptomique single cell
- Production d'un anticorps de synthèse

Compétences scientifiques et techniques requises pour le candidat

Le candidat devra être familier avec ou avoir de l'appétence pour quelques techniques d'immunologie, en particulier l'isolement et la culture des lymphocytes, des techniques de biologie moléculaire (e.g. extraction d'ARN ou d'ADN des lymphocytes, PCR, séquençage nucléique). Il sera aussi amené à collaborer avec l'équipe de séquençage haut-débit et l'équipe de bioinformatique. Il devra aussi avoir des notions de virologie. Enfin la maîtrise de l'Anglais est importante pour pouvoir bien collaborer avec nos collègues de Pirbright et suivre la co-direction donnée par cette équipe. Il sera amené à se rendre ponctuellement en Angleterre.

ENCADREMENT DE LA THÈSE¹

Nom de l'unité d'accueil : ANSES Ploufragan – Plouzané - Niort	Nom de l'équipe d'accueil : Génétique Virale et Biosécurité
Nom du directeur de l'unité : Nicolas Etterradossi	Nom du responsable de l'équipe : Yannick Blanchard
Coordonnées du directeur de l'unité : 41 rue de Beaucemaine 22440 Ploufragan nicolas.etterradossi@anses.fr 02 69 01 62 22 (standard) 02 96 01 62 89 (ligne directe)	Coordonnées du responsable de l'équipe : 41 rue de Beaucemaine 22440 Ploufragan yannick.blanchard@anses.fr 02 96 01 62 97
Directeur de thèse Nom, prénom : Daniel Dory Fonction : Scientifique Date d'obtention de l'HDR : 2 février 2010 Employeur : ANSES Taux d'encadrement doctoral dans le présent sujet : 50% Taux d'encadrement doctoral en cours (directions et co-directions) (%) : 100 % Nombre de directions/co-directions de thèse en cours : 2	

¹ Dans l'ED EGAAL, si 1 scientifique dans la direction de la thèse = 100% d'encadrement doctoral ; si 2 personnes impliquées dans la direction de la thèse = entre 50% et 70% d'encadrement doctoral pour l'HDR directeur ; si 3 personnes impliquées dans l'encadrement de la thèse : répartition :40% - 30% - 30% de l'encadrement doctoral.

Co-directeur (le cas échéant)

Nom, prénom :

Fonction :

Date d'obtention de l'HDR :

Employeur :

École doctorale de rattachement :

Taux d'encadrement doctoral dans le présent projet : 50

Taux d'encadrement doctoral en cours (directions/co-directions/co-encadrements) (%) :

Nombre de directions/co-directions/co-encadrements de thèse en cours :

Co-encadrant de thèse 1 (le cas échéant)

Nom, prénom :

Fonction :

Titulaire de l'HDR : oui non Si oui, date d'obtention de l'HDR :

Employeur :

École doctorale de rattachement :

Taux d'encadrement doctoral dans le présent projet :

Taux d'encadrement doctoral en cours (directions/co-directions/co-encadrements) (%) :

Nombre de directions/co-directions/co-encadrements de thèse en cours :

Co-encadrant de thèse 2 (le cas échéant)

Nom, prénom :

Fonction :

Titulaire de l'HDR : oui non Si oui, date d'obtention de l'HDR :

Employeur :

École doctorale de rattachement :

Taux d'encadrement doctoral dans le présent projet :

Taux d'encadrement doctoral en cours (directions/co-directions/co-encadrements) (%) :

Nombre de directions/co-directions/co-encadrements de thèse en cours :

Partenaire privé (si financement CIFRE, privé,...)

Nom, prénom :

Fonction :

Entreprise :

Taux d'encadrement doctoral dans le présent projet :

Taux d'encadrement doctoral en cours (directions/co-directions/co-encadrements) (%) :

Nombre de directions/co-directions/co-encadrements de thèse en cours : 1

Partenaire international (si thèse en co-tutelle)

Nom, prénom : Hammond, John

Fonction : Professeur

Employeur : Institut Pirbright, UK

Taux d'encadrement doctoral dans le présent projet : 50 %

Taux d'encadrement doctoral en cours (directions/co-directions/co-encadrements) (%) :

Nombre de directions/co-directions/co-encadrements de thèse en cours :

Devenir des anciens doctorants du directeur et co-directeur(s)/co-encadrant(s) de thèse (depuis 5 ans)

Compléter les informations suivantes pour chaque ancien doctorant

Nom, prénom : Meunier Marine

Date de début et de fin de thèse : 01/03/2014 – 24/04/2017

Direction de thèse : Marianne Chemaly 50 % (HDR) et Daniel Dory 50 % (HDR)

Emploi actuel, lieu : Chercheur, entreprise pharmaceutique privée, Nantes

Contrat (post-doc, CDD, CDI) : CDI

Liste des publications issues de ce travail de thèse :

1. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, E. Vigouroux, T. Poezevara, V. Béven, S. Quesne, M. Amelot, A. Parra, M. Chemaly, D. Dory. A DNA prime/protein boost vaccine protocol developed against *Campylobacter jejuni* for poultry. *Vaccine*, 2018, 36, 2119-25
2. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, E. Vigouroux, T. Poezevara, V. Beven, S. Quesne, L. Bigault, M. Amelot, D. Dory, M. Chemaly. Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. *PloS ONE*, 2017, 12, e0188472
3. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, E. Hirchaud, A. Parra, M. Chemaly, D. Dory. Identification of Novel Vaccine Candidates against *Campylobacter* through Reverse Vaccinology. *Journal of Immunology Research* 2016, 2016, 5715790
4. M. Meunier, M. Chemaly, D. Dory. DNA vaccination of poultry: The current status in 2015. *Vaccine*. 2016, 34, 202-11
5. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, D. Dory, M. Chemaly. Control Strategies against *Campylobacter* at the Poultry Production Level: Biosecurity Measures, Feed Additives and Vaccination. *Journal of Applied Microbiology*. 2016, 120, 1139-73

Nom, prénom : SOUCI Laurent

Date de début et de fin de thèse : 01/01/2017 – 30/11-2019

Direction de thèse : Daniel Dory 100 %

Emploi actuel, lieu : Ingénieur d'étude, INRAE, Tours

Contrat (post-doc, CDD, CDI) : Titulaire

Liste des publications issues de ce travail de thèse :

L. Souci, H. Jaunet, G. Le Digueher, J.M. Guionnet, V. Béven, F. Paboeuf, T. Montier, D. Dory. Intranasal inoculations of naked or PLGA-PEI nanovectored DNA vaccine induce systemic and mucosal antibodies in pigs: A feasibility study. *Research in Veterinary Science* 2020, 132:194-201.

Nom, prénom : Le Du-Carré Jessy

Date de début et de fin de thèse : 01/01/2018 – 10/03/2021

Direction de thèse : Daniel Dory (HDR), Thierry Morin, Morgane Danion

Emploi actuel, lieu : en recherche

Contrat (post-doc, CDD, CDI) : -

Liste des publications issues de ce travail de thèse :

Le Du-Carré J., Morin T., Danion M. Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides. *Aquatic Toxicology* 2021, 230:105687.

Publications majeures des 5 dernières années du directeur de thèse et co-directeur(s)/co-encadrant(s) sur le sujet de thèse :

1. Dorey-Robinson D, Maccari G, Borne R, **Hammond JA**. 2021. IgMAT: immunoglobulin sequence multi-species annotation tool for any species including those with incomplete antibody annotation or unusual characteristics.
2. L. Souci, H. Jaunet, G. Le Digueher, J.M. Guionnet, V. Béven, F. Paboeuf, T. Montier, **D. Dory***. Intranasal inoculations of naked or PLGA-PEI nanovectored DNA vaccine induce systemic and mucosal antibodies in pigs: A feasibility study. *Research in Veterinary Science* 2020, 132:194-201.
3. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, E. Vigouroux, T. Poezevara, V. Béven, S. Quesne, M. Amelot, A. Parra, M. Chemaly, **D. Dory***. A DNA prime/protein boost vaccine protocol developed against *Campylobacter jejuni* for poultry. *Vaccine*, 2018, 36, 2119-25
4. M. Meunier, M. Guyard-Nicodème, E. Vigouroux, T. Poezevara, V. Beven, S. Quesne, L. Bigault, M. Amelot, **D. Dory**, M. Chemaly*. Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. *PlosONE*, 2017, 12, e0188472
5. Holzer B, Rijal P, McNee A, Paudyal B, Martini V, Clark B, Manjegowda T, Salguero FJ, Bessell E, Schwartz JC, Moffat K, Pedrera M, Graham SP, Noble A, Bonnet-Di Placido M, La Ragione RM, Mwangi W, Beverley P, McCauley JW, Daniels RS, **Hammond JA**, Townsend AR, Tchilian E. 2021. Protective porcine influenza virus-specific monoclonal antibodies recognize similar haemagglutinin epitopes as humans. *PLoS Pathog* 17:e1009330.

FINANCEMENT DE LA THÈSE

Origine(s) du financement de la thèse : Demande en cours
Salaire brut mensuel : Environ 1750 € brut
État du financement de la thèse : Acquis
Date du début/durée du financement de la thèse : Entre 1 ^{er} octobre 2022 et 1 ^{er} janvier 2023 – 3 ans

Date : 9 juillet 2022

Nom, signature du directeur d'unité :



N. ETERRADOSSI

Nom, signature du responsable de l'équipe :



Nom, signature du directeur de thèse : DORY Daniel

