



## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **12 Septembre 2019**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur LEVERRIER Yann**

Titre de la thèse : «**Propriétés des lymphocytes T CD8 mémoires .**»



L'apoptose, la mort cellulaire créatrice, est un processus physiologique conservé au cours de l'évolution qui permet l'élimination discrète des cellules surnuméraires, sénescents, infectées ou anormales. Sa dérégulation a des conséquences très négatives pour l'organisme. Au cours de ma thèse à l'ENS de Lyon, je me suis intéressé au contrôle génétique de l'apoptose et aux mécanismes moléculaires utilisés par les facteurs de croissance pour inhiber l'apoptose. J'ai utilisé un protocole de mutagenèse par intégration rétrovirale pour identifier des gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et étudié les voies de signalisation utilisées par l'interleukine-3 et l'Insuline-like growth factor-1 pour inhiber l'apoptose. Par la suite, nous avons montré que la dérégulation de Sp1, un facteur de transcription essentiel aux cellules de mammifères, induit l'apoptose des cellules non transformées et l'expression de nombreux gènes de la réponse innée intrinsèque, il pourrait s'agir d'un mécanisme qui permet d'éliminer les cellules subissant un stress transcriptionnel mais aussi d'alerter le système immunitaire.

Il existe de nombreuses situations pathologiques (par exemples les cancers) qui bénéficient ou bénéficieraient de la destruction des cellules anormales par induction de l'apoptose. Une thérapie novatrice est la photothérapie dynamique qui repose sur l'utilisation de photo-sensibilisateurs qui, une fois activés par la lumière, produisent de l'oxygène singulet cytotoxique. Au sein d'un groupe multidisciplinaire à Lyon, associant chimistes, physiciens et notre équipe de biologistes, nous avons produit et caractérisé des nano-objets à base de photo-sensibilisateurs à deux photons organisés et concentrés sur des polymères greffés sur des particules d'or. Ces nano-objets induisent l'apoptose de cellules tumorales *in vitro* après photo-activation. Leur intérêt pour une utilisation future en thérapie est que l'excitation multiphotonique procure une résolution spatiale élevée et une profondeur de pénétration accrue dans les tissus.

Si la mort des cellules fait partie intégrante du développement normal et du maintien de l'homéostasie d'un individu, il en va de même de leur élimination. Dans les tissus, les cellules qui meurent sont rapidement éliminées par phagocytose, en majorité par les macrophages et les cellules dendritiques. La phagocytose d'une particule résulte de l'interaction de ligands à sa surface et de récepteurs spécifiques à la surface de la cellule phagocytaire. Cette interaction est suivie par la polymérisation de l'actine au niveau du site d'ingestion, contrôlée par les GTPases de la famille Rho. A Londres, au University College London, j'ai disséqué les mécanismes moléculaires de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et montré que la réorganisation du cytosquelette d'actine nécessite de nombreux acteurs : les GTPases Rac et Cdc42, la protéine WASp en aval des Rho GTPases ainsi que certaines PI3 kinases.

Les cellules mortes sont une source importante d'antigènes cellulaires utilisés pour instruire le système immunitaire. En effet, les cellules dendritiques (DC) qui capturent les

cellules mortes les dégradent et présentent à leur surface via les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I des peptides issus de cette dégradation aux lymphocytes T CD8 (présentation croisée). Les DC contrôlent de nombreux aspects de l'immunité et en particulier sont nécessaires à l'initiation des réponses immunitaires. Les DC proviennent de la différenciation de précurseurs hématopoïétiques et constituent des populations hétérogènes. Les DC CD8a+ sont les plus compétentes pour la présentation croisée. Nous avons montré que les précurseurs de ces cellules sont incapables de faire de la présentation croisée mais le deviennent en présence de signaux inflammatoires (comme le GM-CSF) ou de danger (comme les ligands de TLR). Il est probable qu'ainsi les DC nouvellement produites dans un contexte infectieux sont donc primées pour faire de la présentation croisée.

Les LT CD8 ont un rôle essentiel dans l'élimination des cellules infectées et des cellules tumorales. Lors d'une infection ou après immunisation, les LT CD8 spécifiques des antigènes microbiens sont activés, prolifèrent et engagent alors un processus de différenciation en cellules effectrices qui acquièrent de nouvelles propriétés leur permettant de migrer dans les tissus et de tuer les cellules infectées. Après la disparition du pathogène, la majorité des LT CD8 effecteurs meurt par apoptose. Les cellules spécifiques de l'agent infectieux qui survivent forment la population des cellules mémoires. Les LT CD8 mémoires sont caractérisés par des propriétés améliorées (migration, propriétés effectrices) par rapport aux cellules naïves qui les rendent plus efficaces. Ces caractéristiques fonctionnelles associées à une fréquence accrue de LT mémoire sont à la base de la mémoire immunitaire. Nous avons utilisé une approche systématique de comparaison du transcriptome de différentes populations de LT CD8 mémoires ayant des capacités protectrices différentes. Ces analyses transcriptomiques nous ont permis d'identifier une signature transcriptomique associée à la protection immunitaire ("signature protectrice") et de caractériser certaines fonctions améliorées des LT CD8 mémoires, certaines étant inédites.

Finalement, la génération des LT CD8 mémoire est un élément important qui peut être recherché lors de la vaccination. Dans le cas des virus de la grippe, une stratégie pour optimiser la protection vaccinale est de développer un vaccin induisant une réponse LT CD8 contre des antigènes internes au virus qui sont les plus conservés. Nous avons montré que le couplage d'antigènes à la protéine pro-immunogène OVX développée par la société OSIVAX permet d'induire une réponse T CD8 chez la souris, ce qui a conforté le lancement d'un essai clinique de phase I.

L'axe majeur de mes recherches actuelles est la caractérisation des LT CD8 mémoire, de leurs propriétés et des conditions d'activation qui permettent leur génération. Nous continuons à étudier la fonction de certains des gènes qui composent la signature transcriptomique associée à la protection immunitaire (GM-CSF, CCL1...). Nous étudions l'impact de la délétion de plusieurs gènes associés à la mémoire protectrice mais aussi de récepteurs aux chimiokines qui sont impliqués dans la recirculation lymphocytaire comme CXCR4 ou des gènes régulateurs du cytosquelette d'actine. En effet, le positionnement des LT CD8 dans l'organisme et au sein des organes lymphoïdes secondaires est essentiel pour leur activation et leurs fonctions et ce positionnement est régulé, entre autres, par les chimiokines et nécessite la réorganisation du cytosquelette d'actine. Il est donc essentiel de pouvoir étudier avec précision la localisation des lymphocytes mémoires en conditions homéostatiques ou suite à un challenge infectieux dans les ganglions drainants le site d'infection ou la rate mais aussi le poumon (dans le cas d'une infection nasale). Nous développons les outils d'imagerie nécessaires à l'étude de la localisation fine des LT CD8 mémoires dans les tissus et de leur réactivité dans leur environnement naturel. Les connaissances que nous obtenons concernant la biologie des LT CD8 mémoire, les modèles physio-pathologiques murins et les outils que nous développons sont mis à profit pour étudier et évaluer des candidats vaccins ou de nouvelles pistes thérapeutiques impliquant les LT CD8. Ainsi un prochain projet sera d'évaluer le potentiel thérapeutique de la réponse cytotoxique T CD8 contre *Staphylococcus aureus* intracellulaire, l'agent pathogène le plus souvent impliqué dans l'ostéomyélite chronique, un problème majeur de santé publique.