



HAL
open science

Cancer et immunodéficiences

Anaïs Riviere

► **To cite this version:**

Anaïs Riviere. Cancer et immunodéficiences : Développement d'immunothérapies par transfert adoptif. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03370009

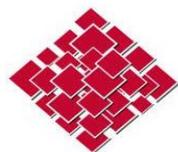
HAL Id: hal-03370009

<https://ephe.hal.science/hal-03370009>

Submitted on 7 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par

RIVIERE Anaïs

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Cancer et immunodéficiences : Développement d'immunothérapies
par transfert adoptif**

Soutenu le 04/10/2021

devant le jury suivant :

Dr – PAUL Catherine - Présidente

Dr ZIMMERMANN Valérie & DARDALHON Valérie - Tutrices Scientifiques

Dr GARDIE Betty - Tutrice Pédagogique

Dr PELEGRIN Mireia - Rapporteuse

Dr PINET Valérie - Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Drs DARDALHON Valérie & ZIMMERMANN Valérie

Intitulé de la structure d'accueil : IGMM, CNRS UMR5535, Montpellier

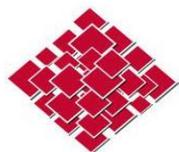
Directeur : Dr SCHWOB Etienne

Et de Dr GARDIE Betty

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut du Thorax - unité mixte Inserm UMR 1087/
CNRS UMR 6291, Université CHU de Nantes

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Génomes, Cancers et
Thérapies



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par

RIVIERE Anaïs

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Cancer et immunodéficiences : Développement d'immunothérapies
par transfert adoptif**

Soutenu le 04/10/2021

devant le jury suivant :

Dr – PAUL Catherine - Présidente

Dr ZIMMERMANN Valérie & DARDALHON Valérie - Tutrices Scientifiques

Dr GARDIE Betty - Tutrice Pédagogique

Dr PELEGRIN Mireia - Rapporteuse

Dr PINET Valérie - Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Drs DARDALHON Valérie & ZIMMERMANN Valérie

Intitulé de la structure d'accueil : IGMM, CNRS UMR5535, Montpellier

Directeur : Dr SCHWOB Etienne

Et de Dr GARDIE Betty

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut du Thorax - unité mixte Inserm UMR 1087/
CNRS UMR 6291, Université CHU de Nantes

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Génomes, Cancers et
Thérapies

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier **mon jury** d'avoir accepté cette mission, peu facile, qui est de juger un travail.

Je remercie **Betty** de m'avoir suivi ces 3 années, de m'avoir conseillé dans mes choix. La situation a fait que nous ne nous sommes pas vus beaucoup mais les visios avec quelques carreaux de chocolats, c'est sympa aussi !

Je veux grandement remercier **Etienne** et **Marc** qui m'ont accueilli dans leur institut au cours de ces 3 ans.

Je remercie aussi **Naomi** de m'avoir accueilli dans son équipe. Les mots me manquent pour exprimer à quel point je te suis reconnaissante à vie. Je n'ai jamais connu de femme aussi forte, solaire et gentille. Merci pour tout.

ValZou, merci d'avoir été mon doudou pendant ces 3 ans et de m'avoir donné confiance en moi, de m'avoir rendue autonome (ou presque). Il y a des personnes qui marquent votre vie et tu en fait partie, indéniablement. Tu es une tutrice en or et une femme / maman super. Ne changes jamais.

Toute l'équipe NTL/VZ, vous avez été formidable. Vous êtes une grande famille et c'est aussi ça, qui fait la particularité de ce labo...

Evidemment, je voudrais remercier particulièrement **Grande Marie** qui m'a beaucoup appris avant de s'envoler de l'autre côté de l'océan mais aussi **Alice** qui a pris le relai. Tu as été formidable et même si on était opposé sur les paillettes, les licornes et la bière, on aura passé de supers moments (surtout à 8h du matin en expé anim ou le soir au FACS). Evidemment, je ne vous oublie pas **Maria & Carmen**, le ying et le yang, comme on vous appelle. Merci pour toutes les connaissances que vous avez pu m'apporter (cependant je n'aime toujours pas le métabolisme, désolée ...).

Merci aussi à tout ceux qui m'ont accompagné ces 3 années **Cédric** (reste comme tu es, tu es un super scientifique et un homme extraordinaire), **Sandrina, Anne So, Petite Marie, Pedro Ira, Mehdi, Julie, Sylvain, Jeremy, Axel, Chloé** mais aussi les stagiaires que j'ai pu rencontrer et qui m'ont permis d'évoluer (tout le monde sait que je pense surtout à **Mathis**).

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu rencontrer aussi au sein de l'institut et qui m'ont accompagnées : **Nico, Myriam, Cédric, Eve, Laurent, Mickaël, Laura, Marina** mais aussi tous les autres.

Merci à **Phillipe JAY et son équipe, Urszula et son équipe** de m'avoir permis de collaborer avec vous !

Et évidemment ces quelques lignes sont pour les personnes les plus proches :

Valérie (alias ValDou), c'est un choix de t'avoir mis là. Je ne crois pas au destin et à toutes ces bêtises là mais toi, on pourrait croire que tu as été là au bon endroit, au bon moment. Je n'aurai pas pu rêver mieux comme tutrice, déjà parce que tu viens des Cévennes, et ça c'est

un critère de choix ! mais, sans rire, parce qu'il n'existe pas deux personnes comme toi (et je pèse mes mots). Tu as su m'apprendre à filtrer et me canaliser là ou tant de personnes avaient échouées, tu m'as appris à prendre du recul, à être objective, à grandir tout simplement comme aurait pu le faire ma maman et ça, ça n'a pas de prix. Pour tout ça, mais aussi pour toi, tout simplement, je te serai éternellement reconnaissante. Si j'en suis là où j'en suis que ce soit personnellement ou professionnellement c'est grâce à toi car tu m'as fait découvrir pleinement le vivo, tu m'as fait confiance et m'as ouvert l'esprit. Tu dis souvent que personne n'est indispensable mais tu ignores que toi, tu l'es. Alors MERCI.

Maman, même un mémoire ne suffirait pas à dire à quel point tu es une femme extraordinaire, mon tout. On a traversé tellement de choses toutes les 2 (3), et aujourd'hui voilà ou nous en sommes... Car oui, ce mémoire c'est aussi le tien. Tout ça c'est grâce à toi, à tes encouragements et à ta persévérance face à mon caractère de cochon qui ne voulait que rentrer dans mes Cévennes natales. Alors merci, 1000 fois pour tout ce que tu m'as apporté, ce que tu m'apportes et ce que tu m'apporteras encore. Tu es la meilleure maman. Love you to the moon and back.

Paps, merci à toi d'avoir été un père pour moi, de toujours m'avoir soutenu dans les bonnes et les moins bonnes décisions, dans mes choix personnels mais aussi dans ma vie professionnelle et de m'avoir relevé chaque fois que j'en ai eu besoin. Je t'....

Doudou, merci d'avoir été présent dans les bons comme dans les moins bons moments. Tu as cru en moi pour nous deux quand j'ai douté de moi-même et si j'en suis là c'est aussi grâce à toi, parce que tu m'as suivi dans toutes mes folies. Tu as toujours écouté mes histoires de sciences sans fin qui ne t'intéressaient pas vraiment... alors pour tout... Merci et Je t'aime

Merci aussi à ma **famille** et **belle famille** (Marie, François, Tonton Philoumé, Tata Magali, Ange, Sandra, Papy, Mamie, Mamé et tous les autres) pour votre soutien sans failles.

Et merci infiniment à mes amis qui m'ont soutenu durant ces 3 années et bien plus encore : **Léa**, merci pour tout, tu es une amie formidable ! Pourtant on n'aurait pas parié sur notre réussite à la FAC...

Jerem, Merci d'avoir été là depuis le début avec Léanounette et nos jeudis mémorables !

Erwan, je ne saurai comment te dire merci de m'avoir poussé à chaque coup dur tant dans ma scolarité, ma santé que personnellement chaque fois que j'ai eu besoin. Tu es et resteras le Fraté international.

Manon, Steph, Sév, Mae, Victor, Elodie, Adrien, Marine, Juju, Coco, Pauline merci de faire partie de ma vie, de notre vie et d'être toujours de supers amis.

Enfin, merci à toute l'équipe de **Sensorion** et surtout **l'équipe vivo** de m'avoir soutenu dans cette aventure !

Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations.....	9
Table des figures.....	11
Table des tableaux.....	12
Introduction.....	13
I. Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs.....	13
II. Organisation et rôle du thymus	15
1) Engagement vers le lignage T	16
2) Sélection positive	18
3) Sélection négative.....	19
4) Migration des cellules T matures.....	19
III. Réponse immunitaire	19
1) Activation des cellules T.....	20
2) Différenciation et sous-populations de cellules effectrices et régulatrices	23
3) Les cellules T mémoires	26
IV. Thérapies dans le cadre des immunodéficiences T.....	29
1) Les immunodéficiences primaires	29
2) Les immunodéficiences induites.....	35
V- Pre-conditionnement dans le contexte des immunothérapies anti-tumorales utilisant le transfert adoptif de cellules T	37
Objectifs	39
Matériel et Méthodes	40
I. Modèles murins.....	40
II. Description des lignées murines	40
III. Transfert de cellules T dans des souris conditionnées (environnement lymphopénique induit).....	41
1) Isolement cellulaire et marquage CTV ou CFSE avant transfert adoptif	41
2) Transfert adoptif dans souris receveuses pré-conditionnées	41
IV. Transfert de cellules souches hématopoïétiques dans des souris non conditionnées SCID (environnement lymphopénique génétique)	42
1) Tri magnétique (pour la purification des CSH).....	42
2) Transfert adoptif dans souris receveuses non conditionnées.....	43
V. Suivi de la reconstitution.....	43

1)	Immunophénotypage et analyses par cytométrie de flux des leucocytes sanguins	43
VI.	Suivi du développement tumoral après transfert adoptif de différentes populations de cellules T	44
1)	Cellules tumorales 24JK-ERB.....	44
2)	Lignée 24JKERB-Luciférase.....	44
VII.	Analyses terminales.....	46
1)	Analyse par cytométrie en flux de cellules totales	46
2)	Histologie	46
Résultats.....		47
I.	Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre d'immunodéficiences en cellules T grâce au ciblage direct dans le thymus.	47
1)	Analyse du développement des cellules T après transplantation par voie intrathymique de cellules progénitrices	47
2)	Analyse de la restauration de l'architecture thymique	53
II.	Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale par transfert adoptif de cellules T : Impact du conditionnement sur le devenir /fonction des cellules T injectées.....	55
III.	Analyse du potentiel anti tumoral de cellules T.....	61
IV.	Maintien des différentes colonies de lignées murines	64
Conclusion – Perspectives.....		66
I.	Amélioration de la thérapie cellulaire par ciblage direct du thymus.....	66
II.	Impact du conditionnement sur le devenir des cellules T	68
III.	Analyse du potentiel anti tumoral de cellules CAR T pré-traitées in vitro avec un métabolite du cycle de Krebs (alpha-kétoglutarate, α KG).....	69
IV.	Perspectives personnelles	70
Bibliographie		71
Résumé.....		76

Liste des abréviations

ADA : Adénosine Désaminase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIRE : AutoImmune REgulator
APECED : polyendocrinopathie auto immune de type 1
CAR : Chimeric Antigen Receptor
CD8c : CD8 Cytotoxique
CD8n : CD8 Naïve
CFSE : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CLP : Lymphoïd Progenitor Cell
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
cTEC : Cellule Epithéliale Thymique du Cortex
CTV : Cell Tracer Violet
DICS : Déficit Immunitaire Combiné Sévère
DN : Double Négative
DP : Double Positive
ETP : Progéniteur précoce de Cellules T
FLT3L : fms like tyrosine kinase 3 ligand
Foxp3 : Forkhead box P3
GVHD : Maladie du Greffon contre l'Hôte
Hi : High
IFN : Interferon
IL : Interleukine
IO : Intra Orbital
IT : Intra Thymique
iTreg : Treg Induit
IV : Intra Veineux
LCK : Lymphocyte Specific Protein Tyrosine Kinase
LMPP : Progéniteur Lympho Myéloïde
LO : Low
LT : Lymphocyte T
mTEC : Cellule Ephithéliale Thymique de la Medulla
NK : Natural Killer
nTreg : Treg Naturel
PBS : Phosphate Buffered Saline
PFA : ParaFormAldéhyde
PID : Primary ImmunoDeficiency
PO : Per Os
SI : Système immunitaire
SP : Simple Positive

TCM : Cellule T Centrale Mémoire
TCR : T Cell Receptor
TEC : Cellule Epithéliale Thymique
TEM : Cellule T Effectrice Mémoire
TFH : Cellule T Follicular Helper
Th : Cellule T Helper
TILS : Lymphocytes T Infiltrant la Tumeur
Treg : Regulatory T Cell
TRM : Cellule T Résidant dans les Tissus
TSCM : Cellule T Souche Mémoire
TTM : Cellule T Mémoire Transitoire
ZAP-70 : Zeta Associated Protein 70kDa
 α KG : α Kéto Glutarate

Table des figures

Figure 1. Schéma classique simplifié de l'hématopoïèse	14
Figure 2. Engagement et différenciation vers le lignage T suite à une stimulation par Notch (d'après E.V Rothenberg, 2014)	16
Figure 3. Le développement des cellules T CD4+ et CD8+ dans le thymus – d'après (Germain 2002).....	17
Figure 4. Sélection des cellules par l'interaction avec des complexes CMH-peptide.	18
Figure 5. Le TCR et l'activation partielle de la cellule T.....	21
Figure 6. Principaux récepteurs et ligands de co-stimulation chez une cellule T (Chen et Flies 2013)	22
Figure 7. Les différentes sous populations de cellules T CD4 (Jiang et Dong 2013)	24
Figure 8. Les différentes cellules Tregs (https://www.cusabio.com/c-20978.html)	25
Figure 9. Fonctions pro- et anti-tumorales des cellules immunes.....	26
Figure 10. Modèles convergent et linéaire de la génération des cellules T mémoires	27
Figure 11. Marqueurs caractérisant les différentes sous populations de cellules mémoires (Vita Golubovskaya et Wu 2016).	28
Figure 12. Les différents gènes déficitaires chez les DICS (non exhaustif) adapté de (Pouzolles 2018).....	31
Figure 13. Blocage au cours du développement T dû à l'absence de ZAP 70 dans la différenciation thymique murine.....	33
Figure 14. Thérapie Cellulaire	35
Figure 15. Immunothérapies anti-tumorales utilisant le transfert adoptif de cellules T	38
Figure 16. Souris RAG -/- à J1 post injection de tumeurs 24JKERB luciférase.....	45
Figure 17. Comparaison de l'efficacité de la transplantation de CSH par injection intraveineuse (IV) et intra-thymique (IT).....	48
Figure 18. Cinétique de suivi de cellules de donneur après injection IT.	49
Figure 19. Cinétique de suivi de progéniteurs après injection IT	50
Figure 20. Suivi au cours du temps du développement en cellules T des cellules progénitrices injectées (CD45.1).	51
Figure 21. Caractérisation de la maturation des cellules T CD4 et CD8.....	52
Figure 22. Cinétique du développement de cellules Tregs après IT par l'intermédiaire de l'évaluation du marqueur FOXP3.....	53
Figure 23. Coupes de thymus de souris WT, ZAP70 -/- et ZAP70 -/- reconstituée a différents temps (2,3 et 6 semaines) après un transfert adoptif de cellules injectées en IT et analysées en immunohistochimie.....	54
Figure 24. Le phénotype des cellules T de l'hôte est différentiellement modulé par un conditionnement par irradiation et par Bu/Cy	56
Figure 25. Le potentiel de prolifération des cellules T greffées est impacté par le pré-conditionnement de la souris receveuse (irradiation vs Bu/Cy)	57
Figure 26. Prolifération cellulaire des cellules T CD4 et T CD8 totales ou naïves chez les souris irradiées ou les souris ayant reçu une chimiothérapie. Les souris sont sacrifiées 7 jours post injection	58

Figure 27. Etudes des cellules mémoires (effectrices mémoires / centrales mémoires) et naïves	59
Figure 28. Le pourcentage de cellules Tregs greffées est différent après transfert chez un hôte irradié ou conditionné par Bu/Cy	60
Figure 29. La lymphopénie générée par Bu/Cy entraîne l'expansion des cellules T régulatrices Foxp3+ greffées	60
Figure 30. Le conditionnement Bu/Cy entraîne l'expansion des cellules T régulatrices Foxp3+ greffées.....	61
Figure 31. Potentiel anti tumoral des cellules T en présence ou absence d'αKG.....	63
Figure 32. Phénotypage par cytométrie en flux	65

Table des tableaux

Tableau 1. Les principaux DICS identifiés à ce jour (non exhaustif).	30
Tableau 2. Lignées de l'équipe	41

Introduction

Bien que longtemps inconnu et controversé, le concept d'immunologie est mis en avant au XVIIIème siècle avec des procédés comme la vaccinologie, la variolisation puis enfin, la vaccination et le concept d'immunité croisée. Le système immunitaire (SI), possède un rôle de défense local et général au sein de l'organisme. Il est composé de différents acteurs complémentaires, tous aussi importants les uns que les autres ; c'est pourquoi il est important que toutes les cellules le composant soient présentes et fonctionnelles. Le système immunitaire se divise schématiquement en deux catégories : le système immunitaire inné et le système immunitaire acquis (ou adaptatif). Le premier, composé notamment des monocytes ou granulocytes, réagit rapidement quand un agent infectieux est détecté et de manière non spécifique. Le second se met en place dans un deuxième temps, de manière spécifique, et conserve une mémoire de sa réaction. Le système adaptatif peut être ultérieurement subdivisé en deux types de réponses : la réponse humorale, portée par les lymphocytes B, et la réponse cellulaire, dépendante des lymphocytes T.

Les lymphocytes T peuvent reconnaître les antigènes étrangers grâce à leur récepteur spécifique, le TCR (Récepteur des cellules T). Ce dernier est un complexe protéique composé d'une unité de transduction du signal (les chaînes CD3 – ϵ, δ, γ , et ζ) et d'une unité de reconnaissance (les chaînes $\alpha\beta$). Les cellules T TCR $\alpha\beta$ représentent la population majoritaire des lymphocytes T et leur TCR est spécifique d'un peptide présenté par les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Cette population de cellules T peut-être ultérieurement divisée en sous populations, dont les deux grands groupes sont caractérisés par l'expression différentielle des marqueurs CD4 et CD8. Ainsi, les molécules CD4 et CD8 permettent respectivement d'identifier des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) qui peuvent directement détruire les cellules infectées, tandis que les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) possèdent un rôle de chef d'orchestre de la réponse en contrôlant notamment l'activation des autres cellules du système immunitaire comme notamment, les cellules B ou T CD8+.

Mes projets ont porté sur les cellules T, ainsi, la suite de mon introduction sera focalisée sur cette population de cellules immunitaire en décrivant son processus de développement jusqu'aux différentes fonctions exercées à l'état mature.

I. Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs

Les lymphocytes T, comme toutes les cellules du système immunitaire, proviennent d'un progéniteur commun : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). En effet, ces cellules multipotentes (état non différencié), présentes dans la moëlle osseuse, sont capables d'auto-renouvellement et donnent naissance à l'ensemble des cellules du système hématopoïétique selon un processus appelé hématopoïèse. L'hématopoïèse débute dans la moëlle osseuse qui est un organe lymphoïde primaire. C'est un processus hautement régulé aussi bien par

l'expression de facteurs de transcription (Gata3, Pu1, Pax5, TCF1, ...) que par des facteurs environnementaux tels que les cytokines (IL-7, FLT3L, etc) ou encore des facteurs métaboliques (hypoxie, disponibilité en nutriments, ...). Selon le modèle classique d'hématopoïèse, les CSH vont d'abord perdre leur capacité d'auto-renouvellement puis se différencier en deux sortes de progéniteurs : les progéniteurs myéloïdes communs ou les progéniteurs lymphoïdes communs qui se différencieront à leur tour en cellules du lignage myéloïdes ou lymphoïdes comme leurs noms l'indique (**Figure 1**). Ce modèle a cependant récemment été remis en doute par différentes études basées sur des analyses sur cellules uniques qui proposent notamment un engagement beaucoup plus précoce vers un lignage donné, associé à une plasticité importante du système (Loughran et al. 2020).

Après la perte de leur multipotence et différenciation des CSH sous l'influence de différents facteurs dont l'interleukine 7 (IL7), Kit Ligand ou encore FLT3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand), des progéniteurs dont les LMPP (progéniteurs lympho-myéloïdes) ou les CLP (lymphoïde progenitor cell) vont également acquérir l'expression de certains récepteurs aux chimiokines comme CCR7 ou CCR9. Grâce à l'expression de ces « récepteurs d'attraction », elles vont être capables de répondre à des gradients de chimiokines (CCL19 et CCL21 ou encore CCL25, respectivement) et acquérir ainsi la capacité de migrer vers le deuxième organe lymphoïde primaire : le thymus, où elles pourront se différencier ultérieurement en cellules T. En effet, le développement des cellules T requiert un environnement particulier présent dans cet organe que je présenterai plus en détail ci-dessous.

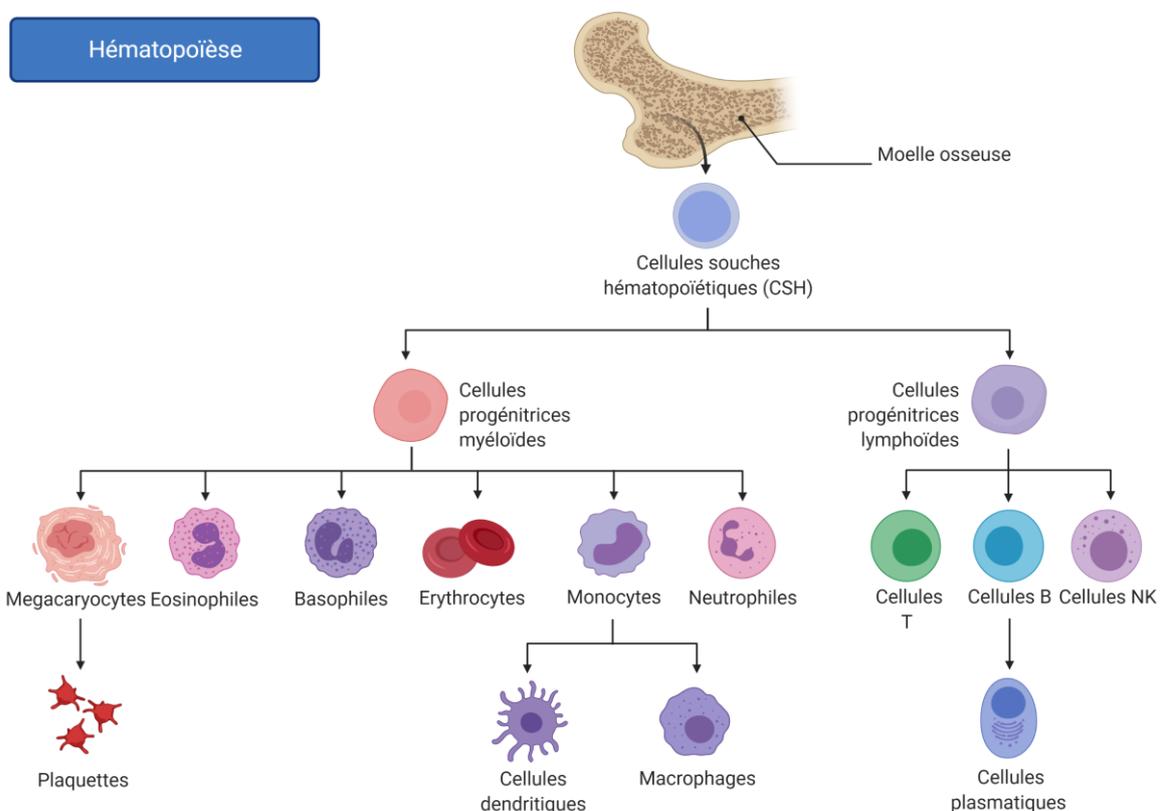


Figure 1. Schéma classique simplifié de l'hématopoïèse

Les CSH provenant de la moelle osseuse peuvent se différencier en deux types de cellules progénitrices hématopoïétiques : myéloïdes ou lymphoïdes. Ce sont les cellules progénitrices lymphoïdes qui donnent, entre autres, les cellules T.

II. Organisation et rôle du thymus

Le thymus est un organe bilobé composé de deux parties : le cortex (en périphérie) et la médulla (au centre). Le cortex comme la médulla sont formés par des cellules épithéliales thymiques (TEC, *thymic epithelial cell*) appelées respectivement mTEC pour la médulla et cTEC pour le cortex. Ces deux zones sont associées à des rôles distincts et complémentaires, indispensables à un développement optimal des lymphocytes T durant la thymopoïèse (Miller 1962).

Le thymus est caractérisé par une évolution dynamique au cours du temps, avec une phase de croissance précoce (embryon et enfance précoce) et une phase de décroissance aussi appelée involution (dès l'âge de 2/3 ans chez l'homme avec une accélération au moment de la puberté). Son développement est donc régulé notamment par un dialogue entre les lymphocytes T en cours de développement et les TEC (Yousuke Takahama 2017).

Comme indiqué ci-dessus, le développement des cellules T s'effectue dans cet organe particulier, le thymus, afin de générer des cellules T matures tolérantes au soi et restreintes aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ainsi, les cellules T en développement ou thymocytes subissent des processus stricts d'éducation et de sélection permettant ainsi de générer un compartiment de cellules T exprimant des récepteurs des cellules T (TCR) variés. Ce processus, appelé thymopoïèse, est schématisé dans la **Figure 2** ci-dessous. Je vais maintenant détailler les étapes allant de la spécification des cellules T à la migration des cellules matures en périphérie.

1) Engagement vers le lignage T

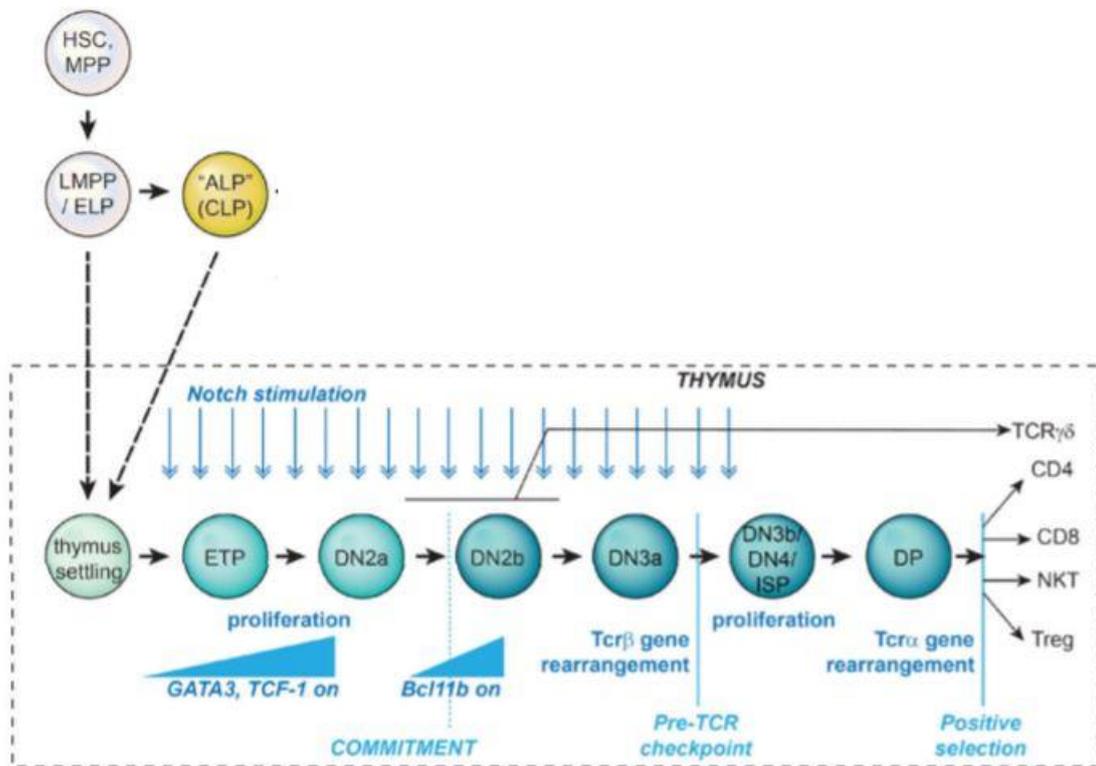


Figure 2. Engagement et différenciation vers le lignage T suite à une stimulation par Notch (d'après E.V Rothenberg, 2014)

Une fois dans le thymus les cellules reçoivent un signal Notch prolongé qui promeut (avec d'autres signaux) leur engagement dans la différenciation en cellules T matures.

Les cellules ETP (Early T lineage Progenitor - progéniteurs précoces des cellules T) provenant des CSH (cellules souches hématopoïétiques) vont subir différents signaux dès leur entrée dans le thymus. Une fois dans le thymus, et plus spécifiquement dans le cortex thymique, les ETP seront stimulés de façon prolongée par la voie Notch via l'interaction avec son ligand Delta-Like 4 exprimé par les cTEC (**Figure 2**). Cette interaction va aboutir à divers signaux moléculaires tels que l'expression de facteurs de transcription spécifiques de l'engagement vers le lignage T (TCF1, Bcl11b, ...) de façon concomitante à la perte d'expression d'autres facteurs de transcription associés à d'autres lignages comme PU1, par exemple (**Figure 2**).

Les cellules vont alors débuter leur développement en cellules T matures qui s'accompagne d'une migration organisée entre les différentes zones du thymus, orchestrée notamment par différents récepteurs chémokines et leurs chémokines comme CCR4 ou CCR7 (**Figure 3**). Ainsi, les progéniteurs hématopoïétiques vont migrer de la jonction cortico-médullaire, par laquelle elles entrent dans le thymus, vers la zone périphérique du cortex afin de se différencier tout d'abord dans les différents stades de cellules Doubles Négatives (DN1, DN2, DN3, DN4) caractérisés par l'absence d'expression des marqueurs CD4 et CD8 et l'expression relative de CD44 et CD25. Le réarrangement des chaînes α et β du TCR va également s'initier avec tout d'abord le réarrangement de la chaîne β au stade DN3 (**Figure 3**). Les cellules, tout en poursuivant leur migration vers les zones du cortex interne, vont ensuite acquérir l'expression

des deux marqueurs CD4 et CD8 pour donner le stade des cellules Doubles Positives (DP) et terminer le réarrangement de la chaîne α du TCR (**Figure 3**). Cette population DP représente environ 90% des thymocytes dont la plupart mourra au cours des étapes de sélection décrites ci-dessous. Elle est donc divisée en deux sous-populations DP^{lo} , manifestant un faible niveau d'expression du TCR et DP^{hi} , définie par un niveau d'expression élevé du TCR, cette dernière population représentant les cellules DP ayant passées la première étape de sélection/validation de leur TCR, la sélection positive.

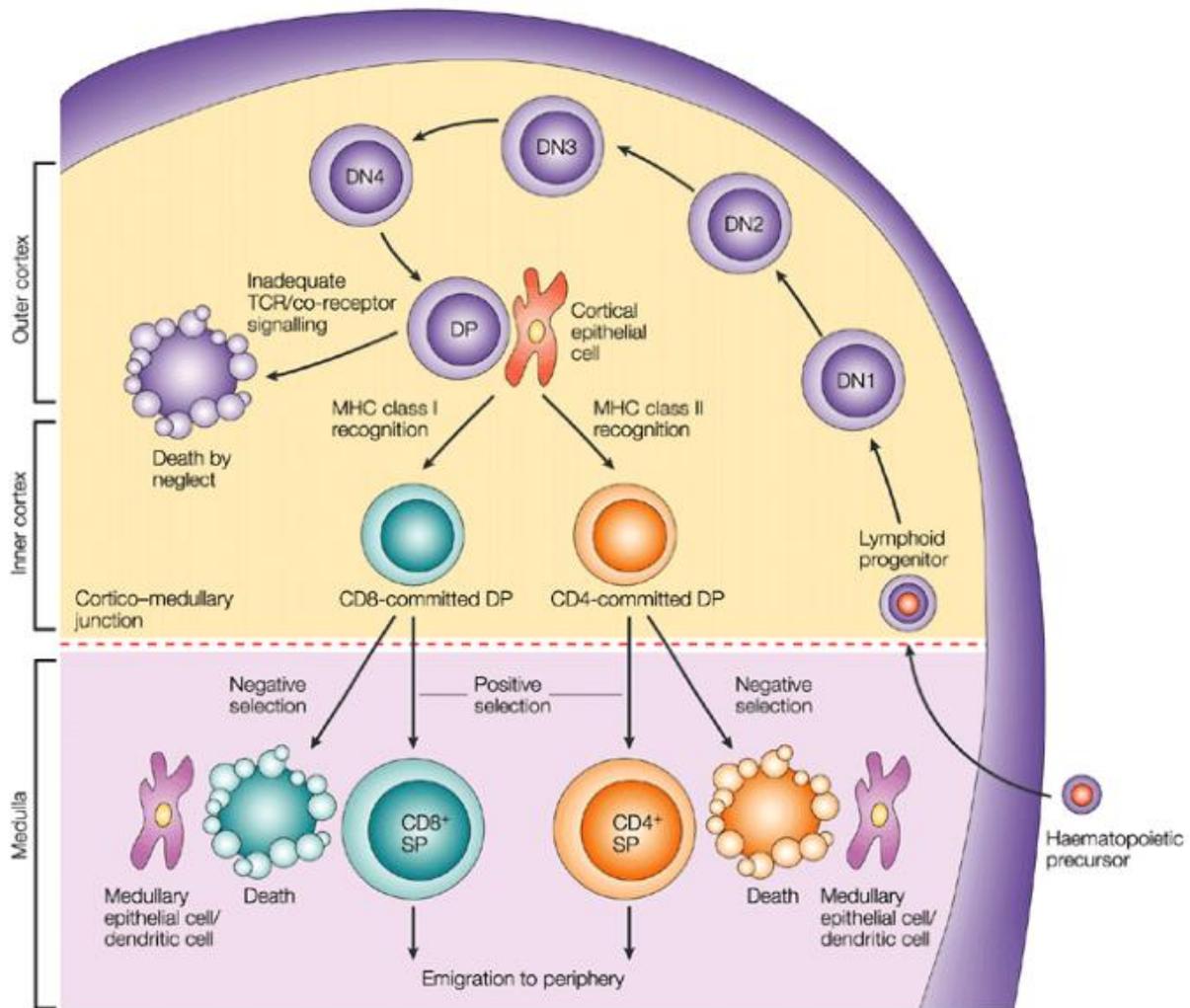


Figure 3. Le développement des cellules T CD4+ et CD8+ dans le thymus – d'après (Germain 2002)

Une fois entré dans le thymus, le précurseur hématopoïétique va subir plusieurs étapes par migration dans les différentes régions du thymus qui vont l'amener à se différencier/ supporter sa différenciation. Il va d'abord devenir un progéniteur lymphoïde puis une cellule double négative (DN) de différents stades pour enfin devenir une cellule double positive (DP) et se différencier en cellule T CD4 ou CD8 via la sélection positive et négative.

2) Sélection positive

Les cellules DP vont interagir avec les cellules cTEC afin d'établir une interaction entre leur TCR et des complexes CMH-peptides. En fonction de l'affinité/avidité de cette interaction, les cellules vont alors soit être éliminées (dans environ 90% des cas) soit proliférer et poursuivre leur différenciation vers le stade Simple Positif. Ainsi, lorsque le TCR d'une cellule DP a peu ou pas d'affinité pour un complexe CMH-peptide du soi, cette cellule ne recevra pas de signaux d'activation et de survie et elle mourra par un processus appelé « mort par ignorance ». A contrario, si le TCR a une affinité modérée pour un complexe CMH-peptide, l'activation du TCR induira une transduction du signal (voir paragraphe III. 1. a) qui aboutira à la survie, prolifération et poursuite de la différenciation du thymocyte DP. En fonction du complexe CMH-peptide reconnu, les cellules se différencieront soit en cellules Simple Positives (SP) CD4+ (reconnaissance du CMH de classe II) ou CD8+ (reconnaissance du CMH de classe I) (**Figure 4**). Ce signal TCR induit également l'expression de CCR7 supportant ainsi la migration des cellules SP vers la médulla pour y poursuive leur sélection (Nitta et al. 2009).

Un troisième cas peut cependant se présenter si le TCR présente une affinité très élevée pour un complexe CMH-peptide du soi, alors la transduction du signal aboutira à la mort de la cellule. Ce cas représente le début de la sélection négative qui se poursuivra également dans la médulla.

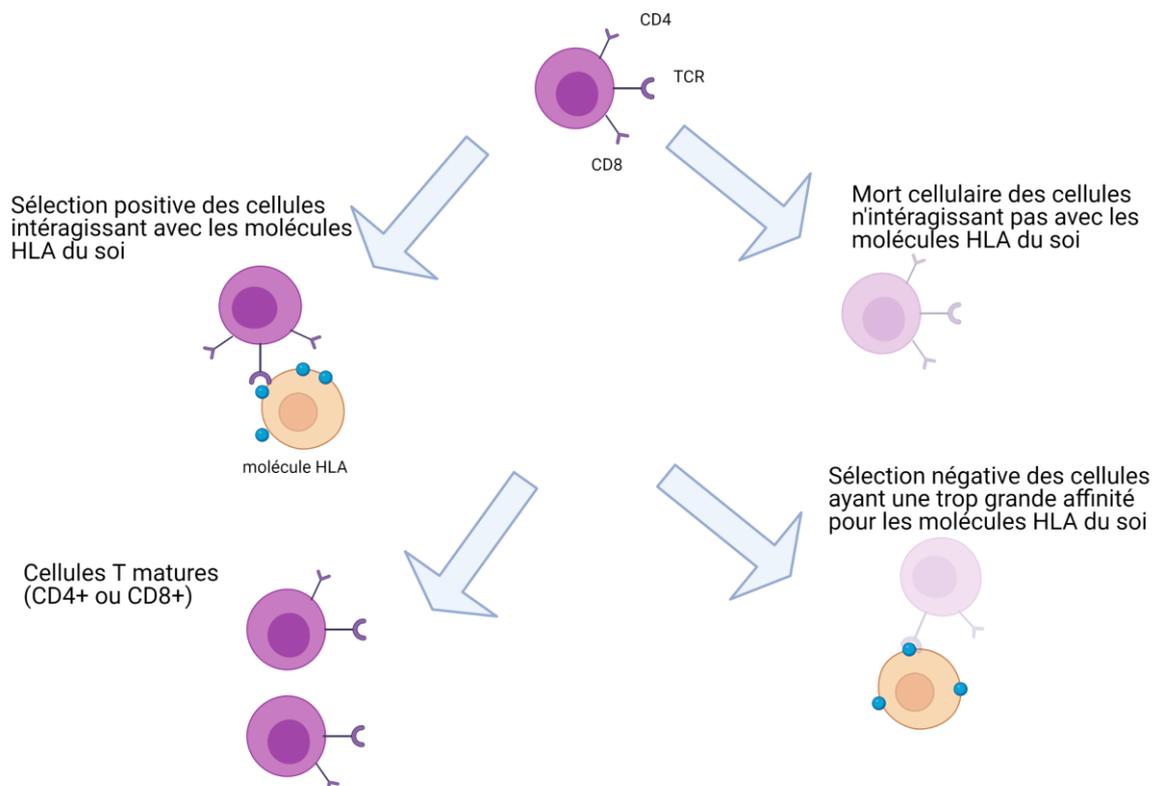


Figure 4. Sélection des cellules par l'interaction avec des complexes CMH-peptide

Les thymocytes DP (doubles positives) subissent une première sélection pour savoir s'ils sont en capacité d'interagir ou non avec un CMH peptide. Les cellules interagissant avec une affinité

modérée poursuivent leur différenciation tandis que les cellules n'ayant pas la capacité d'interagir ou interagissant avec une affinité élevée meurent.

3) Sélection négative

La sélection négative se fait donc principalement au niveau de la médulla thymique (mTEC). Une sous-population de cellules mTEC expriment le facteur de transcription AIRE (*AutoImmune REgulator*) qui joue un rôle majeur dans cette phase de sélection négative. En effet, ce facteur permet l'expression d'antigènes du soi spécifiques des différents tissus. Ces peptides pourront alors être présentés en association avec les molécules du CMH pour établir la tolérance centrale et ainsi, éviter l'auto-immunité.

Ainsi, sans cette molécule, des cellules T spécifiques d'un antigène tissulaire, par exemple la thyroïde, ne seraient pas reconnues et ne pourraient donc pas être éliminées. Cela entraîne en particulier une pathologie : l'APECED (polyendocrinopathie auto-immune de type 1). Cette pathologie récessive, caractérisée notamment par une auto-immunité multi-organes, a permis de découvrir AIRE et son importance dans la sélection négative.

Dans la médulla, les thymocytes SP vont donc se retrouver exposés à une nouvelle diversité de complexe CMH-peptide. Si des thymocytes expriment un TCR présentant une trop grande affinité pour un peptide du soi (cellules dites auto-réactives), ils reçoivent un signal de mort afin d'être éliminés. La perte de cellules durant cette sélection est estimée entre 50 et 60%. Cependant, certaines cellules auto-réactives peuvent être sauvées de la mort selon un mécanisme encore mal connu. Elles se différencient alors en cellules T régulatrices naturelles et expriment le facteur de transcription FoxP3. Ces cellules ont un rôle essentiel dans le contrôle de la réponse immunitaire et de la tolérance périphérique.

4) Migration des cellules T matures

Les thymocytes ayant réussi à passer les étapes de sélection positive et négative vont sortir du thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire grâce notamment à l'expression du récepteur S1P1 qui va leur permettre de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Rate, nœuds lymphatiques, etc..) via le réseau sanguin.

III. Réponse immunitaire

Grâce à la thymopoïèse, les lymphocytes T nouvellement générés peuvent assurer leur rôle de défense de l'organisme en cas de nécessité sans normalement s'attaquer à l'organisme sain. Ainsi, lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît, dans un contexte inflammatoire, un antigène spécifique de son TCR, cela induit une réponse se traduisant par l'activation, la prolifération clonale, et la différenciation fonctionnelle des cellules T avant un retour à la normale par contraction de la réponse. En fonction de l'antigène et du microenvironnement, le processus de différenciation des cellules T naïves est modulé pour obtenir des fonctions /

phénotypes de cellules T adaptés au danger identifié (infection bactérienne, parasites, etc). Je décrirai ici brièvement les étapes d'activation et de différenciation des cellules T et les différentes sous-populations résultantes.

Comme discuté précédemment, les lymphocytes T comportent deux lignées distinctes, les LT CD4 qui ont un rôle d'aide « helper » et d'organisation de la réponse immunitaire, et les LT CD8, acteurs de la réponse cytotoxique. Ces deux sous-populations peuvent sécréter des cytokines qui régulent et orientent la réponse immunitaire (Turner et al., 2014). Les LT CD8 en plus de la production de cytokines effectuent la lyse directe des cellules cibles notamment par la sécrétion de granzyme B et/ou perforine. En particulier, cette fonction cytotoxique s'exerce contre certaines cellules du Soi modifiées comme lors des infections intracellulaires ou des cancers. Les LT CD4 quant à eux sécrètent la majorité des cytokines, organisent et orchestrent la réponse immunitaire au travers de leurs interactions avec les autres cellules du système immunitaire (Dimeloe et al. 2017).

1) Activation des cellules T

A la sortie du thymus, les lymphocytes T sont considérés comme naïfs tant qu'ils n'ont pas interagi avec leur complexe MHC-peptide spécifique. La mise en place d'une réponse immunitaire et en particulier l'activation des cellules T sont des processus très régulés. Ainsi, l'activation et la différenciation des cellules T sont dépendantes de 3 signaux indispensables :

- Une interaction entre le TCR de la cellule T et le complexe CMH-peptide de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA)
- Un signal de co-stimulation *via* une interaction ligand / récepteur (par exemple CD28 – CD80/86)
- Une sécrétion de cytokines par les CPA qui coordonnent la différenciation vers des sous-populations spécifiques

a) L'activation *via* le TCR

Le complexe TCR est un complexe protéique composé d'une unité de transduction du signal (chaînes CD3 et ζ) et d'une unité de reconnaissance de l'antigène (les chaînes TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$). Le complexe CD3 est formé de 3 chaînes différentes (ϵ, δ, γ). Ces différentes chaînes ainsi que ζ sont transmembranaires et chargées négativement pour permettre la transduction d'un signal du TCR. Comme indiqué ci-dessus, l'activation du TCR nécessite une reconnaissance d'un complexe peptide-CMH dont il est spécifique. Suite à cette interaction, une cascade de signalisation va se mettre en place, initiée par le recrutement et l'activation de la kinase LCK (associée aux co-récepteurs CD4 ou CD8) (**Figure 5**). Brièvement, cette première étape va entraîner la phosphorylation de la chaîne ζ par LCK qui va permettre le recrutement et la phosphorylation de ZAP70 (*Zeta-associated protein 70KDa*) par LCK. ZAP70 phosphorylée à son tour, phosphoryle LAT ce qui va entraîner l'activation en cascades de plusieurs molécules (processus résumé dans la figure 5). Ce processus n'est évidemment possible qu'en présence de tous ces acteurs complémentaires. Si l'un d'entre eux n'est pas présent ou altéré, cela entraîne un dysfonctionnement dans l'activation des cellules T.

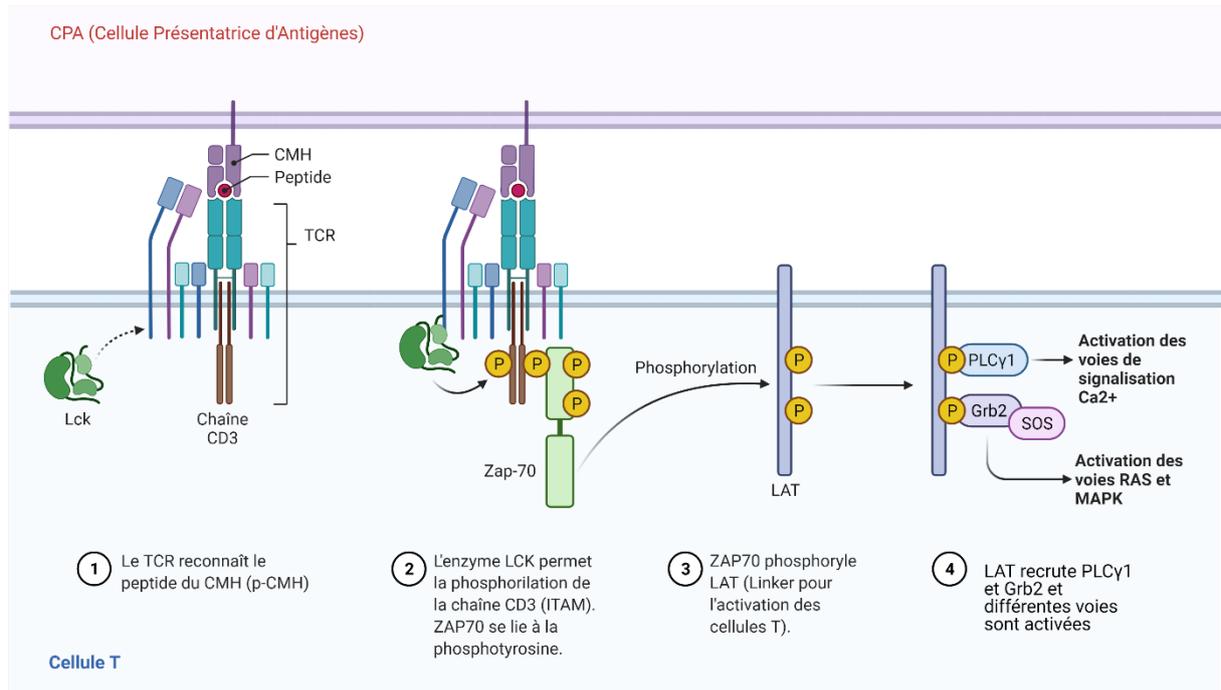


Figure 5. Le TCR et l'activation partielle de la cellule T

Le TCR reconnaît le peptide du CMH ce qui entraîne un recrutement de Lck qui phosphoryle la chaîne ζ du TCR. ZAP70 se lie alors à la phosphotyrosine et phosphoryle LAT à son tour, qui recrute différentes molécules afin d'engager différentes voies de signalisation (RAS, MAPK, CA²⁺) conduisant à la prolifération cellulaire et production d'IL-2.

Comme précisé ci-dessus, l'activation uniquement du TCR n'est pas suffisante pour générer une stimulation efficace des cellules T : d'autres signaux sont essentiels dont ceux de co-stimulation.

b) Co-stimulation

Plusieurs récepteurs/ligands impliqués dans la co-stimulation des cellules T sont décrits, comme représenté sur la **Figure 6**. De la même manière que pour l'engagement du TCR, ces récepteurs exprimés à la surface des cellules T vont reconnaître leurs ligands spécifiques exprimés sur les CPA.

Un des récepteurs essentiels de co-stimulation est CD28 qui est présent à la membrane de la cellule T dont le ligand peut être notamment B7-2 à la membrane d'une CPA immature (n'ayant jamais rencontré de pathogènes) ou B7-1 à la membrane d'une CPA mature.

Selon les récepteurs / ligands impliqués, différentes cascades de signalisation vont être mises en place pour aboutir à différents types cellulaires. Il existe un réel rôle spécifique des molécules de co-stimulation résultant en l'orientation de la différenciation cellulaire. Ainsi, différentes maladies entraînant un déficit immunitaire héréditaire ont été définies par un dysfonctionnement de ces récepteurs/ ligands. On en connaît aujourd'hui 5 liées à un défaut dans les molécules suivantes : CD27, CD40, CD40L, OX40 et SLAM.

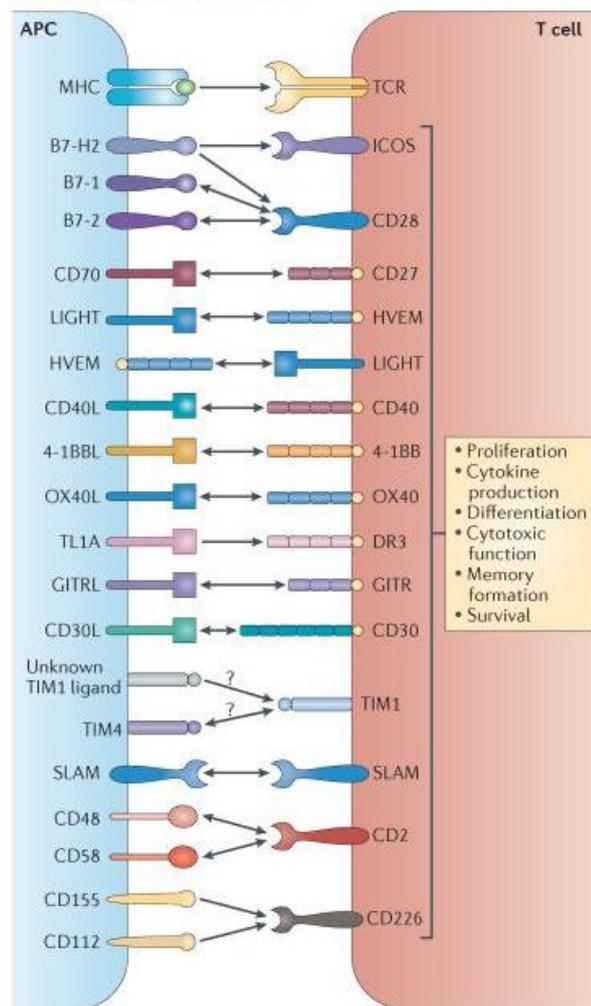


Figure 6. Principaux récepteurs et ligands de co-stimulation chez une cellule T (Chen et Flies 2013)

Les différents couples ligands/ récepteur de molécules de co-stimulation permettent d'engager des actions comme : la prolifération, la production de cytokines, la différenciation etc...

c) Le troisième signal : les cytokines

Les cytokines constituent le troisième signal et peuvent avoir un rôle soit dans la survie/ prolifération, soit dans la polarisation des cellules T. Ainsi, l'induction de la production d'IL-2 est essentielle à la phase de prolifération et représente un facteur de survie essentiel pour les cellules T activées. Par ailleurs, d'autres cytokines, comme par exemple l'IL-4 ou l'IFN γ , vont être responsables de la différenciation des cellules T CD4 en cellules ayant des propriétés spécifiques et je décrirai plus en détails ce processus ci-dessous.

2) Différenciation et sous-populations de cellules effectrices et régulatrices

Les cellules T CD4+ ou CD8+ naïves peuvent se différencier en diverses sous-populations en fonction du type d'antigène impliqué ainsi que l'environnement cytokinique associé à cette activation.

a) La différenciation des cellules T CD8

Les cellules T CD8 reconnaissent des peptides associés aux molécules de CMH de classe I et se caractérisent par leur fonction :

- cytotoxique qui entraîne directement la mort de la cellule cible
- un rôle de production de cytokines pro et anti-inflammatoires (en relation avec les CD4)

La cellule T CD8 naïve (CD8n), présente notamment dans les organes lymphoïdes, est activée par une CPA (3 signaux : TCR, costimulation et cytokines). Elle prolifère et se différencie alors (expression des facteurs de transcription Tbet et Blimp1) en une cellule effectrice cytotoxique (T CD8c). Ces cellules T CD8c peuvent se différencier et proliférer (dans les organes lymphoïdes une première fois et dans les tissus une deuxième fois). Elles expriment aussi des récepteurs aux chimiokines qui leur permettent de migrer vers les organes où ont lieu les agressions mais acquièrent aussi la capacité à sécréter des cytokines pro et anti inflammatoires afin de réguler la réponse immune (IFN γ , TNF α par exemple).

b) La différenciation des cellules CD4

Les lymphocytes CD4 effecteurs sont aussi appelés « helper » (Th). Lors d'une infection par un pathogène, les CPA activent les cellules Th pour qu'ils répondent spécifiquement à ce pathogène. La différenciation en différents lignages de cellules Th et les cytokines sécrétées permettent d'orchestrer la réponse immunitaire. Ces lignages sont générés ou polarisés en fonction de l'affinité du TCR, de la co-stimulation, des cytokines environnantes et d'autres facteurs solubles comme les protéines du complément. Les différentes sous-populations, identifiées à ce jour, sont Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh (T follicular helper) et Treg (regulatory T cell). Elles ont des fonctions propres qui seront présentées ci-après (Golubovskaya et Wu 2016; Raphael et al. 2015 ; Wan et Flavell 2009) (**Figure 7**).

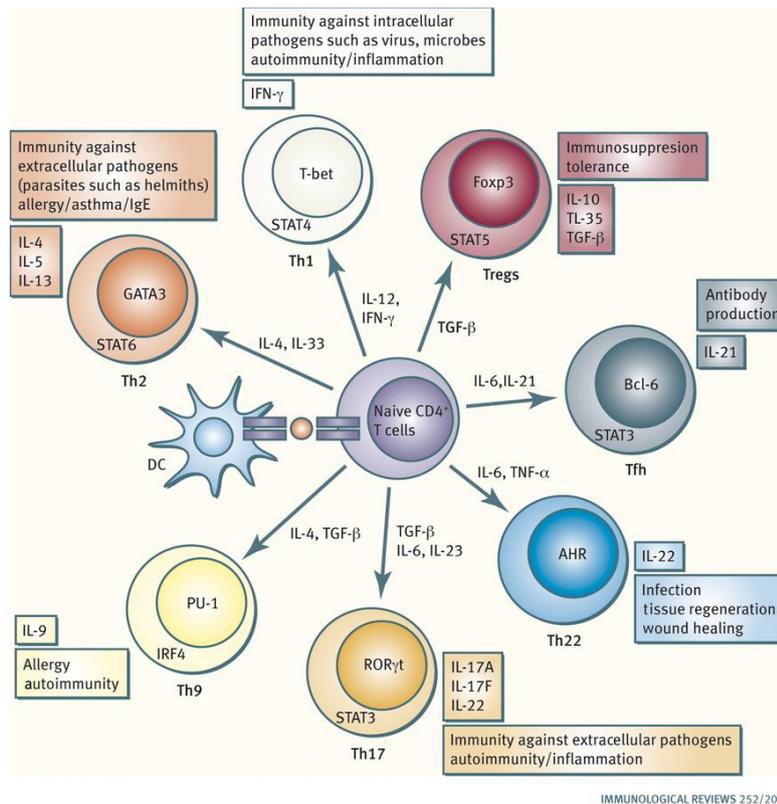


Figure 7. Les différentes sous populations de cellules T CD4 (Jiang et Dong 2013)

Les cellules T CD4 peuvent se différencier en sous populations (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tregs...) lorsque les couples ligands/récepteurs sont engagés et en présence de cytokines spécifiques qui permettent leur différenciation. Ces diverses sous-populations sont caractérisées par les cytokines produites ainsi que l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Tbet, GATA3, ROR γ t, PU-1, Foxp3, Bcl-6, AhR pour les cellules Th1, Th2, Th17, Th9, Treg, Tfh et Th22 respectivement). Ces différentes sous-populations possèdent toutes un rôle différent :

- Th1 : reconnaissance des cellules infectées par des agents pathogènes intracellulaires et auto-immunité
- Th2 : reconnaissance des cellules infectées par des parasites extracellulaires, allergies, maladies atopiques
- Th9 : réponses aux helminthes/parasites, impliqué dans l'asthme et certaines pathologies de la peau
- Th17 : reconnaissance des cellules infectées par des bactéries extracellulaires et auto-immunité
- Th22 : rôle dans l'immunité non clarifié mais semble toutefois associé à des immunopathologies de la peau.
- Tfh : aide à la production d'anticorps de haute affinité par les cellules B mémoires
- Treg : population très distincte des précédentes - fonctions inhibitrices, participent à la tolérance immunitaire

Concernant cette dernière population, les cellules T régulatrices (Treg), il est important de préciser qu'il existe différents types de cellules Tregs (nTregs et iTregs) (**Figure 8**). Notamment, parmi les lymphocytes Tregs les plus étudiés, sont celles d'origines thymiques (CD25+ CD4+ FOXP3+) que l'on appelle les cellules nTregs/tTreg (natural Tregs ou thymic Treg). Elles diffèrent des cellules iTregs qui sont des cellules T régulatrices induites en périphérie : il s'agit ainsi de cellules T naïves (Foxp3-) converties en cellules T régulatrices sous l'effet de différents signaux et qui peuvent se caractériser par l'expression de Foxp3 et/ou la production de certaines cytokines (IL-10, TGFβ par ex, notamment associées aux cellules Tr1 et Th3 respectivement, **Figure 8**).

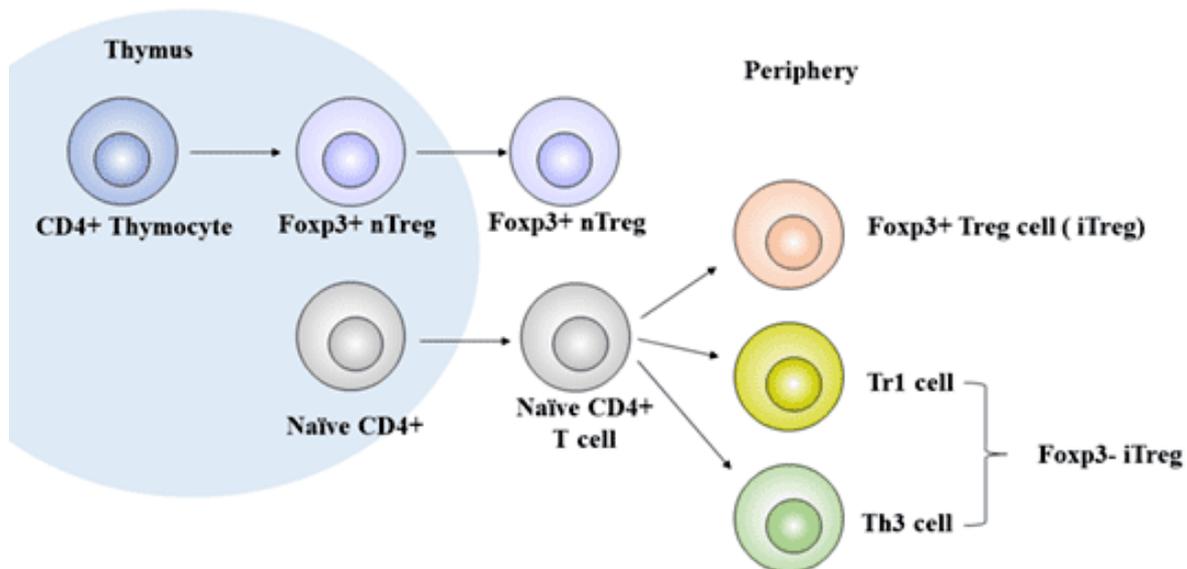


Figure 8. Les différentes cellules Tregs (<https://www.cusabio.com/c-20978.html>)

On peut distinguer au moins deux grandes catégories de cellules Tregs : les cellules Tregs naturelles/thymiques (nTregs, FoxP3+) et les cellules Tregs induites (iTregs exprimant ou non Foxp3).

Ce processus de différenciation permet de spécialiser la fonction des cellules T pour l'adapter au pathogène rencontré.

Il est cependant important de noter qu'il existe une véritable flexibilité et plasticité entre les différentes sous-populations et que la réponse obtenue sera dépendante de l'équilibre entre ces différentes populations.

Par exemple dans le cas d'une tumeur, certaines cellules effectrices favorisent la destruction de cellules tumorales (réponse anti-tumorale) tandis que d'autres, à contrario, favorisent la

prolifération de ces cellules (réponse pro tumorale). En effet, il a été démontré que les cellules Th1 jouent un rôle primordial dans la réponse anti-tumorale en sécrétant de l'IFN γ qui permet notamment d'inhiber l'angiogénèse et donc provoquer la senescence des cellules cancéreuses (Ghiringhelli 2013). Les cellules Tregs, en revanche, sont associées à un rôle pro-tumoral (sécrétion d'IL6, IL-10, TGF β , etc..) et leur présence est en général de mauvais pronostic pour le patient (**Figure 9**) (Bruchard et Ghiringhelli 2014).

Le rôle des Th17 est quant à lui plus controversé mais il semblerait qu'elles puissent avoir un rôle dans la réponse anti-tumorale notamment grâce à la sécrétion d'IL-21 qui augmenterait la fonction anti-tumorale des cellules NK et des cellules CD8c.

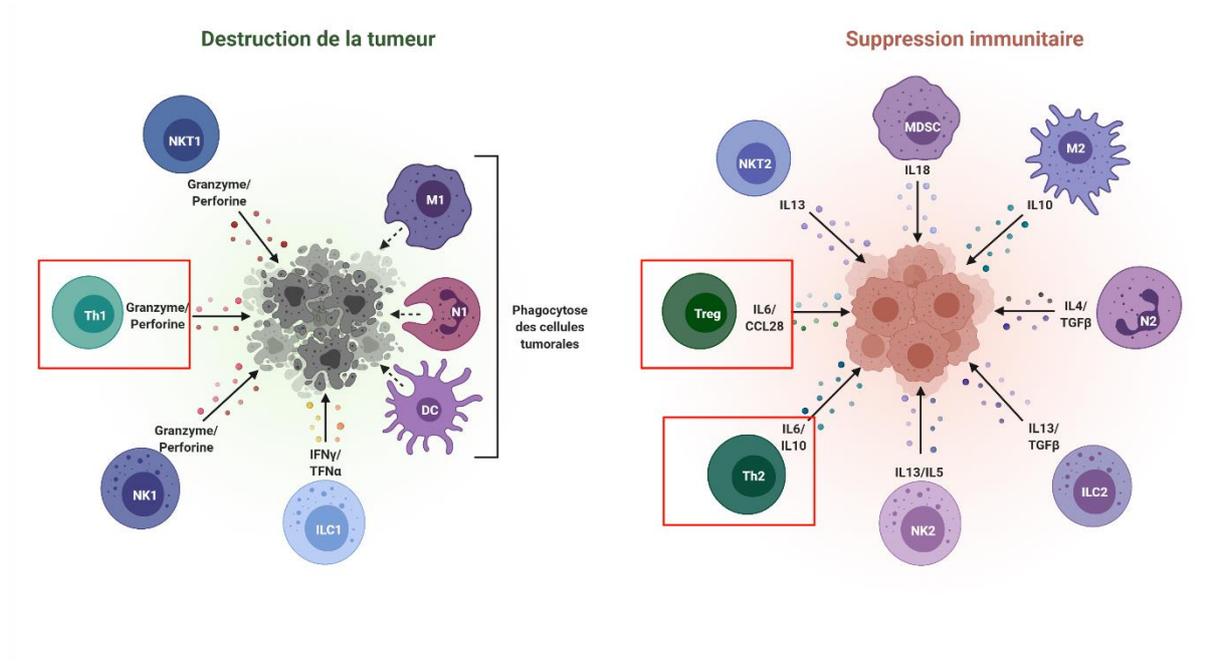


Figure 9. Fonctions pro- et anti-tumorales des cellules immunes.

Sur la gauche, les cellules (Th1 notamment) ont une action anti-tumorale via le relargage de molécules (Granzyme, perforine, IFN γ , TNF α).

Sur la droite, les cellules (Treg notamment) ont une action pro tumorale via la sécrétion d'interleukines principalement (IL-6, IL-10, IL-13, IL-18...)

3) Les cellules T mémoires

Le processus conduisant à la génération des cellules T mémoires est très controversé dans la littérature. En effet, deux modèles sont proposés : le modèle linéaire et le modèle divergent

(Figure 10, Adapté de (Kaech et al. 2002)). Dans le modèle linéaire, les cellules T naïves activées se différencient en cellules effectrices avant qu’une petite fraction de ces cellules ne se différencie ensuite en cellules mémoires. Au contraire, dans le modèle divergent, une partie des lymphocytes naïfs activés suite à la rencontre de leur antigène spécifique se différencie de manière parallèle, soit en cellules mémoires soit en cellules effectrices (van Leeuwen et al., 2009). Cette division asymétrique peut être provoquée en partie par des cytokines sécrétées par les LT effecteurs induisant une signalisation qui permettrait de générer des LT mémoires (Arsenio et al. 2015; Kaech et al. 2002; Löhning et al. 2008).

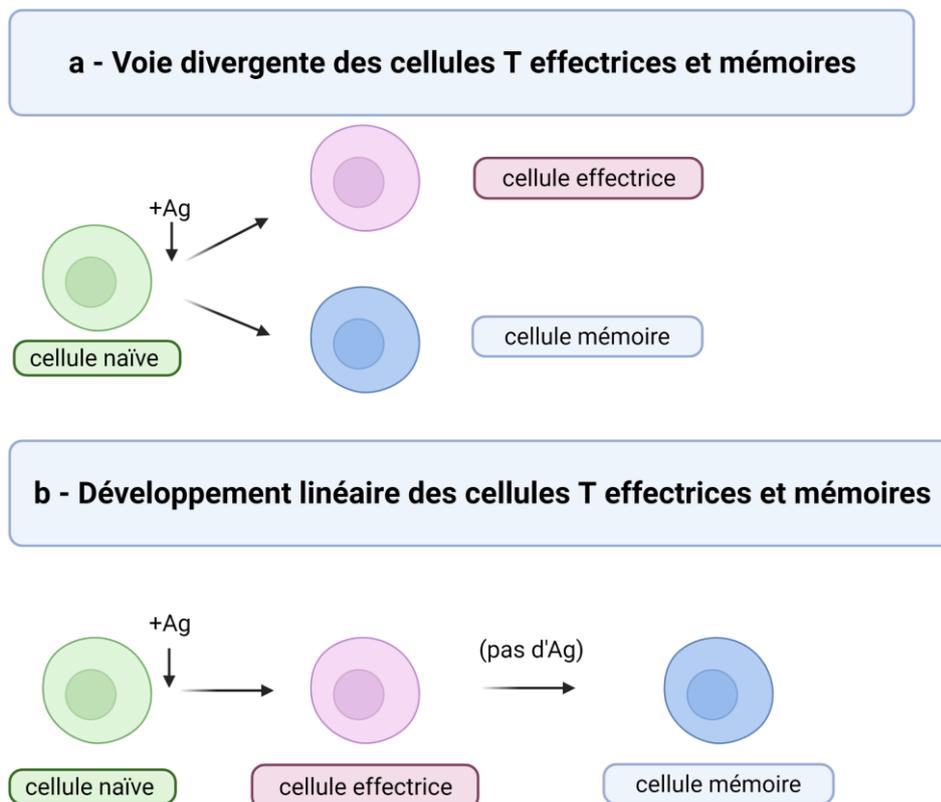


Figure 10. Modèles convergent et linéaire de la génération des cellules T mémoires

La génération des cellules T mémoires est très controversée dans la littérature : deux modèles sont proposés, le modèle convergent (Figure 10 – a) qui implique que la cellule naïve se différencie soit en cellule effectrice soit en cellule mémoire et le modèle linéaire (Figure 10-b) qui implique que la cellule naïve se différencie d’abord en cellule effectrice pour donner ensuite une cellule mémoire.

Un paramètre important caractérisant les cellules mémoires est la différence de cinétique de réponse à leur antigène spécifique en comparaison avec des LT naïfs (Berard et Tough 2002; Jaigirdar et MacLeod 2015; MacLeod et Glen 2017; van Leeuwen, Sprent, et Surh 2009). En effet, les cellules T mémoires ont des contraintes d’activation moins stringentes que les cellules naïves : réponse à l’antigène à des concentrations plus faibles, moins de dépendance aux signaux de co-stimulation et l’expression de certaines molécules comme CD44 et CD54 qui peuvent faciliter les interactions avec les CPA (McKinstry, Strutt, et Swain 2010).

Les cellules mémoires ont une entrée en cycle cellulaire plus rapide que les cellules naïves et ainsi peuvent initier plus rapidement la réplication de leur ADN après activation par le TCR. Finalement, l'acquisition des fonctions effectrices est également plus rapide après l'activation que les cellules naïves et sécrètent d'autres cytokines que l'IL-2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN γ (Berard et Tough 2002; Croft 1994). Cependant, les LT mémoires ne sont pas une population homogène et peuvent être divisées en différents sous types en fonction de leur expression de marqueurs tels que CD45RA, CD45RO, CCR7 ou CD62L (**Figure 11**).

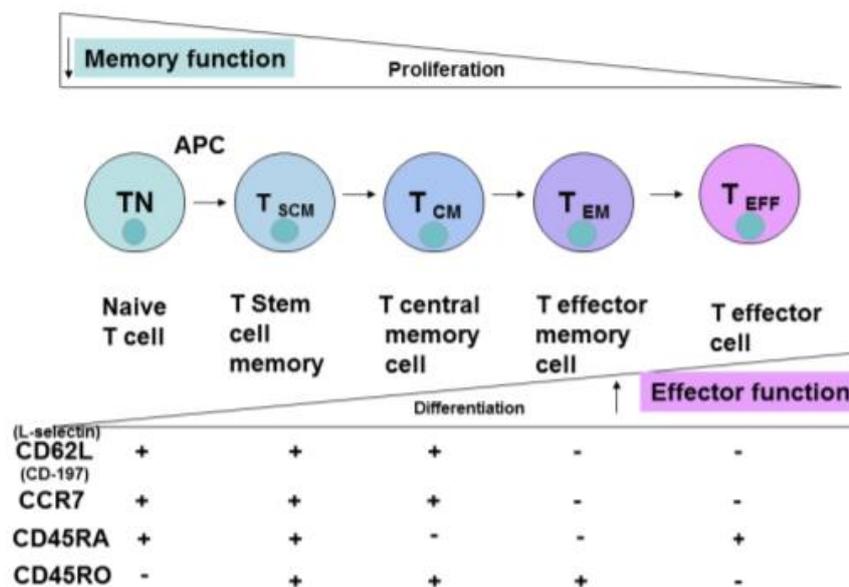


Figure 11. Marqueurs caractérisant les différentes sous populations de cellules mémoires (Vita Golubovskaya et Wu 2016).

Chez l'homme, de manière globale, les cellules mémoires sont identifiées par l'expression du marqueur CD45RO en comparaison avec les cellules naïves exprimant le marqueur CD45RA. Chez la souris, on utilise principalement la surexpression du marqueur CD44.

Différentes populations de cellules mémoires ont donc été décrites :

- les cellules TCM (T centraux mémoires) : principalement localisées dans les organes lymphoïdes secondaires ; fonctions effectrices limitées mais sécrètent de l'IL-2, prolifèrent et se différencient notamment en cellules effectrices après leur re-stimulation suite à un deuxième contact avec le même antigène. Elles sont impliquées dans la protection à long terme contre de nouvelles infections.
- les cellules TEM (T effecteurs mémoires) : principalement localisées dans les tissus récemment infectés. Ces cellules peuvent rapidement produire des cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-4 et l'IL-5 mais ont des capacités de prolifération limitées. Elles sont impliquées dans la réponse immédiate (Lanzavecchia et Sallusto 2005) et empêchent la réplication et la

propagation des agents pathogènes. Cependant, lorsqu'elles arrivent sur le site de l'infection, les cellules TEM peuvent avoir une efficacité limitée face à un pathogène à réplication rapide ou peuvent avoir des difficultés à accéder à certaines régions comme les couches épithéliales par exemple (Mueller et al. 2013).

D'autres sous-populations de cellules mémoires ont également été identifiées :

- Les cellules TRM (T résidant dans les tissus) aussi appelés « sentinelles » : elles ont la particularité de rester dans les tissus périphériques après une infection. Elles représentent donc une première ligne de défense s'il y a une réinfection par le même pathogène, ils peuvent être immédiatement mobilisables (Mueller et al. 2013).

- Les cellules TSCM (T cellules souches mémoires) : Elles ont la particularité d'avoir des propriétés similaires aux cellules souches comme la capacité de se renouveler. C'est une population rare qui a un phénotype se rapprochant des cellules naïves (elles expriment notamment CD45RA, CD62L et CD27) mais qui exprime aussi des marqueurs de cellules souches comme l'antigène de cellule souche 1 (Sca-1). Après stimulation par le TCR, les lymphocytes TSCM se différencient à environ 50% en cellules TCM et 4% en cellules TEM (Gattinoni et al. 2011).

- Les cellules TTM (cellules T mémoires transitoires) : cellules plus différenciées que les lymphocytes TCM (perte du marqueur CCR7) mais moins différenciés que les cellules TEM (présence du marqueur CD28) en termes de phénotype et de degré d'expansion en réponse à l'IL-15 (Mahnke et al. 2013).

Ce répertoire est persistant puisque les cellules T mémoires ont une durée de vie de 1 à 75 ans. Cependant, à un âge avancé, le répertoire s'affaiblit et les personnes deviennent plus sensibles aux réinfections.

IV. Thérapies dans le cadre des immunodéficiences T

Toutes perturbations des mécanismes impliqués dans l'hématopoïèse et plus spécifiquement dans le développement T engendrent des pathologies. Dans cette partie, je m'intéresserai tout particulièrement aux immunodéficiences *i.e.* aux déficits du système immunitaire entraînant une incapacité de l'organisme à répondre efficacement contre une maladie infectieuse ou à un cancer. La plupart des cas d'immunodéficiences sont des immunodéficiences acquises par des facteurs extrinsèques comme, par exemple, des infections virales ou des traitements chimio-thérapeutiques ou de radiothérapies. On parle dans ce cas-là d'immunodéficiences secondaires en opposition aux immunodéficiences primaires que je développerai plus spécifiquement dans un premier temps.

1) Les immunodéficiences primaires

Les immunodéficiences primaires (PID, Primary ImmunoDeficiency) sont liées à des facteurs génétiques et sont généralement autosomales récessives. Elles peuvent être soit monogéniques, soit multifactorielles avec l'implication de plusieurs gènes et de facteurs environnementaux. La majorité des PID ne sont diagnostiquées qu'à l'âge adulte sauf les cas les plus sévères qui sont diagnostiquées dès l'enfance. Le développement d'auto-immunité et de cancer est fréquemment associé aux PID, mais elles ont toutes pour conséquence une susceptibilité accrue aux infections opportunistes, et ce, indépendamment des acteurs du système immunitaire qui sont affectés (Notarangelo 2010). Les PID sont donc catégorisées en fonction du type de cellules déficientes du système immunitaire. On identifie ainsi les PID présentant un déficit au niveau des cellules T, des cellules B, des phagocytes, des immunoglobulines (Ig), des récepteurs de cytokines, du système du complément ou bien encore aux niveaux de plusieurs de ces types cellulaires. Au cours de mon travail, je me suis intéressée à un groupe particulier de déficiences en cellules T, les déficits immunitaires combinés sévères.

a) Les déficits immunitaires combinés sévères

Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) sont des maladies monogéniques rares caractérisées notamment par l'absence ou la non-fonctionnalité des cellules T mais qui peuvent être également associées à un défaut en cellules B et/ou NK. Les DICS sont ainsi classifiées en fonction de la présence de ces populations en différents groupes :

Gène Muté	Fonction	Phénotype	Mode de transmission	Fréquence relative (%)
γc	récepteur cytokinique	T- B+ NK-	lié à l'X	45
ADA	enzyme	T- B- NK-	autosomale récessif	15
IL-7Rα	récepteur cytokinique	T- B+ NK+	autosomale récessif	11
RAG-1/2	recombinaison VDJ	T- B- NK+	autosomale récessif	15
Artemis	recombinaison VDJ	T- B- NK+	autosomale récessif	
LIG4	recombinaison VDJ	T- B- NK+	autosomale récessif	rare
Cerrunos	recombinaison VDJ	T- B- NK+	autosomale récessif	rare
JAK3	kinase (transduction signal)	T- B+ NK-	autosomale récessif	10
CD45	phosphatase (transduction signal)	T- B+ NK-	autosomale récessif	<1
CD3-δ/ε/γ/ζ	chaîne de récepteur d'antigène (TCR)	T- B+ NK+	autosomale récessif	<1
ZAP-70	kinase (transduction signal)	T- B+ NK+	autosomale récessif	<1
AK2	kinase (phosphorylation mitochondriale)	T- B+ NK-	autosomale récessif	<1

Tableau 1. Les principaux DICS identifiés à ce jour (non exhaustif).

Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) sont classés en fonction de la présence ou non de cellules T, de cellules B et de cellules NK. Une seule immunodéficiency est liée à l'X (gonosomale) tandis que les autres sont autosomales et récessives.

Due à l'absence de ces cellules immunitaires cruciales, chez les DICS, la maladie est généralement décelée dans les premiers mois de l'enfant suite à un retard staturo-pondéral et au développement de problèmes de santé tels que des diarrhées très fréquentes, des

pneumonies, des candidoses, et d'autres infections persistantes causées notamment par des pathogènes opportunistes et pouvant conduire au décès en l'absence de traitement. Le statut immunitaire de ces enfants conduit au traitement des infections opportunistes (traitements anti-viraux, anti-fongiques etc...) et à leur isolement en chambre stérile. Ces traitements sont cependant uniquement prophylactiques, mais il existe aujourd'hui plusieurs traitements face à ces maladies dont le principal est la transplantation de cellules souches hématopoïétiques que je développerai ultérieurement.

A ce jour, seize gènes différents ont été associés aux DICS, mais cette liste est en évolution constante, de nouveaux gènes étant régulièrement identifiés. Les gènes identifiés à ce jour sont des gènes impliqués à différents niveaux dans l'hématopoïèse, soit à un stade développementale précoce, dans la moelle osseuse, soit à un stade plus tardif lors du développement thymique (**Figure 12**).

Les mutations génétiques les plus courantes sont retrouvées dans :

- Le gène codant la chaîne commune γ de certains récepteurs aux cytokines, molécule indispensable au développement des cellules lymphoïdes T et NK. 40 à 50% des cas de DICS sont associés à des mutations dans ce gène localisé sur le chromosome X ce qui explique que ce soit principalement les garçons qui en soient atteints.
- Le gène codant l'adénosine désaminase (*ADA*) dont l'absence provoque notamment la mort des lymphocytes T. Les mutations associées à ce gène localisé sur le chromosome 20 sont retrouvées dans environ 15% des cas de DICS. Cette pathologie a la particularité de pouvoir être traitée par une enzyme de remplacement.
- Le gène codant une des recombinaisons *RAG 1* ou *RAG 2* dont la mutation entraîne une absence de lymphocytes B et T.

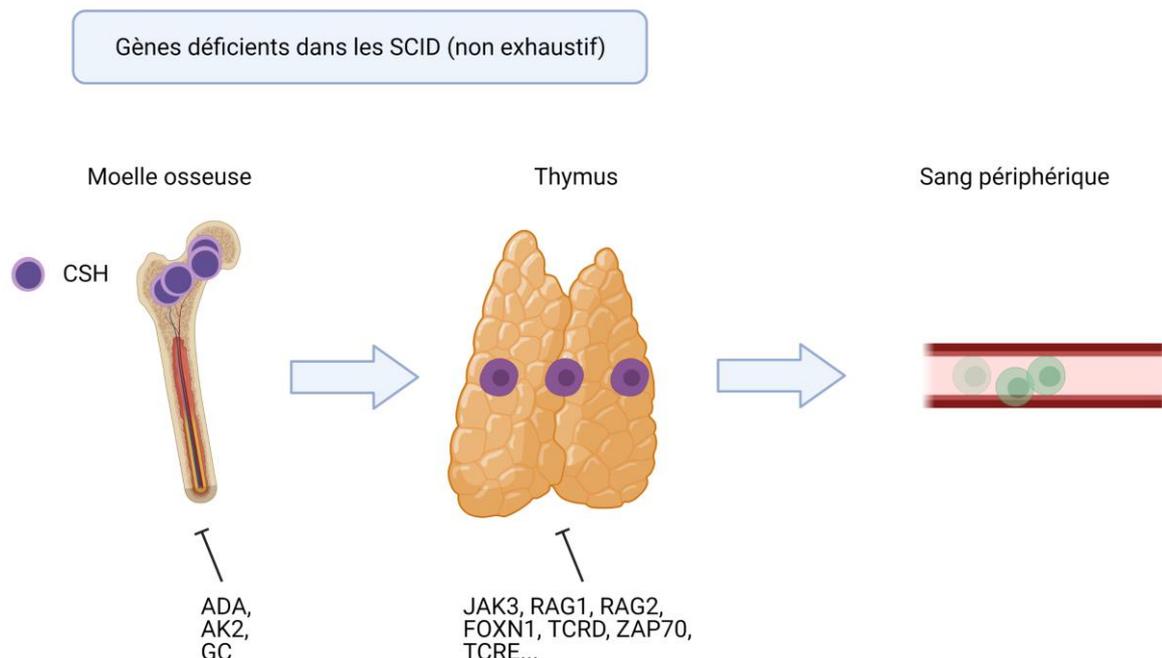


Figure 12. Les différents gènes déficitaires chez les DICS (non exhaustif) adapté de (Pouzolles 2018)

Il peut y avoir des déficiences à différents niveaux (moelle osseuse, thymus...) et différentes déficiences (RAG, JAK...) qui entraînent toutes des DICS mais de différentes manières (présence de cellules T mais non fonctionnelles, absence de cellules T...)

Comme mentionné précédemment, il existe des déficiences immunitaires sévères dues à un problème dans la différenciation des cellules T en raison notamment de l'absence ou du dysfonctionnement d'un des acteurs clé comme CD3, LCK... C'est le cas de l'immunodéficience liée à ZAP70, modèle utilisé dans le laboratoire comme paradigme pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des DICS.

b) Le cas des immunodéficiences en ZAP70

Une partie des patients atteints de DICS sont déficients en ZAP70, une protéine tyrosine kinase impliquée dans la transduction du signal après activation du TCR (voir paragraphe 3.1.a). Il s'agit d'une pathologie récessive autosomale et bien que les chiffres ne soient pas connus, on estime que la fréquence de cette pathologie représente moins de 1% des DICS dont la prévalence est déjà d'environ 1/50.000 personnes. De par le rôle de ZAP-70 dans la signalisation du TCR, son absence ou dysfonctionnement affecte non seulement la réponse périphérique des cellules T mais également leur développement au niveau de la sélection positive. Ainsi, chez la souris, la déficience en ZAP-70 est caractérisée par une lymphopénie complète en cellules T caractérisée par un arrêt du développement T au stade Double Positif, avant la sélection positive (**Figure 13**). Chez l'homme, le blocage est plus tardif et les patients atteints d'une déficience en ZAP70 sont caractérisés par une lymphopénie en cellules T CD8+ et la présence de cellules T CD4+ non fonctionnelles (Roifman et al. 1989; Arpaia et al. 1994).

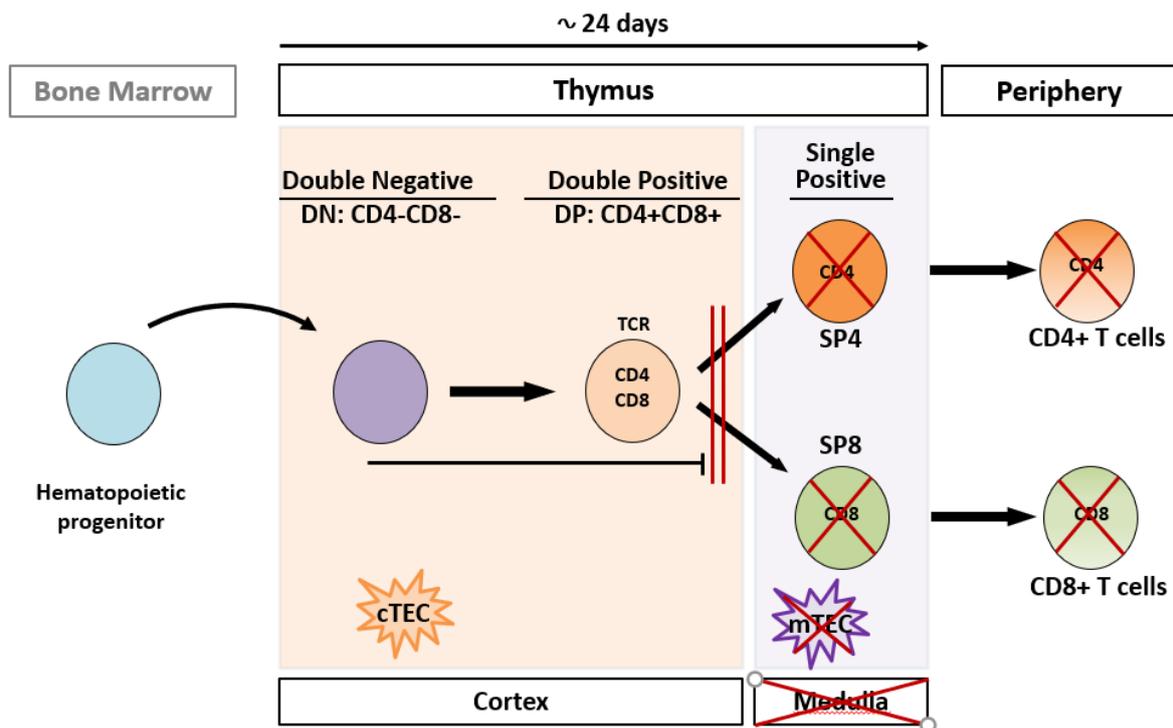


Figure 13. Blocage au cours du développement T dû à l'absence de ZAP 70 dans la différenciation thymique murine

Une déficience en ZAP 70 entraîne un blocage au niveau de la différenciation thymique au niveau du stade DP et ne peuvent plus se différencier.

c) Les traitements des DICS

Il existe aujourd'hui deux thérapies principales dans le cadre du traitement des DICS : La thérapie génique, que je ne développerai pas ici, et la thérapie cellulaire, sur laquelle je vais me concentrer pour la suite de mon mémoire.

La thérapie cellulaire a su prouver son efficacité car il est aujourd'hui possible de réaliser une transplantation par voie intraveineuse de cellules souches hématopoïétiques saines afin de reconstituer le système immunitaire d'un patient (**Figure 14**) avec, lors d'une greffe avec un donneur compatible, un taux de réussite de 96% sur le long terme (supérieur à 10 ans) d'après l'Agence de Biomédecine. Pendant longtemps, la seule technique pour prélever les CSH du donneur était le prélèvement de moelle osseuse dans l'os iliaque sous anesthésie générale. Il existe aujourd'hui deux techniques de prélèvement de CSH : la technique du prélèvement direct dans l'os (qui est de moins en moins utilisée) et la technique par prélèvement sanguin (aphérèse) après injection de facteurs de croissance hématopoïétique tels que le G-CSF OU GM-CSF entraînant la sortie des CSH de la moelle osseuse dans le sang (de plus en plus utilisée). La technique de prélèvement n'est pas choisie par le donneur mais par le médecin responsable de la greffe selon différents critères. La technique par prélèvement sanguin a été une grande avancée dans le monde médical puisqu'elle est moins invasive (pas d'anesthésie

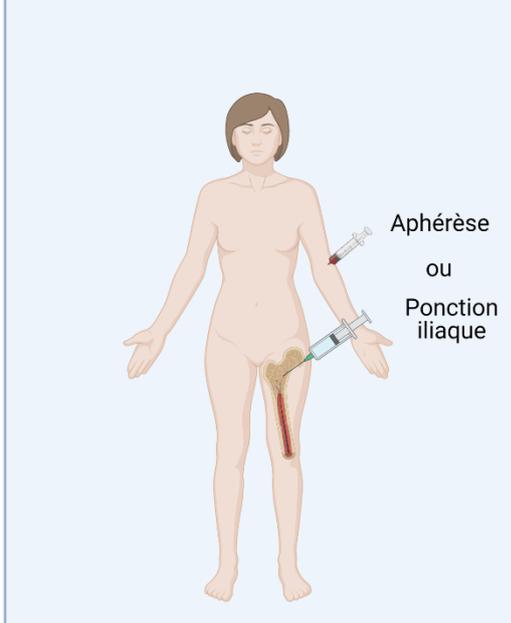
générale) et nécessite moins de temps d'hospitalisation (4h pour le prélèvement sanguin contre 48h pour la ponction de moelle osseuse).

Cependant, la thérapie cellulaire possède aussi ses limites comme le temps de reconstitution d'un compartiment de cellules T polyclonales (supérieur à 100 jours) et le manque de donneurs compatibles. En effet, lorsque le patient n'est pas greffé avec les CSH d'une personne compatible, le risque d'échec augmente, notamment à cause d'un risque de rejet accru ou de développement de GVHD (maladie du greffon contre l'hôte). Or, la plupart des greffes sont réalisées en greffes haploïdes (haplo-identiques : membre de la famille semi-compatible). Afin d'améliorer l'efficacité de ces transplantations, elles sont généralement réalisées après un conditionnement par chimiothérapie (voir paragraphe IV 2a). Cependant, ces derniers présentent également une toxicité et de nouveaux traitements basés notamment sur l'utilisation d'anticorps déplétants sont en cours d'investigation (Gennery 2019; Straathof et al. 2009; Czechowicz et al. 2007).

Les CSH du donneur sont transplantées chez le patient via la voie sanguine (en intraveineux) et comme indiqué ci-dessus, le temps de reconstitution d'un compartiment polyclonal T reste long (<100 jours). Une hypothèse expliquant ce délai serait que les cellules souches, une fois dans le sang, se dirigeraient d'abord vers la moelle osseuse, leur environnement naturel, pour suivre le processus classique de différenciation. Les progéniteurs en ayant la capacité migreront ensuite vers le thymus. Cependant il a été montré que ce dernier était aléatoirement réceptif à l'entrée de progéniteurs (Foss, Donskoy, et Goldschneider 2001; Donskoy, Foss, et Goldschneider 2003). Ainsi la différenciation des cellules T pourrait être retardée. Les patients restants susceptibles aux infections pendant cette période, il reste donc nécessaire d'améliorer ces traitements. C'est pourquoi, lors de la première partie de mon projet je me suis intéressée au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour ces maladies en me focalisant sur l'amélioration de la reconstitution du système immunitaire en cellules T par le ciblage directement dans le thymus des CSH (voie intra thymique, IT), la différenciation dans ces circonstances devant être plus directe et le temps de reconstitution, de ce fait, réduit.

Thérapie cellulaire

Etape 1 : Prélèvement de CSH du donneur



Etape 2 : Transfert dans CSH du donneur chez le patient receveur (par intraveineuse)



Figure 14. Thérapie Cellulaire

Le donneur est prélevé par aphérèse ou ponction iliaque afin de récolter les CSH saines. Les CSH saines sont transplantées chez le donneur par perfusion (intraveineuse) afin de reconstituer son système immunitaire.

2) Les immunodéficiences induites

Les immunodéficiences induites peuvent être obtenues de deux manières : soit par infections virales, soit par conditionnement. Ici, je me concentrerai uniquement sur les immunodéficiences induites par conditionnement.

a) Le conditionnement

Initialement, le conditionnement a été mis en place pour deux raisons : afin de combattre la tumeur dans le cadre d'un cancer (thérapie curative), ou afin d'ôter les cellules de l'hôte restantes pour générer un « espace » permettant l'expansion des cellules donneuses injectées et éviter les rejets de greffes dans le cadre des transplantations de CSH (thérapie adjuvante). Dans le cas d'hémopathies malignes, le conditionnement est donc utilisé non seulement pour son rôle direct dans la mort tumorale mais aussi pour contribuer à une meilleure réponse immune. Il apparaît toutefois que les effets générés sont bien plus complexes.

Il existe deux types de conditionnements : la radiothérapie et la chimiothérapie qui seront choisies en fonction de différents paramètres tels que le type de patient (femme, homme, âgé, jeune) et la nature de la maladie (cancer, immunodéficience) par exemple. Mais beaucoup d'autres paramètres entrent en jeu et choisir un traitement reste compliqué. Les différents conditionnements par chimiothérapie sont classés selon leurs actions : lymphopéniques ou myéloablatifs, selon leurs doses (plus ou moins fortes pouvant aller jusqu'à létale). Ces traitements sont lourds et ont de nombreux effets secondaires (chute de cheveux, nausées, diarrhées...). Il est possible de croiser différents conditionnements afin d'obtenir de meilleurs résultats car il a été prouvé que deux personnes ayant la même pathologie au même stade peuvent réagir différemment aux mêmes traitements. Ainsi, le rythme circadien est décrit comme un paramètre à prendre en compte pour ce type de traitements (chimiothérapie) (Li et al. 2013). En effet, la toxicité d'un traitement par chimiothérapie peut-être 5 fois moins élevée et l'efficacité du traitement peut doubler selon l'heure à laquelle le patient est traité. Cependant, pour diverses raisons, il est impossible à l'heure actuelle de mettre en place une médecine personnalisée (chronothérapie) en France. Je rentrerai maintenant plus en détails sur les 2 types de conditionnements principaux.

b) La chimiothérapie

La chimiothérapie est une technique médicamenteuse ayant pour but de cibler et éliminer les cellules cancéreuses. Il existe différentes méthodes d'administration comme l'injection (site implantable, cathéter) ou la prise par voie orale (*per os*, PO). Les patients peuvent être hospitalisés ou non le temps de la chimiothérapie. La durée de la chimiothérapie et le mode d'administration sont choisis selon différents critères par le médecin. Les effets secondaires possibles sont nombreux mais ne dépendent pas du bon fonctionnement du traitement.

La chimiothérapie est un immunomodulateur qui peut avoir 3 actions principales possibles :

- l'induction de l'apoptose sur les cellules cancéreuses
- l'amélioration de l'amorçage croisé des antigènes tumoraux
- l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I

Il existe différentes chimiothérapies classées par leur mode d'action. On retrouve donc les agents alkylants (cytotoxiques), les anti-métabolites (empêchent la prolifération des cellules cancéreuses) et les traitements hormonaux (notamment dans le cadre de cancer du sein).

Dans le cadre de mon projet, j'ai utilisé deux agents de chimiothérapie pour une chimiothérapie combinée : le Busulfan® et la Cyclophosphamide®. Cette association est utilisée principalement dans le cadre d'un conditionnement avant transfert de CSH.

La cyclophosphamide est un agent de la famille des alkylants et elle possède un rôle immunosuppresseur et lymphopénique (il n'est que très peu myéloablatif). Il a été démontré que la cyclophosphamide favorise la maturation des cellules dendritiques, induit la production d'interféron et diminue le nombre de lymphocytes Tregs (en régulant l'expression de FOXP3 et GITR).

Le Busulfan®, quant à lui, est aussi un agent alkylant immunosuppresseur mais myéloablatif. Il diminue donc significativement le nombre de cellules B et élimine les cellules myéloïdes et les cellules progénitrices. Il favorise ainsi la prise de greffe des cellules progénitrices injectées.

La chimiothérapie peut être réalisée seule et on parle alors de chimiothérapie exclusive ou cumulée avec de la radiothérapie, et on parle alors de radio-chimiothérapie.

c) La radiothérapie

La radiothérapie est une méthode non médicamenteuse mais utilisant les radiations. On peut parler de deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe (décrite ci-après) et la curiethérapie qui consiste à irradier la tumeur en mettant la source radioactive à l'intérieur, au plus proche de la tumeur. La radiothérapie externe peut être appliquée de deux manières : de façon ciblée (afin de détruire une tumeur locale) ou de manière globale/généralisée afin de créer un environnement lymphopénique. Le principe de la radiothérapie est d'envoyer des radiations au niveau des cellules afin de casser leur ADN et ainsi, les faire entrer en mort cellulaire.

Il reste donc encore beaucoup de questions en suspens et notamment la question de l'impact du pré-conditionnement sur le devenir et la fonction des cellules T injectées.

V- Pre-conditionnement dans le contexte des immunothérapies anti-tumorales utilisant le transfert adoptif de cellules T

Ces 10 dernières années, les immunothérapies dans le cadre de cancers ont connu un réel essor car les connaissances ne cessent d'augmenter.

Dans le cadre de traitements pour le cancer, comme dans le cadre de la greffe de CSH chez les DICS, un conditionnement est utilisé. Cependant, dans le contexte du traitement anti-tumoral, de nouvelles approches thérapeutiques ont vu le jour ces dernières années et le conditionnement ne permet pas seulement de réduire la masse tumorale. En effet, le but est de réduire la tumeur mais aussi de « créer de l'espace » afin de potentiellement transférer des cellules qui pourraient directement viser la tumeur et la réduire. C'est le cas notamment des traitements par cellules T CAR ou par TILs détaillés ci-dessous.

a) Les TILs (Lymphocytes Infiltrant la Tumeur)

La thérapie cellulaire par transfert adoptif de lymphocytes infiltrant la tumeur est une thérapie récente qui consiste à récupérer les lymphocytes se trouvant dans l'environnement tumoral afin de les sélectionner, les amplifier et les réinjecter. Cette technique est accompagnée d'un conditionnement par chimiothérapie et se décompose en plusieurs parties. Le patient subit tout d'abord une résection chirurgicale de la tumeur afin de récupérer un nombre suffisant de cellules T infiltrantes. Ces cellules sont ensuite séparées des cellules tumorales,

sélectionnées pour leur capacité à reconnaître un antigène tumoral, amplifiées en présence d'IL-2 et seront ensuite réinjectées chez le patient dans les 24 à 48H suivant la fin du traitement sous haute surveillance. Les jours suivants, le patient reçoit par perfusion de l'IL-2 à forte dose afin de soutenir l'action des cellules spécifiques de la tumeur, en plus grand nombre cette fois-ci, afin de la combattre (**Figure 15**). Ce système n'est par conséquent pas sans risque. En effet, le taux de mortalité est estimé à 1-2% et les effets secondaires sont nombreux (hypotension, œdème, frissons, état fébrile...). Cette approche a plusieurs limites incluant le taux de cellules T infiltrant la tumeur, la capacité de les isoler ensuite et également leur expansion *ex vivo* qui peut être problématique.

Une autre approche a ainsi été développée pour palier à certaines de ces limites : la Thérapie par cellules CAR T.

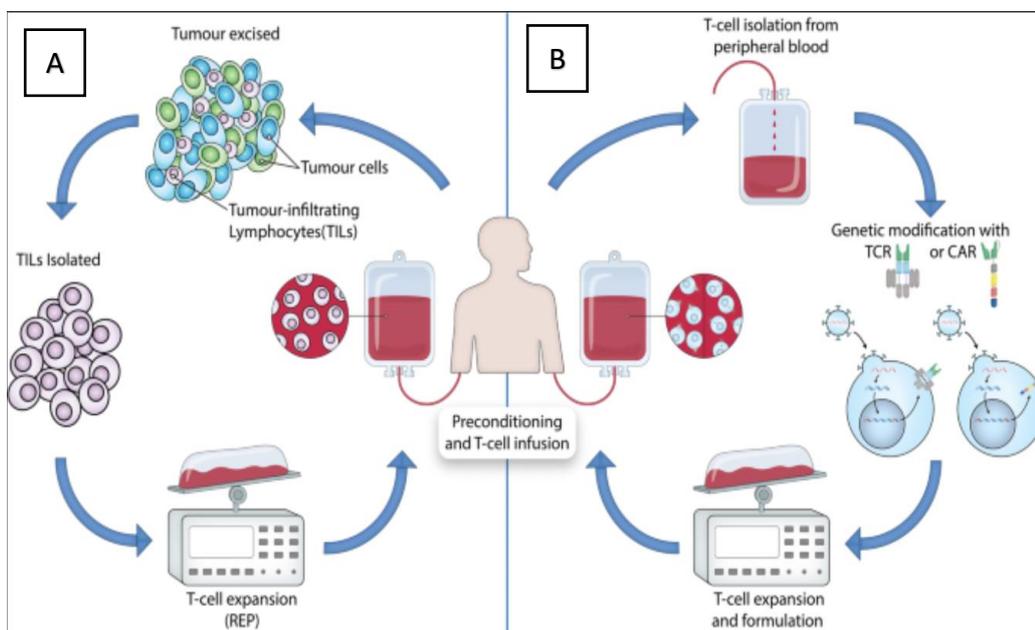


Figure 15. Immunothérapies anti-tumorales utilisant le transfert adoptif de cellules T

A – La thérapie par TILs : La tumeur est excisée puis les cellules T infiltrantes sont isolées, cultivées et amplifiées afin d'être réinjectées chez le patient.

*B- La thérapie par cellules CAR-T : Les cellules T du patient sont isolées à partir du sang circulant, avant d'être modifiées *ex vivo* pour générer des cellules exprimant le récepteur reconnaissant spécifiquement un antigène tumoral donné (cellules CAR-T). Après une phase d'expansion, cellules CAR-T sont réinjectées chez le patient.*

b) La thérapie CAR (Chimeric Antigen Receptor)

Dans cette approche les cellules T du sang circulant du patients sont prélevées et modifiées *ex vivo* pour induire l'expression de molécules CAR (Chimeric Antigen Receptor-T Cells) spécifiques d'un antigène tumoral. Ces cellules CAR-T sont ensuite multipliées *ex vivo* et réinjectées chez le patient (Mondino et al. 2010) (**Figure 15**).

Comme mentionné précédemment, ces thérapies sont accompagnées d'un pré-conditionnement du patient. La nature du conditionnement, ou la manière dont la lymphopénie est induite, peut ainsi impacter le devenir des cellules T réinjectées et c'est dans ce contexte que je me suis intéressée dans la deuxième partie de mon projet à l'impact du conditionnement (radiothérapie vs chimiothérapie) sur le devenir /fonction des cellules T injectées.

Objectifs

Au cours de mon diplôme, je me suis donc intéressée à l'amélioration d'approches de thérapie cellulaire dans deux contextes pathologiques : les DICS et le cancer. Pour cela, je me suis focalisée, d'une part, sur les cellules T et d'autre part sur l'impact de leur environnement pour leur développement et fonction en périphérie. C'est donc un projet s'organisant en deux parties :

- 1- Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre d'immunodéficiences en cellules T grâce au ciblage direct du thymus.
- 2- Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale par transfert adoptif de cellules T : Impact du conditionnement sur le devenir /fonction des cellules T injectées.

D'autre part, j'ai pu apporter ma contribution sur un autre projet du laboratoire s'intéressant au rôle du métabolisme et en particulier de l'alpha cétooglutarate dans la polarisation des cellules T et ses possibles conséquences thérapeutiques. Dans ce contexte, j'ai développé et mis en place un modèle tumoral (développement de cellules bioluminescente pour un suivi en imagerie). Enfin l'ensemble de mes projets étant liés à différents modèles murins, j'ai également été impliquée dans la gestion de ces différentes lignées murines (accouplements, phénotypage, SBEA).

Matériel et Méthodes

Comme indiqué ci-dessus, mes projets ont nécessité le recours à différents modèles murins et toutes les expériences ont été effectuées en respectant le bien-être animal selon les lois éthiques européennes. Tous les protocoles ont été pensés et réfléchis de façon à respecter la règle des 3R et le décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

I. Modèles murins

Plusieurs lignées de souris ont été nécessaires au développement de mes projets.

- ✓ Modèle ZAP70^{-/-} (KO) : Il s'agit d'un modèle de souris immunodéficientes en cellules T, portant une mutation dans le gène codant ZAP70.
- ✓ Modèle RAG^{-/-} (KO) : Il s'agit d'un modèle de souris immunodéficientes en cellules B et T disponible commercialement.
- ✓ Modèle CARF38 (Tg) : Il s'agit d'un modèle transgénique exprimant un CAR (Chimeric Antigen Receptor) dirigé contre l'antigène Erb2 sur toutes les cellules immunes.
- ✓ Modèle FOXP3 GFP (KI) : Modèle de souris « reporter » pour l'expression du facteur de transcription associé aux cellules T régulatrices, FOXP3 (cassette IRES GFP insérée sous le contrôle du promoteur FoxP3).
- ✓ Les souris C57BL/6J-CD45.1 et C57BL/6J-CD45.2, disponibles commercialement (Charles River) ont été utilisées dans ce projet : Il s'agit de deux lignées murines sauvages (immunocompétentes) et congéniques (génétiquement identiques pour tous les locus sauf 1) pour le marqueur CD45. Cette spécificité nous permet ainsi, dans le cadre du transfert de cellules hématopoïétiques, de suivre sur la base de l'expression de CD45.1 et/ou CD45.2, les cellules du « donneur » et celles du receveur.

II. Description des lignées murines

Les différentes lignées murines ne peuvent pas être maintenues de la même manière. Ainsi, certaines sont maintenues à l'état homozygote tandis que d'autres sont maintenues à l'état hétérozygote. Dans le cadre des différents projets, nous avons aussi été amenés à créer nos propres lignées (**Tableau 2**).

Nom de la lignée	Génotype de la lignée	Maintien de la lignée
CD45.1	+/+	WT homozygote
CARF38 x Foxp3	(Tg/+) x (KI/KI)	Tg hétérozygote
ZAP70	-/-	KO homozygote
RAG 2 KO	-/-	KO homozygote
FOXP3	KI/ KI	KI homozygote
CD45.1 x FOXP3	(+/-) x (KI/KI)	homozygote
CARF38 x CD45.1 x FOXP3	(Tg/+) x (+/-) x (KI/KI)	Hétérozygote (pour le CARF38)
CD11cDOG	(Tg/+) ou (Tg/Tg)	Hétérozygote x C57BL6/J ZEFI / Homozygote PCEA
C57BL6/J	+/+	Non maintenue (commerciale)
OT1	Tg/+	Tg hétérozygote x C57BL6/J
OT2	Tg/+	Tg hétérozygote x C57BL6/J
OT1 x LY5.1	(Tg/+) x (+/+)	Tg hétérozygote
OT2 x LY5.1	(Tg/+) x (+/+)	Tg hétérozygote
CARF38	(Tg/+) x (+/+)	Tg hétérozygote x C57BL6/J

Tableau 2. Lignées de l'équipe

Il existe différentes raisons pour lesquelles on ne peut maintenir une lignée en homozygote mais la principale reste la dérive génétique. C'est notamment le cas de la lignée CARF38.

Ainsi, lorsque la lignée est maintenue en hétérozygote, elle doit être phénotypée de la même manière que le suivi de la reconstitution (Paragraphe V- A) afin de savoir si l'animal possède ou non le bon phénotype.

III. Transfert de cellules T dans des souris conditionnées (environnement lymphopénique induit)

1) Isolement cellulaire et marquage CTV ou CFSE avant transfert adoptif

Concernant le projet BuCy, les cellules issues des animaux donneurs ont été isolées des ganglions lymphatiques de souris CD45.1⁺C57BL/6. Pour suivre leur prolifération, les cellules sont marquées avec le marqueur CFSE (Life Technologies ; 2,5 µM) ou le marqueur CTV (Life Technologies ; lyophilized powder + DMSO) pendant 8 à 10 minutes à 37°C. Les réactions sont arrêtées avec du PBS glacé et on procède ensuite rapidement à l'injection par voie intra-orbitale (i.o) de ces cellules dans les animaux receveurs pré-conditionnés ou non.

Les cellules ont aussi été triées par cytométrie en flux (FACS Aria) selon le projet. Les cellules T naives sont triées grâce à l'expression de CD62L hi CD44- CD25-. Les cellules T sans cellules Treg (CD25+) sont triées via cellules T totales CD3+ versus CD3+CD25

2) Transfert adoptif dans souris receveuses pré-conditionnées

Les souris CD45.2⁺C57BL/6 ont été irradiées avec une dose sub-létale (5.5 Gy) ou conditionnées avec chimiothérapie avec du Busulfan® (16,5 mg/kg, 2 fois par jour pendant 2 jours ; Inresa Pharma, Bartenheim, FR) suivi d'une injection de Cyclophosphamide® (200

mg/kg pendant 1 jour ; Sigma). Des souris Rag KO ont également été utilisées comme souris receveuses pour contrôle. Vingt-quatre à trente-six heures après le conditionnement, les souris receveuses ont reçu des injections intra-orbitales (IO) de cellules CD45.1⁺C57Bl/6 préalablement marquées par le marqueur de prolifération CFSE ou CTV (5 x 10⁶ cellules/souris). Les animaux sont ensuite sacrifiés aux moments indiqués et les ganglions lymphatiques et la rate sont récoltés pour être analysés par cytométrie en flux. Pour les injections IO, une anesthésie est réalisée sous isoflurane 2.5% et 1.5l/min d'air (Minihub®, TEM SEGA®).

IV. Transfert de cellules souches hématopoïétiques dans des souris non conditionnées SCID (environnement lymphopénique génétique)

1) Tri magnétique (pour la purification des CSH)

a) Projet Thymique

Afin de purifier les cellules progénitrices hématopoïétiques réinjectées dans le cadre d'une transplantation de CSH, les cellules ont été prélevées post mortem sur les tibia et fémur de souris CD45.1⁺C57Bl/6 puis purifiées selon le protocole préconisé avec un kit de déplétion des différents lignages hématopoïétiques T, B, myéloïdes, érythroïdes (kit de déplétion de lignages, Dynal). Ce kit permet une sélection négative afin de ne pas modifier la forme ou le phénotype des cellules à réinjecter.

b) Projet tumeurs 24JKERB

Pour les expériences d'injection de cellules tumorales, les cellules T CD4⁺ murines ont été purifiées à l'aide du kit de sélection négative MACS (Miltenyi Biotec) pour cellules T CD4⁺ et les cellules T CD4⁺ naïves des souris transgéniques ERBB2-CAR. Les cellules Foxp3-GFP ont ensuite été triées sur la base d'un profil d'expression CD4⁺CD8⁻CD62L⁺CD44⁻GFP⁻CD25⁻ par cytométrie en flux.

L'activation des cellules T a été réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux α -CD3 (clone 145-2C11, 1 μ g/ml) et α -CD28 (clone PV-1, 1 μ g/ml) immobilisés sur une plaque 24 puits et dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies) complété par 10 % de FCS, 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco-Life technologies) et du β -mercaptoéthanol (50 μ M). Pour les conditions de polarisation Th1 et Treg : IL-12 (15 ng/ml) et α -IL-4 (5 μ g/ml) ou hTGF- β (3 ng/ml) et rhIL-2 (100 U/ml), respectivement, ont été ajoutés aux cultures. Lorsque c'est indiqué, de l' α KG (diméthyl akétoglutarate, 3,5 mM ; Sigma) a été ajouté à la culture. Les cellules ont été divisées 3 jours plus tard avec du milieu supplémenté en rhIL-2 (100U/mL) en présence ou non d' α KG.

2) Transfert adoptif dans souris receveuses non conditionnées

a) Projet Thymique

Ces cellules sont ensuite réinjectées à une concentration de 2×10^5 pour un volume de 20 μL dans des souris ZAP-70^{-/-} par voie intraveineuse (IV) ou intra-thymique (IT).

Pour les injections par voie intra-thymique (IT), une anesthésie est réalisée sous isoflurane 2.5% et 1.5l/min d'air (Minihub®- TEM SEGA®).

b) Projet tumeurs 24JKERB

Ces cellules sont ensuite réinjectées à une concentration de 3×10^6 cellules dans les souris RAG KO présentant une tumeur en IO.

Pour les injections IO, une anesthésie est réalisée sous isoflurane 2,5% et 1.5l/min d'air (Minihub®- TEM SEGA®).

V. Suivi de la reconstitution

1) Immunophénotypage et analyses par cytométrie de flux des leucocytes sanguins

Dans le cadre du projet thymique, les animaux sont régulièrement analysés et suivi par prélèvement d'une petite quantité (60 μL) de sang rétro-orbital. Ce sang est ensuite traité par gradient de Ficoll (Histopaque 1077, Sigma®) afin de récupérer et marquer les leucocytes sanguins au moyen d'anticorps couplés à un fluorochrome (20 minutes à 4°C) avant d'être immunophénotypés au moyen d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Les marqueurs utilisés sont les suivant : CD3 (17A2), CD19 (6D5), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD45.1 (A20), CD45.2 (104) CD44(IM7), CD11b (M1/70), CD62L (MEL-14), GR1 (RB6-8C5) TCR $\gamma\delta$ (GL3) et Foxp3 (FJK-16s); tous obtenus de BD Biosciences® et eBiosciences®. Le marquage intracellulaire du facteur de transcription Foxp3 est réalisé à l'aide du kit de fixation/perméabilisation eBiosciences® et selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont analysées sur un cytomètre FACScanto® ou Fortessa® (BD Biosciences®). Les analyses de données ont été effectuées à l'aide du logiciel Diva® (BD®) et du logiciel FlowJo® Mac v.10.2 (Tree Star®).

VI. Suivi du développement tumoral après transfert adoptif de différentes populations de cellules T

1) Cellules tumorales 24JK-ERB

La lignée cellulaire murine de fibrosarcome 24JK exprimant l'antigène humain ERBB2/Her2 a été générée comme décrit (Yong et al. 2016). Des cellules 24JK-ERB (1×10^6) ont été injectées par voie sous-cutanée dans des souris RAG2^{-/-} après avoir été amplifiées *in vitro* et ont progressés sur une période de 7 jours (avec mesure des tumeurs à partir de J4). Le 7^e jour, $3-5 \times 10^6$ cellules T ERBB2-CAR *in vitro*, activées comme indiqué, ont été injectées par voie intra orbitale dans des souris porteuses de tumeurs. Pour les analyses terminales, les tumeurs sont excisées, digérées à l'aide de collagénase IV (1 mg/ml, Sigma) et de DNASE I (500µg/ml, Roche), incubées pendant 25 minutes à 37°C et transformées en suspensions cellulaires pour être analysée par FACS. Les ganglions lymphatiques et les rates des souris porteuses de tumeurs ont été isolés et dissociés dans du PBS + 2 % de FCS puis analysés par cytométrie en flux.

2) Lignée 24JKERB-Luciférase

a) Production de l'outils

Dans le but d'améliorer l'expérience, nous avons mis en place des tumeurs que nous ne serions pas obligé de mesurer en deux dimensions mais que nous pourrions potentiellement voir en 3D et quantifier par imagerie (Bioluminescence).

Dans un premier temps, les cellules ont été transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH codant pour la luciférase (promoteur PGK). Les cellules ont ensuite été triées par Cytométrie en flux (FACS ARIA II) afin d'obtenir 1 cellule transduite/ puits.

Les cellules ont ensuite été cultivées 10 jours de manière à proliférer puis les différents clones ont été testés pour la luciférase (via la caméra bioluminescente) et les plus bioluminescentes ont été sélectionnées.

Ces clones ont ensuite été amplifiés, vérifiés (société IDEXX) puis congelés (-80°C).

b) Utilisation de l'outils

Pour l'expérience, une ampoule est décongelée puis les cellules sont amplifiées (RPMI + SVF + Pénicilline/ Streptomycine) afin d'atteindre un nombre suffisant de cellules à injecter. Ces cellules sont ensuite injectées, comme dans le cas des 24JKERB, à 1×10^6 / tumeur (dans 200µL

PBS) en SC dans des souris RAG -/- et les tumeurs sont mesurées via la BLI. (A partir de J4 jusqu'à la fin de l'expérience).

Les jours de mesures, les souris reçoivent une injection 20 minutes avant l'examen en IP du côté où la tumeur n'est pas implantée avec 100 μ L de luciférase diluée en PBS à 15mg/mL. Les souris sont ensuite anesthésiées à l'isoflurane 2.5% et 1.5l/min d'air (Minihub® - TEM SEGA®) puis placées dans une boîte compartimentée stérile. L'anesthésie est maintenue tout au long de l'examen. Des photos sont prises avec l'IVIS SpectrumCT System – Perkin Elmer®(Figure 16).

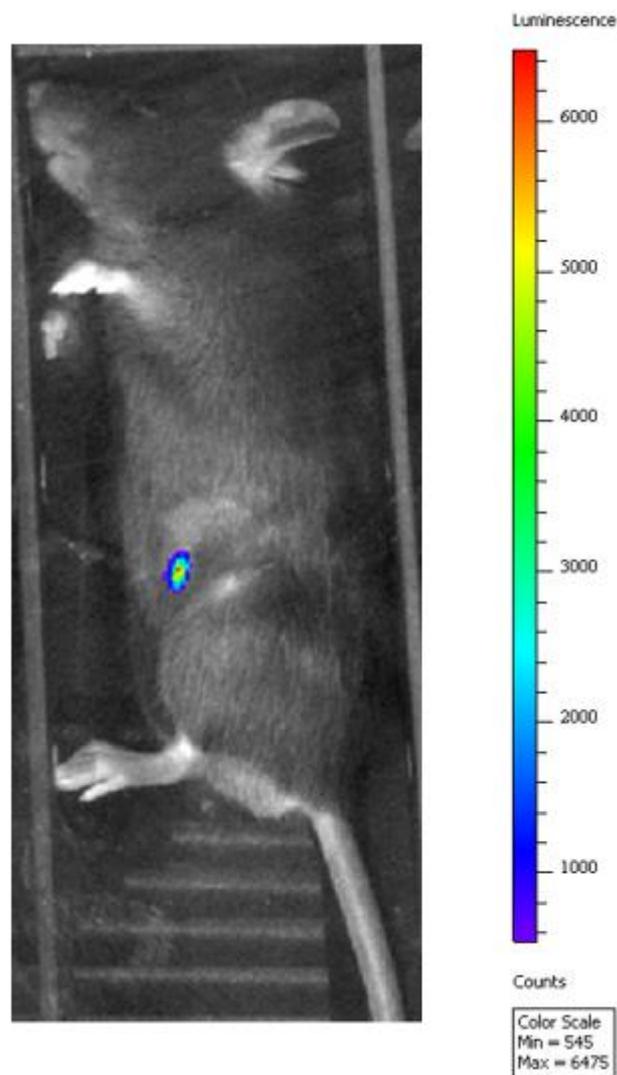


Figure 16. Souris RAG -/- à J1 post injection de tumeurs 24JKERB luciférase

Le niveau de couleurs est reporté sur l'échelle et indique la luminescence en comptes (bleu = peu luminescent et rouge = très luminescent).

VII. Analyses terminales

1) Analyse par cytométrie en flux de cellules totales

Après sacrifice des animaux et collecte des organes d'intérêt (rate, thymus et nœuds lymphatiques totaux), les organes sont broyés puis les cellules sont lavées, filtrées et comptées - afin d'obtenir une suspension cellulaire comparable pour toutes les conditions - avant d'être immunophénotypés au moyen d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Les fluorochromes utilisés pour la partie DICS sont les suivants : CD3 (17A2), CD19 (6D5), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD45.1 (A20), CD45.2 (104) CD44(1M7), CD11b (M1/70), CD62L (MEL-14), GR1 (RB6-8C5) TCR $\gamma\delta$ (GL3), CD11c et Foxp3 (FJK-16s) ; tous obtenus de BD Biosciences[®] et eBiosciences[®]. Le marquage intracellulaire du facteur de transcription Foxp3 est réalisé à l'aide du kit de fixation/perméabilisation eBiosciences[®] et selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont analysées sur un cytomètre FACScanto[®] ou Fortessa[®] (BD Biosciences[®]). Les analyses de données ont été effectuées à l'aide du logiciel Diva[®] (BD[®]) et du logiciel FlowJo[®] Mac v.10.2 (Tree Star[®]).

2) Histologie

a) Congélation (Projet thymique)

Les thymii sont récupérés, lavés en PBS et congelés dans de l'OCT en isopropanol / azote à -65°C puis conservés à -80°C. Ils sont ensuite coupés au Cryostat[®] (Cryostat 2 CM2800E Leica[®]) sur une épaisseur de 10 μ m avec une température de chambre de -20°C et une température d'échantillon de -18°C. Chaque coupe est ensuite déposée à plat sur une lame SuperFrost[®] Plus (Thermo Scientific[®]). Les lames sont ensuite marquées immédiatement (elles peuvent être conservées sur un temps court à -20°C une fois marquées avant d'être observées au microscope). Le marquage est composé de 3 étapes : Perméabilisation - marquage par fluorescence – Saturation. Le marquage est composé de 2 anticorps : Keratine 14 (anticorps polyclonal purifié couplé à un anticorps secondaire anti-lapin Cy3, Biolegend[®]) et AIRE (anticorps monoclonal (5H12) Af488, eBiosciences[®]). Les lames sont ensuite observées au microscope Confocal SP5-SMD Leica[®].

b) Paraffine (Projet tumoral)

Les organes sont récupérés, lavés en PBS puis fixés en PFA 10% en respectant le temps de fixation selon la taille de l'organe. Ils sont ensuite conservés en éthanol 70%. Les organes sont ensuite inclus chez des collaborateurs avec une fontaine à paraffine. Puis ils sont conservés à 4°C et découpés à 6 μ m avec un microtome Microm HM355S. Les coupes sont récupérées puis marquées avec différents anticorps : Foxp3 Rat Invitrogen[®] 14-5773-82 - CD4 Abcam[®] 183685 - CD8a Rat eBioscience[®] 14-0808-80.

Résultats

Comme indiqué dans mes objectifs, mon projet, centré sur l'amélioration d'approches de thérapie cellulaire, s'est intéressé à deux contextes différents : les immunodéficiences génétiques sévères et le cancer. Dans ces deux conditions, je me suis focalisée sur la différenciation et la fonction des cellules T et l'impact de leur environnement sur ces processus. Je décrirais donc ci-dessous les résultats que j'ai obtenus pour ces deux parties de mon projet pour finir par une courte description de mes activités annexes et en particulier mon implication dans le maintien des colonies de lignées murines du laboratoire.

I. Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre d'immunodéficiences en cellules T grâce au ciblage direct dans le thymus.

1) Analyse du développement des cellules T après transplantation par voie intrathymique de cellules progénitrices

Comme indiqué ci-dessus, le traitement conventionnel des DICS chez l'Homme est la transplantation de cellules souches par voie intraveineuse. Bien qu'efficaces, ces traitements présentent cependant des limites et complications qu'il est important d'essayer de surpasser. Parmi ces limites, il faut relever la disponibilité en CSH qui reste souvent faibles alors qu'une reconstitution efficace nécessite l'injection d'un grand nombre de CSH ($4-6 \times 10^6$ CSH/kg). Une hypothèse pouvant expliquer la nécessité de cette quantité importante est la perte probable de cellules au cours de leur migration vers la moelle osseuse et le thymus (nombre de cellules injectées vs nombre de cellules atteignant leur site de résidence). Une deuxième limite réside dans le temps nécessaire à obtenir une reconstitution polyclonale de cellules T qui reste trop long (>100 jours chez l'Homme), laissant les patients susceptibles aux infections pendant cette période. Afin de surmonter ces problèmes, mon laboratoire d'accueil a proposé que le ciblage direct des cellules progénitrices hématopoïétiques dans le thymus, le site du développement des cellules T, permettrait d'éviter les différentes étapes de migration associée à l'injection IV (la plupart des cellules progénitrices se dirigent d'abord vers la moelle osseuse pour ensuite migrer vers le thymus et se différencier en cellules T) (**Figure 17-A-B**). Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience a donc été menée sur un modèle murin immunodéficient en cellules T, des souris ZAP70^{-/-}. Des CSH provenant de souris syngéniques sauvages CD45.1+C57Bl/6 ont été injectées soit par voie IV, soit directement dans le thymus (intra-thymique, IT) à ces souris ZAP70^{-/-} et le laboratoire a analysé la thymopoïèse et la reconstitution du compartiment T à différents temps post-transplantation. Pour cela, des thymii ont été prélevés post mortem à différents temps post-transplantation, différentes populations de cellules ont été marquées (CD4, CD8, CD45...) puis analysées par cytométrie en flux.

Bien que les deux voies d'administration de CSH aient permis d'observer une reconstitution du compartiment T périphérique, l'injection IT montre une reconstitution plus efficace que la voie IV (22% vs 12%, respectivement) (**Figure 17-C**). De plus, ces expériences ainsi que d'autres, ont permis de montrer que le ciblage direct du thymus permettait d'obtenir une reconstitution plus rapide du compartiment avec une injection de 10x moins de cellules, ainsi qu'une restauration à long terme d'une thymopoïèse efficace (Adjali et al. 2005; Vicente et al. 2010; De Barros, Zimmermann, et Taylor 2013).

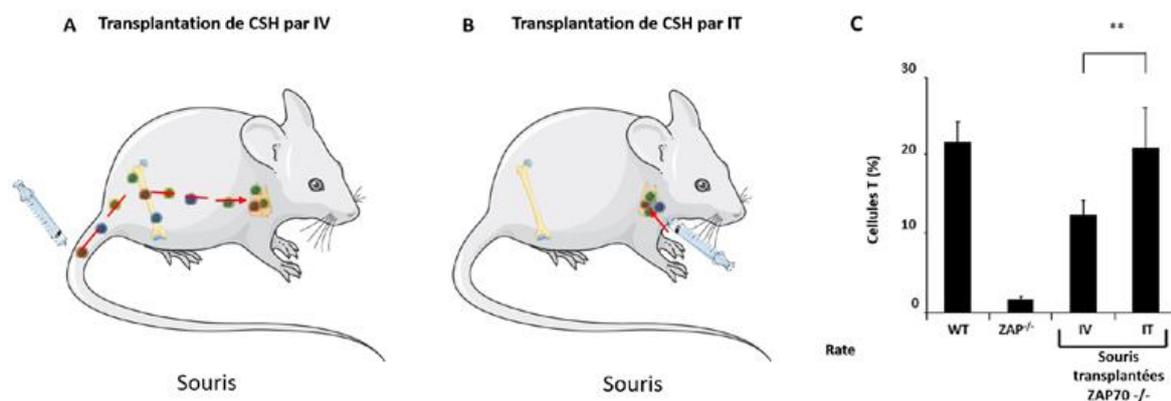


Figure 17. Comparaison de l'efficacité de la transplantation de CSH par injection intraveineuse (IV) et intra-thymique (IT)

Représentation schématique du trajet des CSH (cellules souches hématopoïétiques) après transplantation par voie IV (A) ou IT (B). L'efficacité de reconstitution en cellules T (%) de chaque voie, 25 semaines après transplantation ou non dans une souris ZAP70^{-/-}, est représentée (C). Le pourcentage de cellules T d'une souris WT est représenté en contrôle.

Suite à ces expériences à long terme, il nous a semblé important de caractériser et comprendre les étapes précoces de la prise de greffe des progéniteurs administrés dans le thymus ainsi que de la mise en place de la thymopoïèse. En particulier, Il est nécessaire de déterminer l'importance de l'environnement thymique dans ces processus, un crosstalk permanent entre les cellules stromales et les thymocytes étant essentiel à un développement T optimal (Takahama 2006). Pour cela, des souris ZAP70^{-/-} ont été injectées, par voie intra-thymique comme précédemment décrit, avec des cellules progénitrices hématopoïétiques isolées à partir de moelles osseuses de souris CD45.1+C57BL/6 WT. Les thymus ont été prélevés, préparés et analysés par cytométrie en flux à différents temps post-injection (1, 2, 3, 4, 6 et 19 semaines). Des souris CD45.1+C57Bl/6 WT et ZAP70^{-/-} d'âges similaires, non injectées, sont utilisées comme contrôles : les thymocytes de souris CD45.1+C57Bl/6 WT expriment majoritairement le marqueur CD45.1 (99.5 +/- 0.1%) contrairement aux thymocytes de souris ZAP70^{-/-} où seul un bruit de fond très faible est observé (0.006% +/- 0.005%). Concernant les souris ZAP70^{-/-} injectées avec des CSH WT, on remarque une prise de greffe rapide et associée à un avantage sélectif des cellules du donneur au cours du temps.

En effet, nous observons une augmentation drastique de CD45.1 entre 1 semaine (0.04%) et 6 semaines (31%) post-injection. (**Figure 18-A**). Notamment, les thymocytes générés à partir des cellules souches du donneur à 4 semaines après greffe présente un taux d'expansion supérieur à 150 (fold expansion : 173.5 +/- 37) (**Figure 18-B**). Néanmoins, le pourcentage de cellules du donneur CD45.1+ diminue entre 6 et 19 semaines après transplantation (31% vs 17.5%). La raison de cette diminution reste encore à élucider, nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que cette diminution représenterait soit une stabilisation de la thymopoïèse avec la sélection des cellules progénitrices donneuses ayant une capacité de s'autorenouveler à long terme, soit serait associée à l'involution physiologique du thymus que l'on observe en Figure 18-D avec une diminution du nombre total de thymocytes.

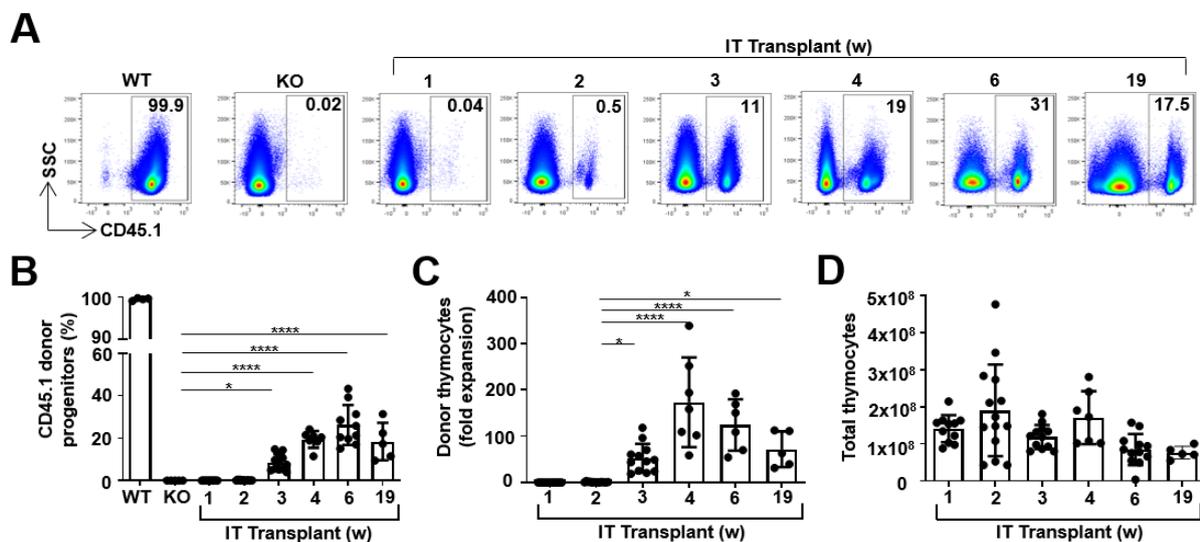


Figure 18. Cinétique de suivi de cellules de donneur après injection IT

Des cellules issues de souris WT exprimant le marqueur CD45.1 ont été injectées par voie IT à des souris ZAP70^{-/-}. Les souris ont été sacrifiées à différents temps et les thymus prélevés et analysés (1 à 19 semaines). Le pourcentage de cellules du donneur (CD45.1+) est quantifié par cytométrie en flux au cours du temps (CD45.1+) (A). Des histogrammes représentatifs et la quantification des résultats sont représentés (B-C). La taille du thymus évoluant au cours du temps, le nombre total de thymocytes est représenté (D).

Dans le but de caractériser le phénotype des cellules provenant de la greffe, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux premières cellules progénitrices du thymus ; les cellules progénitrices ETP (*early thymic progenitor*) que l'on peut distinguer/identifier par l'expression des marqueurs CD44 et c-kit et l'absence d'expression des marqueurs CD4, CD8 et CD3 (**Figure 19**).

Ainsi, nous avons pu observer qu'à des temps précoces, le pourcentage de progéniteurs est élevé et il diminue progressivement au cours du temps. On observe donc que les souris transplantées à +1 semaine ont un pourcentage de progéniteurs d'environ 29% alors qu'à partir de 6 semaines, les souris ont un pourcentage de cellules ETP équivalent à celui d'une souris WT, soit environ 1%. Ainsi, les progéniteurs hématopoïétiques sembleraient se

différencier rapidement et massivement en ETP après transplantation dans le thymus pour ensuite probablement poursuivre leur différenciation au cours du temps. Certains de ces progéniteurs possèdent cependant la capacité de s'auto-renouveler et de persister dans le thymus puisqu'ils sont présents jusqu'à 19 semaines post-greffe.

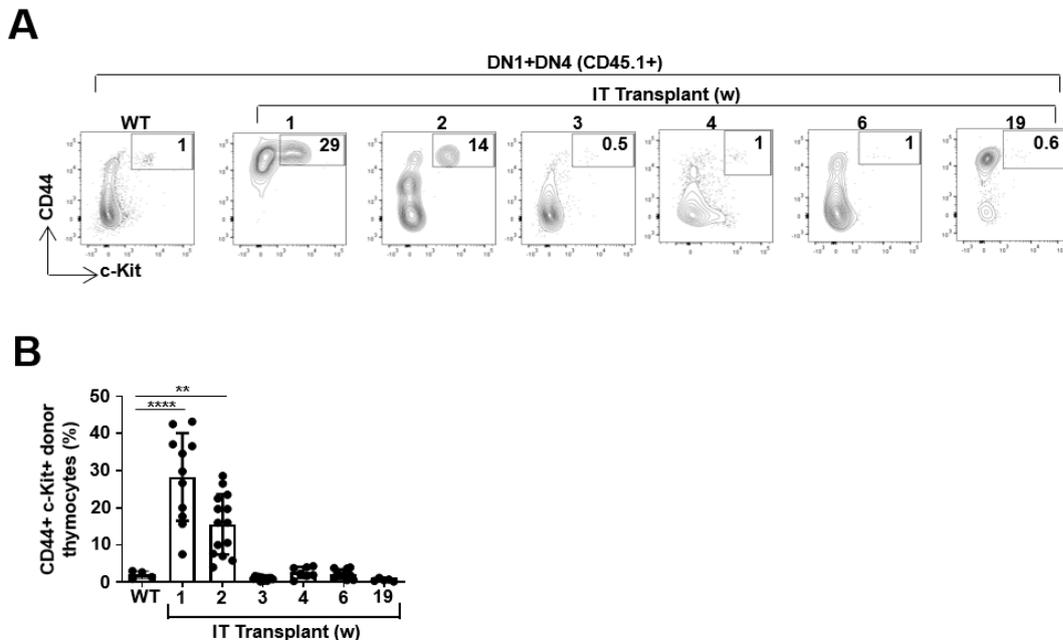


Figure 19. Cinétique de suivi de progéniteurs après injection IT

Des cellules progénitrices hématopoïétiques issues de souris WT CD45.1 ont été injectées à des souris ZAP70^{-/-} en IT. Les souris ont été sacrifiées à différents temps et les thymus prélevés et analysés (1 à 19 semaines). Le pourcentage de cellules progénitrices ETP (early thymic progenitor) est quantifié par cytométrie en flux par l'expression des marqueurs CD44 et c-kit dans la population CD4⁻CD8⁻CD3⁻. Des histogrammes représentatifs (A) et la quantification des résultats sont représentés (B).

Pour déterminer si ces progéniteurs poursuivent bien leur différenciation, nous avons ensuite analysé les différentes sous-populations de thymocytes à l'aide des marqueurs CD4 et CD8 (**Figure 20**). Tout d'abord, comme attendu, la différenciation des cellules T est bloquée au niveau des cellules DP dans les souris ZAP70 alors qu'on observe des cellules matures CD4⁺CD8⁻ et CD4⁻CD8⁺ dans le thymus de la souris contrôle sauvage. Nous observons ensuite une cinétique de développement des cellules donneuses injectées ; tout d'abord 1 et 2 semaines post injection, les cellules donneuses représentent principalement une population de thymocytes immatures DN qui diminue ensuite dramatiquement à partir de 3 semaines (40%+/-, 50%+/- et 3%+/- respectivement) de manière concomitante à l'augmentation du pourcentage des cellules DP dès la deuxième semaine après transplantation. Enfin, autour de 3 à 4 semaines post-transplantation, on observe une restauration d'une thymopoïèse complète avec les 4 populations principales DN, DP, CD4⁺CD8⁻ et CD4⁻CD8⁺ à des pourcentages similaires à ceux d'une souris WT (à 4 semaines, nous pouvons remarquer que

les pourcentages de cellules donneuses (CD45.1) DN sont de 0% pour les WT comme pour les ZAP70, les pourcentages des DP sont d'environ 80% pour les deux conditions et il en est de même pour les CD4 (10 % pour les WT contre 15% pour les ZAP70) et pour les CD8 (2.5% pour les deux conditions) (**Figure 20**). Il est intéressant de noter que la cinétique de développement des cellules T que nous observons post-transplantation IT reproduit la cinétique décrite dans des conditions physiologiques, le développement T s'effectuant en environ 28 jours (Egerton, Shortman, et Scollay 1990).

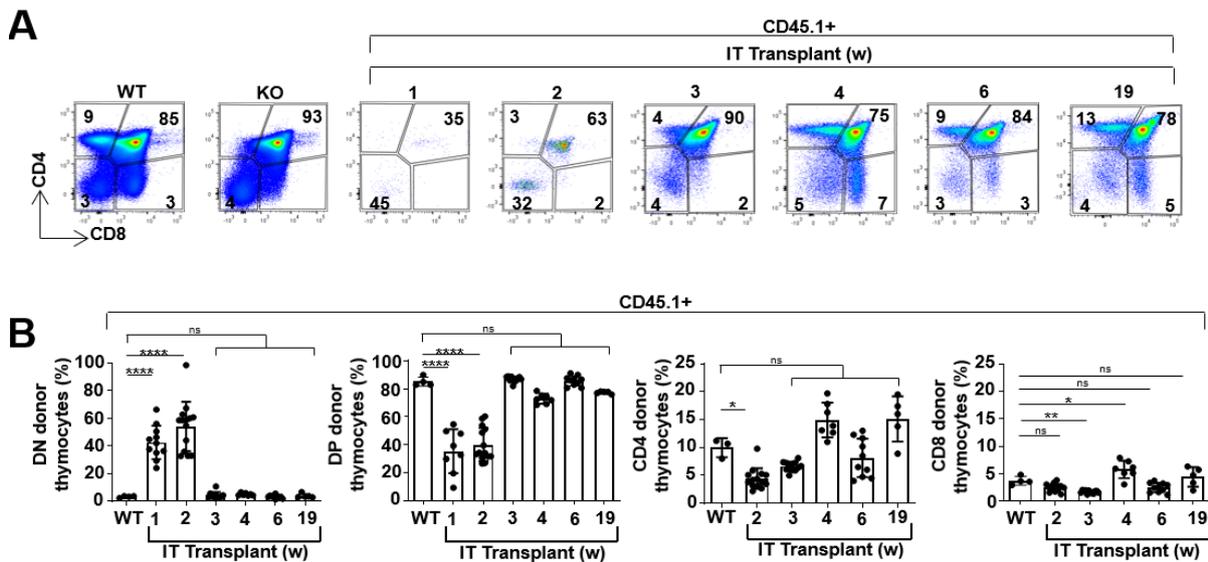


Figure 20. Suivi au cours du temps du développement en cellules T des cellules progénitrices injectées (CD45.1)

Des cellules progénitrices isolées à partir de moelle osseuse souris WT CD45.1 ont été injectées par voie IT à des souris ZAP70^{-/-}. Les souris transplantées ont été sacrifiées à différents temps et les thymus prélevés et analysés (1 à 19 semaines) par cytométrie en flux pour la présence de cellules T CD4 et CD8 dans la population donneuse CD45.1. Des histogrammes représentatifs (A) et la quantification des résultats sont représentés (B).

Afin de déterminer si les cellules CD4⁺CD8⁻ et CD4⁻CD8⁺ représentaient des thymocytes SP matures, nous avons évalué l'expression du marqueur CD3 dans ces différentes sous-populations (**Figure 21**). Ainsi, on peut observer une augmentation du pourcentage de cellules matures au cours du temps permettant à nouveau d'obtenir des pourcentages similaires de cellules matures à ceux d'une souris WT à partir de 4 semaines. De manière intéressante, alors que la population CD3⁻CD8⁺ est une population immature bien caractérisée de la thymopoïèse, les cellules ISP8 (*immature single positive 8*) présentes entre le stade DN et le stade DP, les cellules CD4⁺CD8⁻ d'une thymopoïèse physiologique sont très majoritairement des cellules matures. Il sera donc intéressant de caractériser la nature et le rôle de la population CD3⁻CD4⁺ observée à 2 et 3 semaines post-transplantation. Une hypothèse intéressante est que ces cellules représenteraient des cellules impliquées dans l'organisation de l'architecture thymique, les cellules LTi (*lymphoid tissue inducer*).

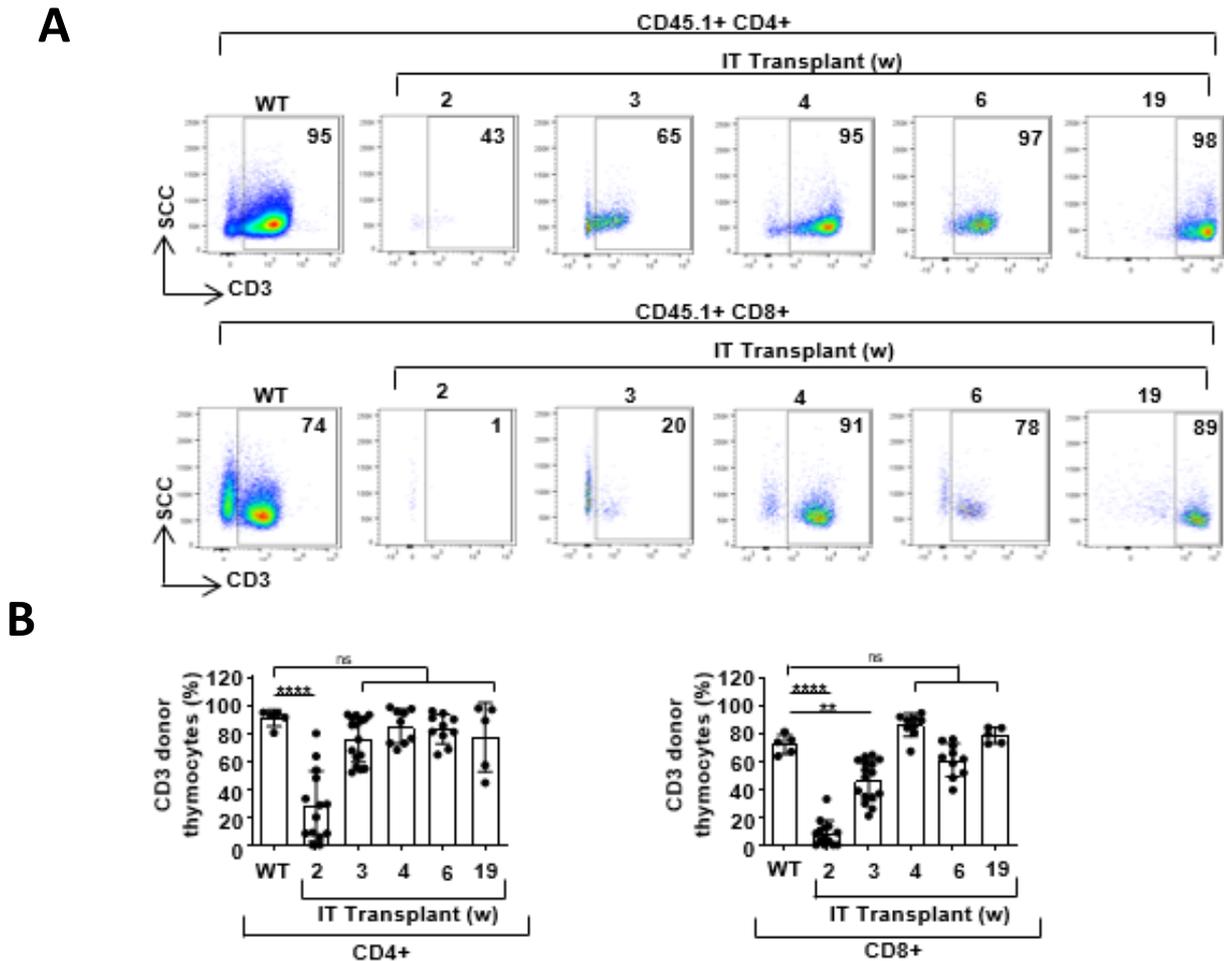


Figure 21. Caractérisation de la maturation des cellules T CD4 et CD8

Des cellules issues de souris WT CD45.1 ont été injectées par voie IT à des souris ZAP70^{-/-} puis ces souris sacrifiées et analysées comme précédemment décrits. L'expression du marqueur CD3 dans les populations CD4⁺CD8⁻ et CD4⁻CD8⁺ a été déterminée par cytométrie en flux. Des plots représentatifs (A) et les quantifications (B) de 3 expériences sont montrés.

Une population de cellules régulatrices Treg FoxP3⁺ se différencie dans le thymus et ces cellules ont un rôle essentiel dans l'établissement de la tolérance et ainsi dans le contrôle de la réponse du greffon contre l'hôte lors d'une greffe non histocompatible. Il nous a donc semblé important de caractériser leur développement dans notre contexte de transplantation par voie intra-thymique.

Comme le montre la **Figure 22**, des cellules Tregs sont détectables à partir de la troisième semaine post-transplantation pour atteindre un pourcentage de FOXP3⁺ quasi-égal à celui d'une souris WT à 19 semaines (2.5% pour les souris WT contre 2.6% pour les souris ZAP 70 à 19 semaines). Il est intéressant de noter que le développement des cellules Treg CD4⁺FoxP3 est donc retardé par rapport au développement des cellules CD4⁺ conventionnelles s'établissant dès 2 et 3 semaines post-greffe. Le développement de ces cellules nécessitant la mise en place d'une architecture thymique optimale, nous nous sommes ensuite intéressés à ce point.

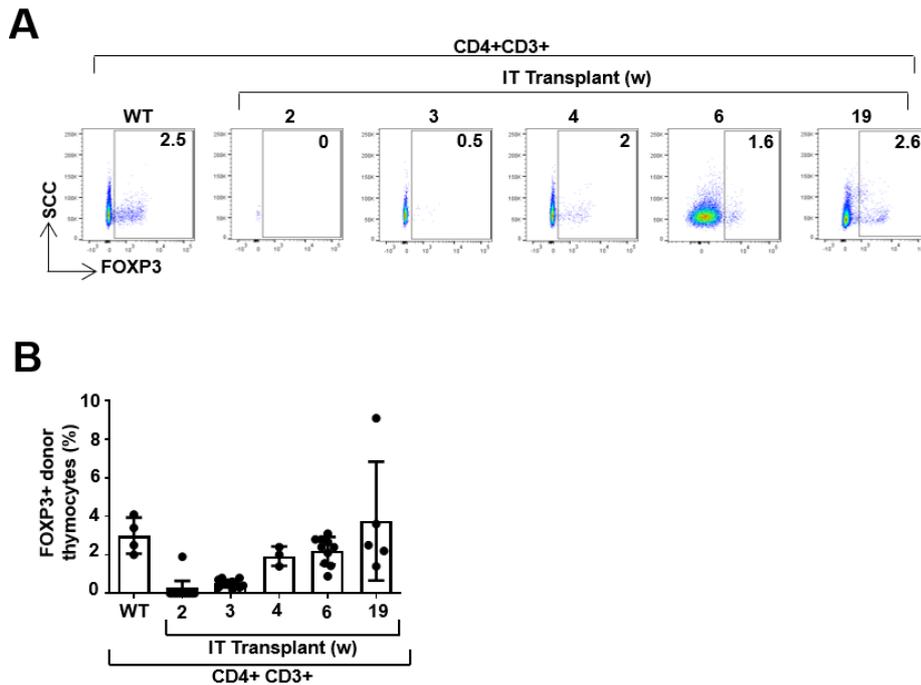


Figure 22. Cinétique du développement de cellules Tregs après IT par l'intermédiaire de l'évaluation du marqueur FOXP3

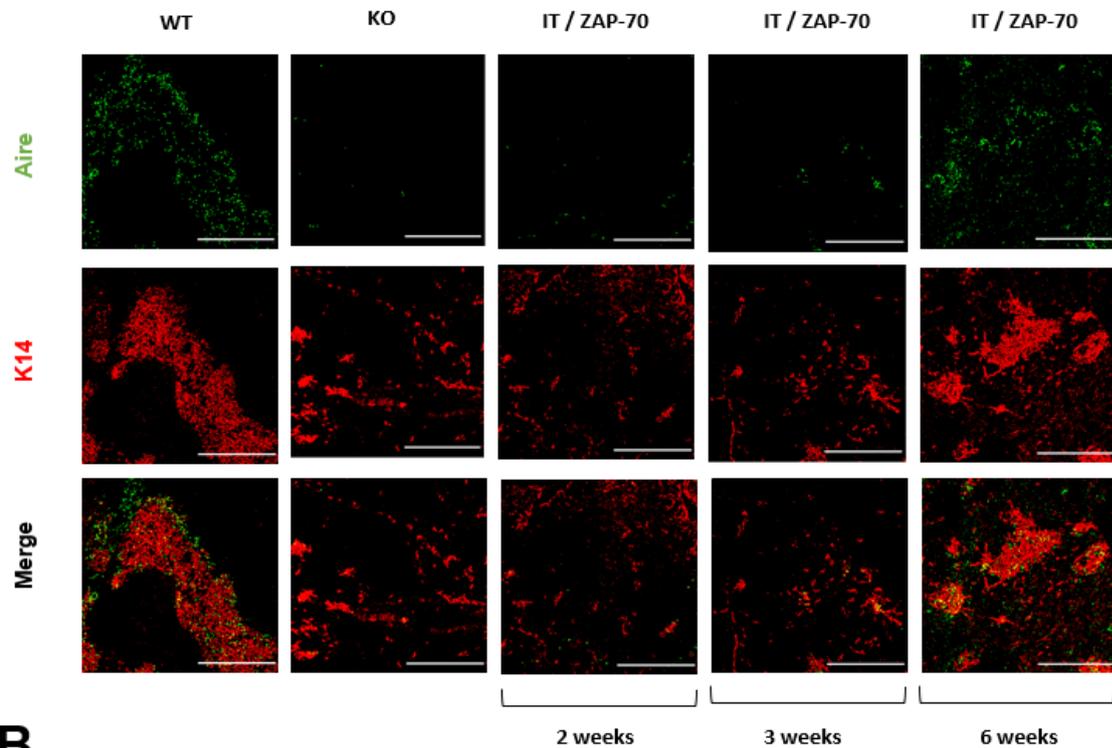
Des cellules de donneurs sont injectées par voie IT à des souris ZAP 70^{-/-} qui sont ensuite sacrifiées à différents temps (2 à 19 semaines). Les dots plots de cytométrie sont représentés en Figure 6-A et la quantification en Figure 6-B.

2) Analyse de la restauration de l'architecture thymique

Comme vu ci-dessus, le développement efficace des thymocytes et en particulier des cellules T régulatrices est dépendant d'une architecture stricte des 2 compartiments du thymus (cortex et médulla). De même le développement de cette architecture et en particulier de la médulla est dépendante d'un dialogue entre les cellules épithéliales et les thymocytes, appelé crosstalk (Lopes et al. 2015). Ainsi, le thymus des souris ZAP70^{-/-} est dépourvu de médulla dû à l'absence de cellules SP et donc de crosstalk avec les progéniteurs de la médulla ((Vicente et al. 2010), et **Figure 23**, ZAP70^{-/-}). La restauration de cette architecture pouvant être induite par la restauration de la thymopoïèse, il était donc important de déterminer l'évolution de cette architecture au cours du temps après administration de cellules CSH ce que j'ai effectué par une analyse par immunohistochimie de coupes de thymus réalisées à différents temps après transplantation. Comme attendu, l'expression du marqueur de cellules de médulla Keratin 14 (K14) et du facteur de transcription Aire (Auto-Immune REgulator) exprimé au niveau d'une population de cellules matures mTEC, n'est pas détectée dans le thymus des souris immunodéficientes ZAP70^{-/-}, alors qu'on l'observe sur une coupe d'un thymus de souris WT (**Figure 23**, 2 premières colonnes). En revanche, notre analyse des thymus post-transplantation met une évidence une restauration des zones de médulla 2 semaines après transplantation de CSH en IT, avec notamment l'augmentation de l'expression du facteur AIRE

par rapport au KO. Nous observons ensuite une expression semblable à celle d'un thymus WT, 6 semaines post transplantation.

A



B

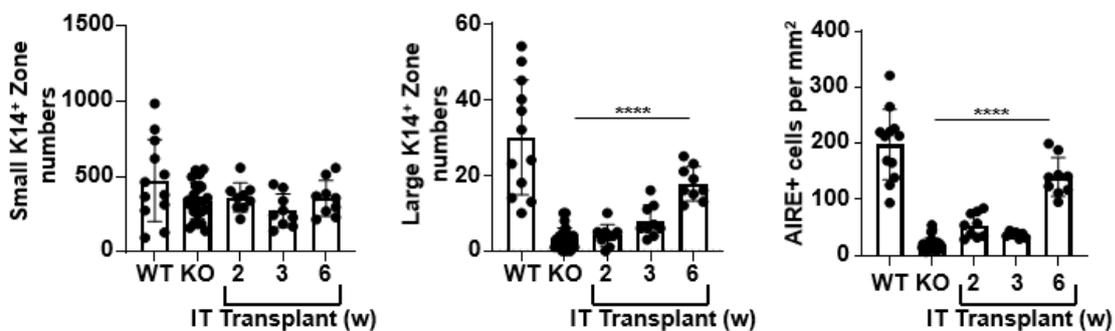


Figure 23. Coupes de thymus de souris WT, ZAP70 ^{-/-} et ZAP70 ^{-/-} reconstituée a différents temps (2,3 et 6 semaines) après un transfert adoptif de cellules injectées en IT et analysées en immunohistochimie

Les thymus ont été congelés en isopentane à -65°C puis conservés à -80 °C avant d'être marqués et analysés. Ici, 3 thymus sont présentés : un thymus de souris CD45.1+C57BL/6 WT non reconstitué, un thymus de souris ZAP70 ^{-/-} non reconstitué et un thymus de souris ZAP70 ^{-/-} reconstitué a différents temps post greffe. L'expression du facteur Aire et du marqueur Kératine 14 est analysée.

Suite à ces résultats préliminaires extrêmement encourageants, cette analyse va être poursuivie notamment à des temps plus longs après transplantation et en incluant d'autres marqueurs pour distinguer les sous populations des cellules mTEC et évaluer la différenciation stromale post transplantation (kératine 8, P-selectine, CCL21, etc). Nous compléterons

également les données avec une caractérisation par cytométrie en flux de ces populations stromales après digestion enzymatique des thymus.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus nous a permis de mettre en évidence que le ciblage direct de progéniteurs hématopoïétiques dans le thymus supporte une restauration rapide et efficace d'une thymopoïèse complète avec notamment le développement de cellules Treg mais aussi la restauration d'une architecture thymique essentielle au développement optimal d'un compartiment T tolérant au soi. Il sera maintenant important de déterminer les mécanismes impliqués dans la prise de greffe et le maintien des progéniteurs dans le thymus mais aussi dans la différenciation / prolifération rapide des cellules mTECs.

II. Amélioration de la thérapie cellulaire dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale par transfert adoptif de cellules T : Impact du conditionnement sur le devenir /fonction des cellules T injectées

Comme indiqué ci-dessus, en parallèle de mon projet sur l'optimisation de la transplantation de cellules progénitrices pour le traitement d'une immunodéficiences génétique, je me suis intéressée à une autre approche de thérapie cellulaire développée pour le traitement d'immunodéficiences induites par la chimio- ou radiothérapie dans le cas notamment de traitement contre le cancer par exemple.

En effet, il a été précédemment démontré que chez les souris présentant une lymphopénie d'origine génétique ou radio-induite, les cellules T greffées subissent une prolifération homéostatique induite par la lymphopénie (LIP, *lymphopenia induced proliferation*), remplissant ainsi « l'espace » disponible (Goldrath, Bogatzki, et Bevan 2000). L'objectif de ce deuxième projet était ainsi d'évaluer si différents régimes de lymphodéplétion (radiothérapie vs chimiothérapie) impactent distinctement le devenir de cellules T greffées. Dans cette optique, un modèle murin a été généré dans l'équipe dans lequel des souris sauvages C57Bl/6 sont traitées soit par irradiation sous-létale (600 rads), soit par un régime de chimiothérapie (Bu/Cy) à base de Busulfan® (16,5 mg/kg X4 IP) /Cyclophosphamide® (200 mg/kg IP) suivi d'un transfert adoptif de cellules T.

Les données initiales de l'équipe montrent que les deux régimes génèrent une déplétion initiale massive des cellules immunitaires endogènes mais des différences dans la reconstitution en cellules T CD4 et CD8 de l'hôte. Ainsi, l'effet délétère de l'irradiation sur les lymphocytes T CD8 de l'hôte est massif, entraînant une récupération de seulement 16 % des lymphocytes T CD8, contre 75 % des lymphocytes T CD4. En revanche, après un conditionnement Bu/Cy, une récupération à peu près équivalente des lymphocytes T CD4 et CD8 est observée (**Figure 24**). Par conséquent, avant même d'évaluer les effets du conditionnement sur le devenir de cellules T greffées, ces données révèlent que le régime de conditionnement est un facteur important affectant différenciellement les différentes sous-populations de cellules T.

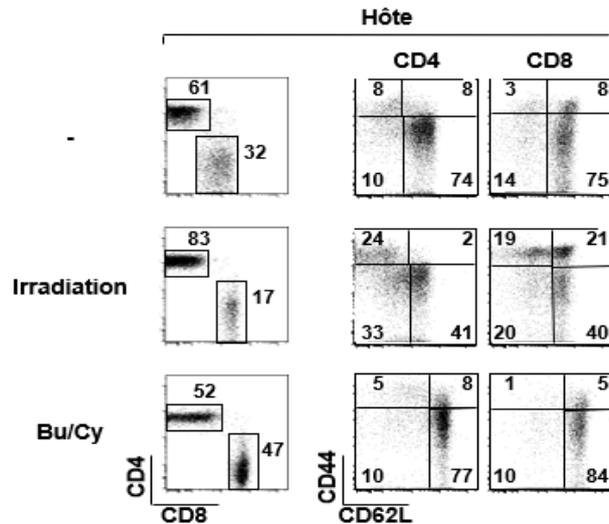


Figure 24. Le phénotype des cellules T de l'hôte est différenciellement modulé par un conditionnement par irradiation et par Bu/Cy

Des souris C57Bl/6-Thy1.2 sont irradiées (6 Gy) ou conditionnées avec du Busulfan® (16,5 mg/kg x 4 doses) / Cyclophosphamide® (200 mg/kg). La répartition relative des cellules T CD4 et CD8 de l'hôte chez les souris témoins et conditionnées sont présentés (diagrammes de gauche). Les pourcentages de cellules T hôtes CD4 et CD8 naïves (N), mémoire centrale (CM) et mémoire effectrice (EM) sont détectées par marquage CD44/CD62L (diagrammes de droite).

Tout d'abord, nos données montrent que la lymphopénie induite par les deux régimes de conditionnement augmente de manière significative le pourcentage de cellules T greffées à jour 7 après transfert adoptif (<1% après transfert dans des souris contrôles par rapport à 8-30% dans des souris lympho-déplétées **Figure 25 et données non présentées**). De plus, les doses de chimiothérapie utilisées dans ces expériences s'accompagnent d'une prise de greffe comparable à celle obtenue après irradiation. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la proportion relative de cellules CD4 et CD8 du donneur est fortement modulée par le type de conditionnement ; chez les souris irradiées, le pourcentage de cellules T CD8 du donneur est significativement plus élevé, tandis que chez les souris traitées par Bu/Cy, la proportion de cellules T CD4 est nettement supérieure. Les cellules T greffées ont été marquées avec du CFSE/CTV afin de pouvoir suivre leur prolifération après transfert adoptif dans les hôtes pré-conditionnés. Comme cela a été démontré précédemment dans la littérature (Goldrath 2002; Voehringer, Liang, et Locksley 2008), les cellules T CD8 greffées prolifèrent de manière homéostatique chez les souris irradiées, alors que les cellules T CD4 n'ont proliféré que de façon minimale, ce qui résulte en un ratio CD4:CD8 <1. En revanche, chez les hôtes conditionnés Bu/Cy, les cellules T CD4 greffées ont proliféré de façon rapide et massive (plus de 6 divisions), tandis que les cellules T CD8 n'ont proliféré que de façon minimale (**Figure 25**). Ainsi, le profil CD4/CD8 (ratio >5 : 1) de ces souris est fortement modifié par rapport à celui observé dans les souris irradiées (**Figure 25**).

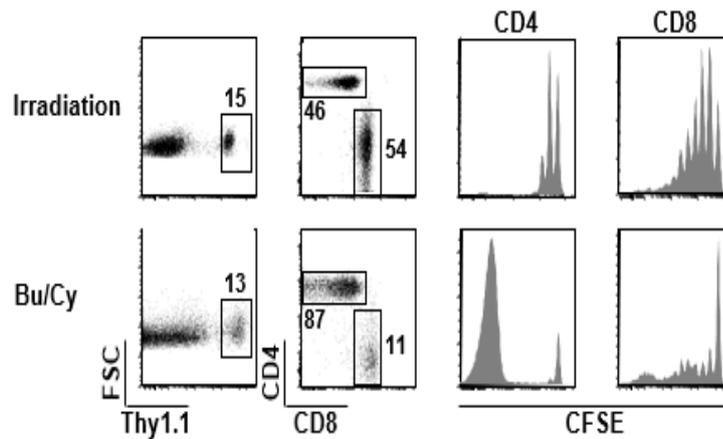
A

Figure 25. Le potentiel de prolifération des cellules T greffées est impacté par le pré-conditionnement de la souris receveuse (irradiation vs Bu/Cy)

Des cellules T CD4 et CD8 issues de souris « donneuses » sont transférées dans des souris C57BL/6-Thy1.2 pré-conditionnées par irradiation (6 Gy) ou Busulfan (16,5 mg/kg x 4 doses) /cyclophosphamide (200 mg/kg). Les souris sont sacrifiées 7 jours après le transfert adoptif et la récupération des cellules T du donneur (Thy1.1+), les pourcentages relatifs de CD4/CD8 et les profils de prolifération CFSE de chaque groupe sont présentés.

Il a été décrit que la prolifération homéostatique des cellules T naïves greffées chez les souris déficientes en cellules T ou chez les souris rendues lymphopéniques par irradiation nécessite des interactions de faible affinité avec les complexes CMH/peptide du soi (Ernst et al. 1999; Goldrath et Bevan 1999; Kieper et Jameson 1999). En revanche, les cellules mémoire ont des exigences beaucoup moins strictes pour leur activation/prolifération (Surh et Sprent 2008). Il était donc important de déterminer si l'augmentation massive des cellules T CD4 détectée chez les souris conditionnées Bu/Cy reflétait la prolifération d'un pourcentage minime de cellules mémoires ou plutôt une prolifération plus globale de lymphocytes naïfs. Nous avons donc répété ces expériences afin de comparer les profils de prolifération des cellules T naïves par rapport aux cellules T totales. Les données présentées dans la **Figure 26** montrent que des profils de prolifération des cellules T CD4 et CD8 chez les souris irradiées et celles conditionnées Bu/Cy sont comparables à ceux observés chez les souris recevant des cellules T CD4 et CD8 naïves triées par FACS (CD62L+CD44-CD3+). Ces données suggèrent fortement que la division massive des cellules T CD4 du donneur chez les receveurs conditionnés par Bu/Cy reflète une prolifération massive de l'ensemble des lymphocytes CD4.

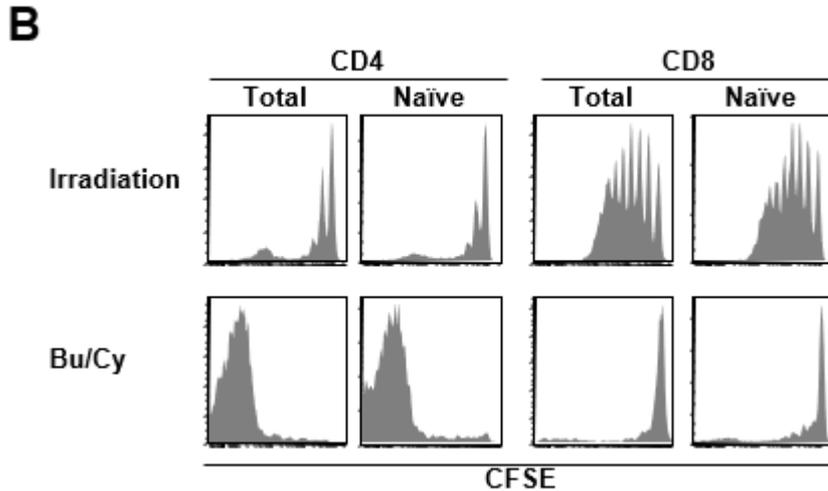


Figure 26. Prolifération cellulaire des cellules T CD4 et T CD8 totales ou naïves chez les souris irradiées ou les souris ayant reçu une chimiothérapie. Les souris sont sacrifiées 7 jours post - injection

Des cellules T issues de souris « donneur » totales ou des cellules T naïves triées CD3+CD62L+CD44- sont transférées dans des souris C57BL/6-Thy1.2 pré-conditionnées par irradiation (6 Gy) ou Busulfan® (16,5 mg/kg x 4doses) /Cyclophosphamide® (200 mg/kg). Les souris sont sacrifiées 7 jours après le transfert adoptif et les profils de prolifération CFSE de chaque groupe sont présentés.

En conditions lymphopéniques, la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs greffés s'accompagne de leur différenciation, avec l'acquisition d'un phénotype de type « mémoire » (Goldrath, Bogatzki, et Bevan 2000; Murali-Krishna et Ahmed 2000). Alors que ce processus a été décrit après transfert adoptif dans des souris irradiées ou déficientes en lymphocytes T, il n'y avait pas d'information dans la littérature concernant la différenciation des CD4 lors de la prolifération rapide détectée chez les souris conditionnées Bu/Cy. Nos données montrent que les cellules T CD4 greffées dans des souris conditionnées Bu/Cy acquièrent un phénotype mémoire ou effecteur, tandis que les cellules T CD8 qui ne se divisent pas restent, en grande majorité, naïves (**Figure 27**). En effet, dans les deux environnements de conditionnement, la prolifération cellulaire est liée aux changements de phénotype ; les cellules T CD4 greffées qui ne se sont pas divisées après transfert dans des souris irradiées ont également conservé leur phénotype naïf (**Figure 27**). Ainsi, le phénotype des cellules T greffées est fortement corrélé à leur profil de prolifération.

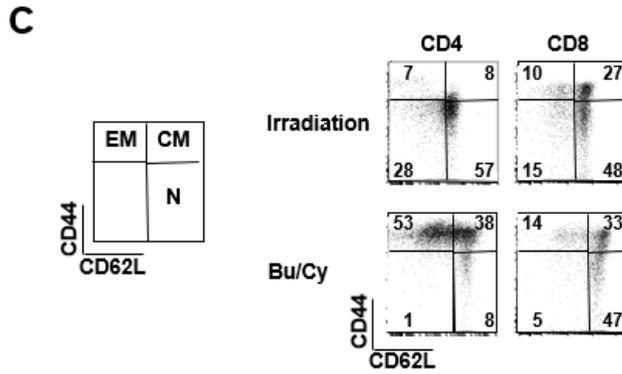


Figure 27. Etudes des cellules mémoires (effectrices mémoires / centrales mémoires) et naïves

Des cellules T issues de souris « donneur » sont transférées dans des souris C57BL/6-Thy1.2 pré-conditionnées par irradiation (6 Gy) ou Busulfan® (16,5 mg/kg x 4doses) /Cyclophosphamide® (200 mg/kg). Les souris sont sacrifiées 7 jours après le transfert adoptif. Le phénotype en fonction de l'expression de CD62L et CD44 a été évalué en sélectionnant d'abord les populations de cellules T CD4+Thy1.1+ ou CD8+Thy1.1+ du donneur. Les résultats sont représentatifs des données obtenues dans 1 des 3 expériences indépendantes.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la sous-population de cellules T régulatrices caractérisées par l'expression du facteur de transcription Foxp3. Au moment du transfert adoptif, les cellules T CD4 injectées contenaient un faible pourcentage de cellules T régulatrices (Tregs) CD4+CD25+ (en moyenne 5-10% des cellules CD4+). Nous avons donc évalué si le pourcentage relatif de Tregs était modifié après transfert adoptif. Alors que le pourcentage de Tregs n'est pas significativement différent chez les souris témoins et irradiées, le pourcentage chez les souris conditionnées par Bu/Cy était nettement augmenté (**9 % à 24 % ; Figure 28**). De façon intéressante, l'augmentation du pourcentage de cellules T Foxp3+ du donneur chez les hôtes conditionnés par Bu/Cy représente une expansion, plutôt qu'une conversion *de novo*, car seuls de faibles niveaux de cellules T Foxp3+ sont détectés après transfert adoptif de cellules T dépourvues de Tregs (**CD25-CD3+ ; Figure 29**). Suite à ces résultats, nous avons pu vérifier le niveau de prolifération des cellules Tregs dans souris hôtes conditionnées Bu/Cy en réalisant un tri par cytométrie en flux sur la base du niveau d'expression du marqueur de prolifération CFSE des cellules CD4 greffées. Nos données indiquent que le pourcentage relatif de cellules Tregs est plus important dans les cellules CD4 greffées ayant fortement proliférées par rapport aux cellules de s'étant pas divisées (**23 vs 3% respectivement, Figure 30**).

Ainsi, nos données indiquent que le transfert adoptif de cellules T CD4 dans des souris conditionnées par Bu/Cy favorisent l'expansion de cellules Tregs, ce qui peut représenter un élément détriminaire dans le contexte des immunothérapies anti-tumorales.

A

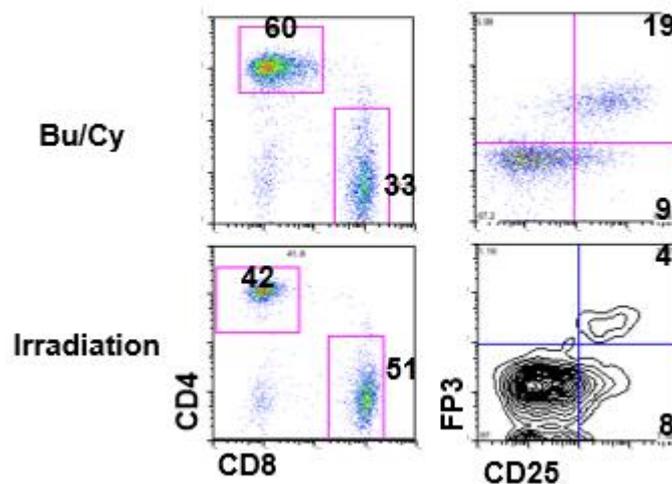


Figure 28. Le pourcentage de cellules Tregs greffées est différent après transfert chez un hôte irradié ou conditionné par Bu/Cy

Des cellules T issues de souris « donneur » sont transférées dans des souris C57BL/6-Thy1.2 pré-conditionnées par irradiation (6 Gy) ou Busulfan® (16,5 mg/kg x 4 doses) / Cyclophosphamide® (200 mg/kg). Les souris sont sacrifiées 7 jours après le transfert adoptif et la récupération des cellules T du donneur (Thy1.1+), les pourcentages relatifs de CD4/CD8 et de cellules Tregs Foxp3+ sont présentés.

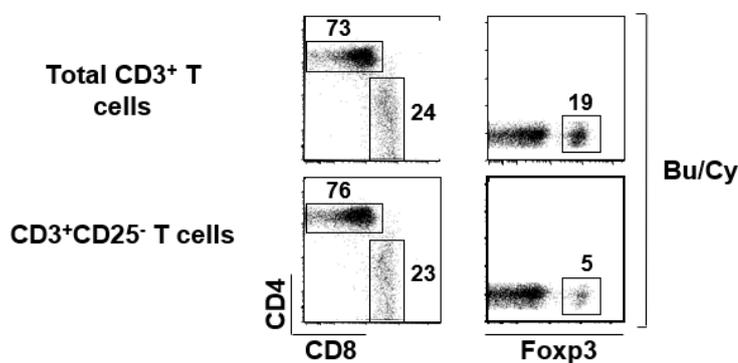


Figure 29. La lymphopénie générée par Bu/Cy entraîne l'expansion des cellules T régulatrices Foxp3+ greffées

Pour évaluer si les cellules T régulatrices greffées détectées chez les souris conditionnées Bu/Cy résultent d'une conversion de cellules T naïves vers un profil Treg ou d'une expansion des cellules Tregs injectées, les souris ont été injectées avec des cellules T totales ou des cellules T dépourvues de CD25hi (CD62L+CD44-CD25-CD3+). Les pourcentages de cellules T CD4/CD8 greffées est indiquée (graphiques de gauche) ainsi que le pourcentage de cellules CD4+Foxp3+ dans chaque condition (graphiques de droite).

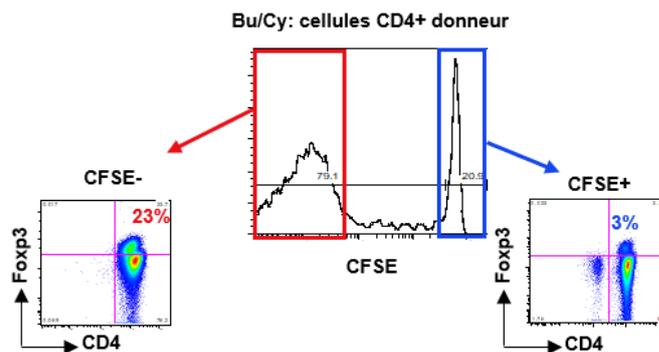


Figure 30. Le conditionnement Bu/Cy entraîne l'expansion des cellules T régulatrices Foxp3+ greffées

Des cellules T issues de souris « donneur » sont transférées dans des souris C57BL/6-Thy1.2 pré-conditionnées par busulfan (16,5 mg/kg x 4 doses) /cyclophosphamide (200 mg/kg). Les souris sont sacrifiées 7 jours après le transfert adoptif, et les cellules T CD4+ du donneur (Thy1.1+) sont triées par cytométrie en flux sur la base du niveau d'expression du marqueur de prolifération CFSE (CFSE + représentant les cellules n'ayant pas réalisées de division, et CFSE- représentant les cellules ayant fortement proliférées) les pourcentages relatifs. Le pourcentage de cellules Foxp3+ est ensuite évalué dans les populations de cellules CD4+CFSE+ et CD4+CFSE-

III. Analyse du potentiel anti tumoral de cellules T

Durant mon Diplôme, j'ai également contribué à la mise en place d'un modèle murin permettant d'évaluer le potentiel anti-tumoral de cellules T générées dans diverses conditions métaboliques et dirigées contre un antigène tumoral.

Brièvement, la différenciation des cellules T régulatrices suppressives (Treg) est contrôlée par diverses voies de signalisation immunométaboliques. Cependant, l'impact spécifique de métabolites intracellulaires sur le devenir des Tregs est moins connu. Dans ce contexte, les résultats de l'équipe montrent que l'ajout d' α -cétoglutarate (α KG), un métabolite issu de la dégradation de la glutamine contribuant au cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), atténue

considérablement la polarisation de cellules T CD4 naïves en cellules Tregs Foxp3+ et augmente l'expression des cytokines inflammatoires.

Ces données suggèrent ainsi que l' α KG pourrait modifier le phénotype et la persistance des cellules T anti-tumorales dans un contexte *in vivo*. Ceci est particulièrement critique puisqu'il a été démontré que la présence intra-tumorale de Tregs a un impact négatif sur le potentiel des cellules T effectrices à éradiquer la tumeur (Darrasse-Jèze et al. 2009) et que l'environnement " hostile " de la tumeur consomme des niveaux élevés de nutriments (Yong et al. 2017). Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué si l' α KG pouvait affecter la fonction effectrice de cellules T murines transgéniques exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR) dirigé contre l'antigène tumoral ERBB2/HER2 (ERBB2-CAR) (**Fig. 31A**).

Leur fonction a été évaluée contre le fibrosarcome 24JK, modifié pour exprimer ERBB2 (24JK-ERB), après transfert dans des souris RAG2-/- (Yong et al. 2016).

Pour cela, des cellules T CD4 naïves ERBB2-CAR ont été activées dans des conditions de polarisation Th1 ou Treg en l'absence ou en présence d' α KG pendant 6-7 jours et injectées dans des souris préalablement implantées avec des tumeurs 24JK-ERB. Au jour 20 après l'inoculation de la tumeur, les pourcentages de cellules T CD4 ERBB2-CAR dans les ganglions lymphatiques (LN) n'étaient pas significativement différents dans tous les groupes (**Fig. 31B**). Cependant, l'infiltration des cellules T dans la tumeur a été nettement augmentée par le traitement *ex vivo* avec l' α KG, atteignant des niveaux équivalents à ceux détectés pour les cellules polarisées Th1 ($52\pm 6\%$ vs. $23\pm 4\%$, $p=0,002$ **Fig. 31C**). En outre, l' α KG a nettement diminué les pourcentages de cellules T Foxp3+ ERBB2-CAR au niveau des LN et des tumeurs ($p<0,001$) et le potentiel de ces cellules à sécréter de l'IFN γ était significativement augmenté ($p<0,01$; **Fig. 31B**). Ainsi, ces données démontrent que le traitement par l' α KG pendant la période d'activation *ex vivo* modifie l'infiltration intra-tumorale *in vivo* et la persistance des cellules T transférées.

Dans le but d'améliorer cette technique, j'ai généré une lignée cellulaire 24JKERB luciférase (Paragraphe V- B- 2). Elle va permettre l'amélioration des mesures de la taille des tumeurs et la réduction du nombre d'animaux (remplacement des prélèvements pour avoir une tumeur totale à un temps précis par un passage à l'imagerie bioluminescente).

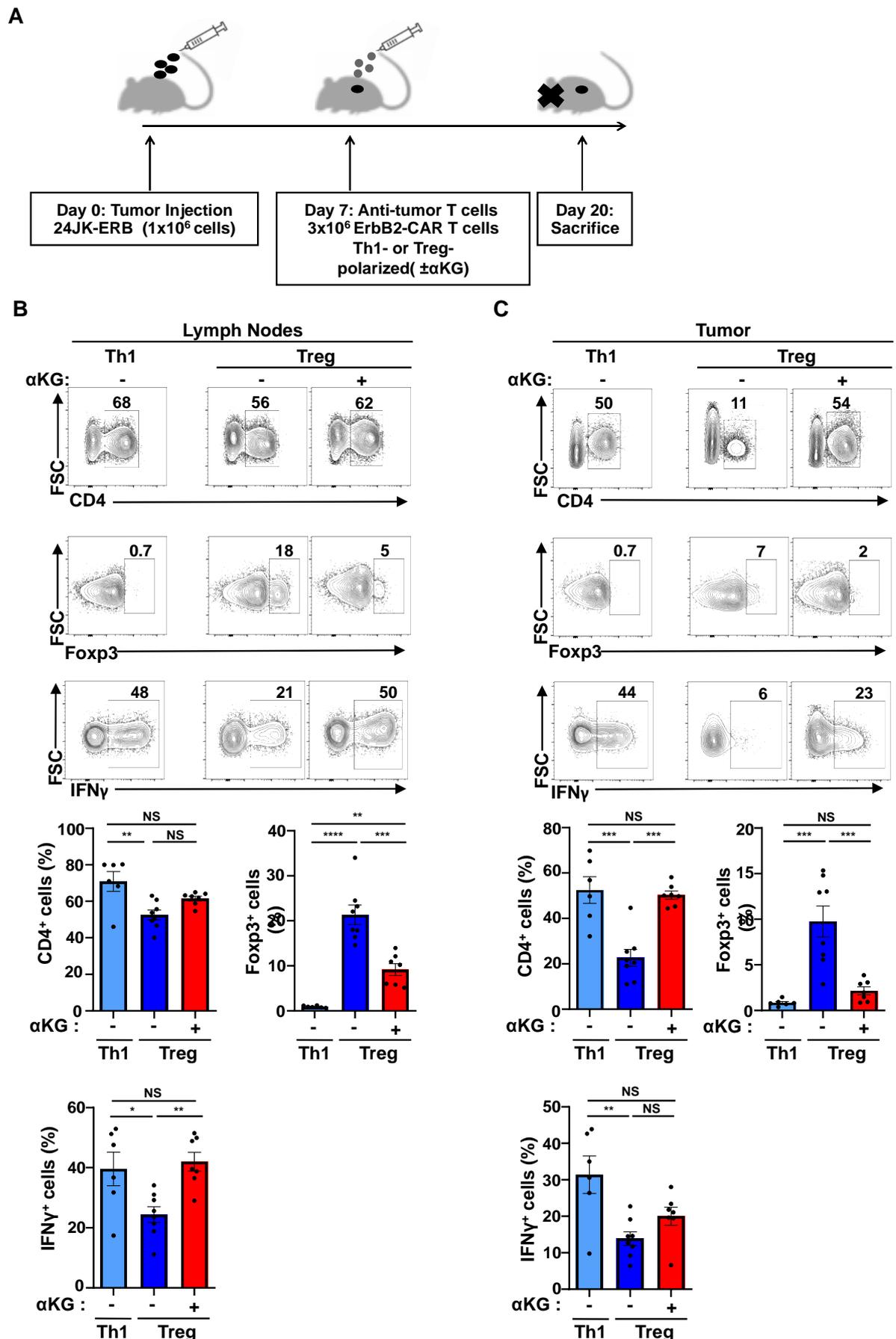


Figure 31. Potentiel anti tumoral des cellules T en présence ou absence d'αKG

A : Des cellules 2JKERB sont injectées en sous cutanée chez les souris RAG -/- (1×10^6) à jour 0, les tumeurs sont ensuite mesurées à jour 3 puis tous les 2 jours environ jusqu'à la fin de l'expérience. Les cellules T Erb2 CAR Tregs ou Th1 en présence ou absence d' α KG sont ensuite injectées à jour 7 en IO (3×10^6) puis les souris sont sacrifiées à jour 20. Les organes sont récupérés (tumeurs et nœuds lymphatiques) puis traités pour pouvoir observer les cellules par cytométrie en flux.

B : Les cellules observées sont celles présentes dans les nœuds lymphatiques. On peut observer le pourcentage de cellules CD4, Foxp3 ou INF γ sur une souris ayant été injectée avec des Th1 en absence d' α KG, des Tregs en absence ou en présence d' α KG.

C : Les cellules observées sont celles présentes dans les tumeurs. On peut observer le pourcentage de cellules CD4, Foxp3 ou INF γ sur une souris ayant été injectée avec des Th1 en absence d' α KG, des Tregs en absence ou en présence d' α KG.

IV. Maintien des différentes colonies de lignées murines

Mes différents projets étant tous basés sur l'utilisation de modèles murins, j'ai géré l'ensemble des colonies murines du laboratoire. Pour cela, il est indispensable de connaître les spécificités de chaque lignée. En effet, si certaines peuvent être maintenues à l'état homozygote, d'autres lignées dérivent rapidement et doivent donc être maintenues à l'état hétérozygote.

Pour les lignées hétérozygotes, mais aussi dans le cadre de la mise en place d'une nouvelle lignée, il faut donc phénotyper les animaux. Pour cela, un échantillon de sang est prélevé en intra-orbitale de la même manière que dans le *paragraphe V- A*. L'échantillon est ensuite traité de manière à isoler les leucocytes (par gradient de Ficoll), qui sont ensuite marqués à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques de la lignée. Ces échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux et un exemple des différents marquages est représenté en **Figure 32**. On peut ainsi observer le marquage d'une souris CAR négatif en **Figure 32-A** contrairement à la Figure 32-B ou nous pouvons observer une souris CARF38 positive. Les Figures C et D représentent respectivement les populations cellulaires obtenues chez des souris OT1 et OT2.

Ce phénotypage nous permet d'utiliser des animaux adéquats pour nos expériences mais aussi de maintenir les lignées en créant des accouplements.

Au cours de ces 3 ans j'ai pu donc apprendre à phénotyper les 11 lignées de souris que nous avons en notre possession dans les deux animaleries mais aussi créer les accouplements et gérer le stock d'animaux. Ce travail demande de la connaissance mais aussi de la rigueur car il est important de bien suivre tous les accouplements et les naissances pour pouvoir gérer au mieux le nombre d'animaux dont on a besoin (Règle des 3R). La règle des 3R est une règle primordiale dans le domaine *in vivo* puisqu'elle permet de :

Réduire : Réduire le nombre d'animaux quand cela est possible

Remplacer : Remplacer les animaux par des modèles *in vitro* ou *in silico*

Raffiner : Raffiner leurs conditions de vie (grâce aux enrichissements par exemple)

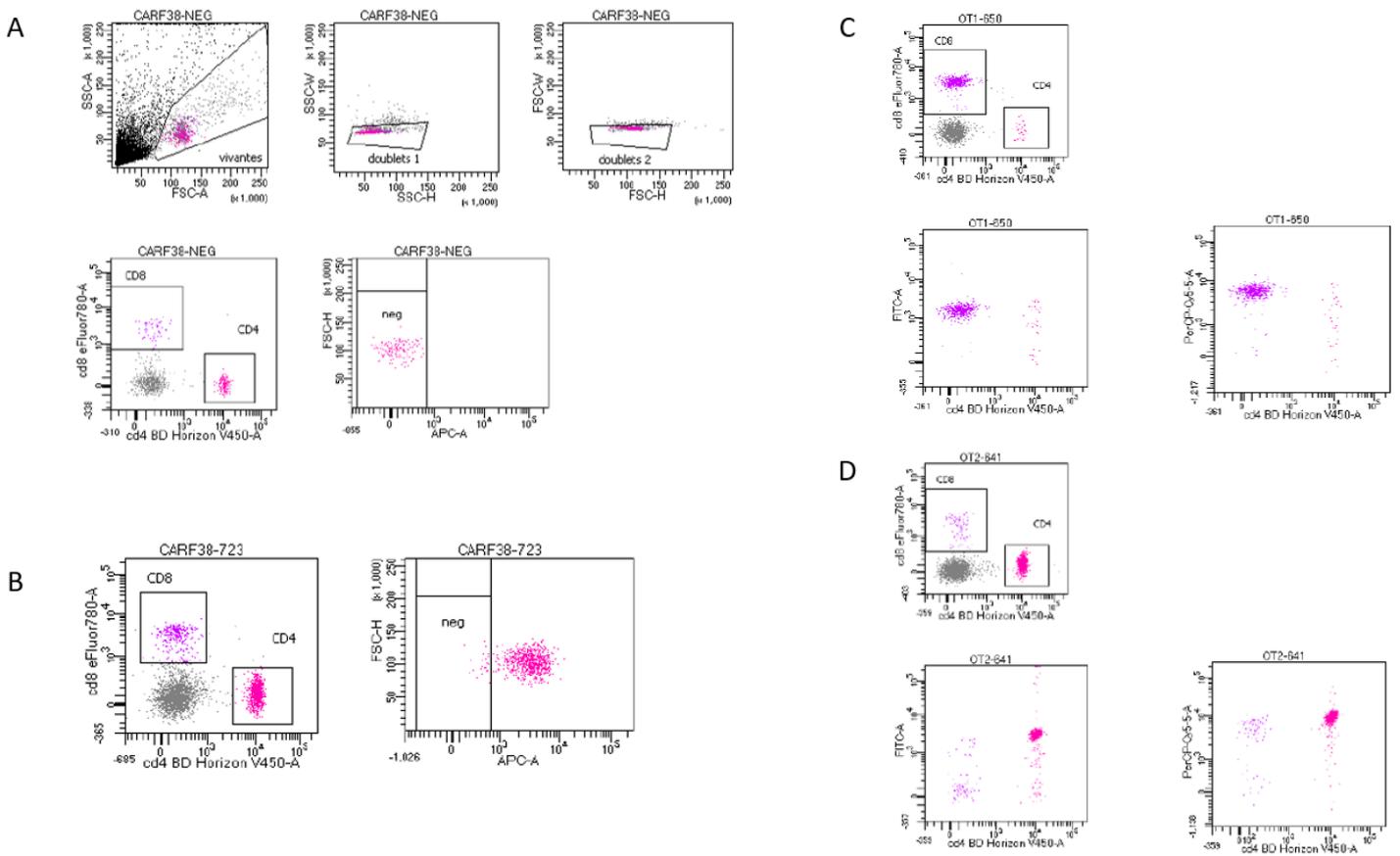


Figure 32. Phénotypage par cytométrie en flux

Après avoir été marqués, les leucocytes sont analysés par cytométrie en flux. Ainsi, la population de cellules vivantes est sélectionnée, les doublets de cellules sont éliminés pour pouvoir ensuite observer les populations qui nous intéressent. Dans la figure A, tout le cheminement est montré (3 premiers plots) sur une souris CARF38. Les cellules CD4 (abscisse) et les cellules CD8 (ordonnée) sont observées pour valider leur présence et le marqueur CAR est regardé également. Dans ce plot, il s'agit du témoin négatif (présence de l'anticorps secondaire mais pas primaire). Dans la Figure B, il s'agit d'une souris CARF38 également mais qui est positive pour le marqueur CAR. Dans la figure C, nous observons les cellules CD4 et CD8 chez une souris OT1 (souris ayant comme propriété d'avoir des CD8 mais peu voire pas de CD4). A contrario, dans la figure D, nous observons les cellules d'une souris OT2 qui possède des CD4 mais peu voire pas de CD8.

Conclusion – Perspectives

Durant ces 3 années, j'ai pu observer que le système immunitaire était aussi complexe qu'intéressant. Le système immunitaire est comme une chaîne à laquelle on ne peut enlever aucun maillon pour qu'il fonctionne correctement. Lorsque ce n'est pas le cas, cela entraîne des pathologies dont les auto-immunités ou encore les DICS. La compréhension des mécanismes régulant le fonctionnement des cellules du système immunitaire a permis de générer des immunothérapies basées sur leurs propriétés dont les immunothérapies par transfert de cellules. Au cours de mon stage, je me suis intéressée au développement de 2 approches, la thérapie cellulaire par transplantation de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement des DICS et celle basée sur le transfert de cellules T pour le traitement des cancers.

I. Amélioration de la thérapie cellulaire par ciblage direct du thymus

Les DICS sont des pathologies génétiques impactant la fonctionnalité du système immunitaire notamment en raison d'une absence de cellules T ou de cellules T non fonctionnelles. Le traitement conventionnel des DICS consiste en l'injection de cellules souches hématopoïétiques par voie intraveineuse qui permet de restaurer un système immunitaire fonctionnel. Bien qu'efficace, une limite importante de ce traitement reste le temps de reconstitution (temps nécessaire pour que le système immunitaire puisse être rétabli). Cette période, autour d'une centaine de jours pour obtenir un répertoire varié de cellules T, laisse les patients susceptibles aux infections et donc à des complications graves. Une des hypothèses permettant d'expliquer cette latence pourrait être liée à la spécificité du développement des cellules T qui se déroule dans un organe particulier, le thymus. Ainsi, l'obtention de cellules T matures nécessite tout d'abord la migration et l'entrée d'un progéniteur hématopoïétique de la moelle osseuse vers le thymus. Or, certaines études ont montré que ce dernier, au moins chez la souris, n'est pas toujours accessible, alternant des périodes réfractaires et réceptives à l'entrée des progéniteurs (Donskoy, Foss, et Goldschneider 2003; Foss, Donskoy, et Goldschneider 2001). Mon laboratoire d'accueil a ainsi proposé qu'une amélioration de l'efficacité de la transplantation de CSH pourrait être obtenue grâce au ciblage direct du thymus. Ils ont ainsi montré dans un modèle murin d'immunodéficiences génétiques que le ciblage direct de cellules progénitrices hématopoïétiques dans le thymus permet d'obtenir une reconstitution plus efficace à partir de moins de cellules. De plus, les données précédemment publiées par l'équipe montrent que le temps de reconstitution du compartiment T est réduit après injection (IT *versus* IV). Dans ce contexte, je me suis intéressée à la caractérisation des étapes précoces de prise de greffe et de différenciation des progéniteurs suite à leur injection dans le thymus.

Durant nos expériences, nous avons pu constater une variation entre souris du temps de reconstitution (même s'il reste sensiblement comparable). Ces données pourraient s'expliquer par le fait que l'injection intra-thymique est actuellement réalisée « à l'aveugle » (sous anesthésie mais sans imagerie et sans chirurgie) et ainsi, selon la partie/zone du thymus

où l'injection est réalisée, le temps de reconstitution et migration des cellules pourraient varier. En effet, le processus de différenciation des cellules T dans le thymus est associé à une migration précise au sein de l'organe (cellules DN puis DP dans le cortex et cellules SP4 ou SP8 dans la médulla). L'organisation thymique représente ainsi un paramètre essentiel. C'est pourquoi, une injection dans le cortex *versus* dans la médulla pourrait potentiellement avoir un impact (temps de reconstitution et devenir) sur les cellules injectées.

Pour évaluer cette hypothèse et éliminer ce potentiel biais au moment de l'injection, des expériences pourront être réalisées sous échographie afin d'évaluer la différence en termes de temps et de reconstitution cellulaire après une injection ciblée soit dans la médulla soit dans le cortex.

Nous avons suivi par cytométrie en flux le devenir des cellules progénitrices injectées et leur différenciation dans les différentes populations de thymocytes (DN, DP, CD4, CD8, Tregs) à différents temps post-injection. Nous avons ainsi pu observer une expansion importante des cellules progénitrices (environ 200x) associée à leur différenciation progressive vers le stade de cellules T matures. Cette différenciation s'effectue en environ 4 semaines, en accord avec la cinétique de différenciation T physiologique précédemment décrite. L'absence, tout au moins initiale, d'un environnement thymique en médulla ne semble donc pas affecter la prise de greffe et les premières étapes de différenciation. La thymopoïèse se stabilise ensuite et perdure pendant plus de 19 semaines comme précédemment montré par le laboratoire. Ces résultats suggèrent donc une prise de greffe rapide de progéniteurs qui vont pour la plupart se différencier alors que certains persisteront à l'état de progéniteurs et seront capables de s'auto-renouveler et de soutenir une thymopoïèse active au cours du temps.

De manière intéressante, lors de l'initiation de la thymopoïèse, nous avons pu observer la présence d'une population de thymocytes atypiques caractérisée par l'expression des marqueurs CD4+ CD8- CD3-. Cette population, observée environ 2 à 3 semaines après greffe, pourrait représenter des cellules LT_i qui sont connues pour leur rôle dans l'induction de la maturation de la médulla dans le thymus embryonnaire. Comme nous avons montré une restauration des zones de médulla autour de 4 à 6 semaines post-greffe, il sera intéressant de caractériser plus amplement cette population ainsi que son rôle potentiel. En effet, une architecture thymique optimale et en particulier la présence de médulla permet de soutenir un développement optimal des cellules T et en particulier la différenciation des cellules T reg. Ces dernières jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immune et en particulier dans le contexte des transplantations de CSH, dans le contrôle des GvHD. Nous avons donc déterminé leur présence et pu observer leur développement 4 semaines post-greffe. Il sera important dans le futur d'étudier la fonctionnalité de ces cellules notamment dans le contexte de greffe non compatible.

De manière plus générale, il serait aussi intéressant de réaliser ces expériences dans d'autres modèles d'immunodéficiences qui ont un thymus dont la taille est modifiée et qui ont un défaut dans d'autres lignages cellulaires que les cellules T (souris RAG-KO ou souris conditionnées par exemple). Dans ce contexte, il serait intéressant de regarder l'architecture thymique qui sera altérée plus sévèrement que dans le modèle ZAP-70. D'un point de vue thérapeutique, des injections combinées pourraient aussi être testées (IV+ IT) car cela pourrait

permettre de garder une reconstitution rapide du compartiment T et un développement des autres lignages.

L'ensemble de ces résultats conforte le caractère prometteur au niveau clinique de l'approche par ciblage direct du thymus. En effet, à plus long terme, cette approche pourrait être développée pour le traitement d'immunodéficiences grâce à une injection par échographie par exemple.

II. Impact du conditionnement sur le devenir des cellules T

L'objectif de ce projet était d'étudier l'impact du conditionnement sur le devenir et la fonction des cellules T injectées. Il est important de signaler que pour diverses raisons, incluant notamment, des restrictions générées par la pandémie COVID19 et en ces circonstances, d'importantes difficultés pour faire réparer l'appareil à irradiation, ce projet n'a pas pu être autant développé qu'espéré.

Grâce aux expériences menées, nous avons pu voir que selon le conditionnement (BuCy *versus* irradiation) les cellules de l'hôte étaient déjà affectées. En effet, dans la figure 24, on observe que alors que la souris irradiée a des pourcentages cellulaires (60% CD4 contre 30% CD8) qui se rapproche de ceux d'une souris contrôle, la souris ayant subi la chimiothérapie a des taux bien différents (50% de CD4 et 50% de CD8 environ). On peut donc en conclure que le traitement n'est déjà pas équivalent sur les cellules T de l'hôte.

De plus, les données obtenues indiquent clairement que le type de conditionnement utilisé (chimiothérapie ou irradiation) impacte fortement le type de prolifération des cellules T injectées. Nous observons une prolifération très rapide des cellules CD4 dans les souris traitées par BuCy *versus* une prolifération plus importante mais « lente » des cellules CD8 dans les souris irradiées, ce qui laisse suggérer que le mécanisme induisant la prolifération dans les deux cas est différent. Ces résultats nous laissent penser que pour les cellules CD4 des souris traitées BuCy, cela ressemble à une prolifération induite par un Ag alors que pour les cellules CD8 de souris traitées par irradiation, cela ressemble à une prolifération dite homéostatique en réponse à un signal cytokinique (Nakamura et al. 2009)

Parallèlement, nous avons aussi analysé le phénotype des cellules T injectées dans ces deux environnements lymphopéniques, et notamment associé à la prolifération observée. Ainsi, il a été observé que dans les souris traitées BuCy, les cellules CD4 qui prolifèrent sont majoritairement EM et CM (Effectrices Mémoires et Centrales Mémoires) alors que les cellules CD8 qui prolifèrent dans les souris hôtes irradiées sont majoritairement CM et naïves. Nos données montrent également qu'au sein des cellules CD4+, les cellules Tregs prolifèrent de manière importante dans les souris BuCy. Il s'agit d'un élément important à prendre en considération, car cette population de cellules T est notamment délétère dans le cadre d'une réponse anti-tumorale optimale. Par la suite, il faudrait aussi identifier l'origine de la prolifération des cellules CD4 dans les souris BuCy et regarder l'impact de ces conditionnements sur les autres cellules (immunes, épithéliales ...).

Il serait également important de compléter cette étude en évaluant les conséquences d'autres traitements chimiothérapeutiques (et en les comparant avec les résultats obtenus pour le conditionnement BuCy).

La radiothérapie et la chimiothérapie étant des traitements utilisés en clinique et nos données montrant clairement qu'ils ont un impact important sur l'environnement des cellules T, nos travaux pourraient permettre de redéfinir l'utilisation de ces deux types de conditionnements en fonction des contextes pathologiques et thérapeutiques.

III. Analyse du potentiel anti tumoral de cellules CAR T pré-traitées *in vitro* avec un métabolite du cycle de Krebs (alpha-kétoglutarate, α KG)

Grâce à ce projet, j'ai pu découvrir des méthodes innovantes qui sont actuellement utilisées en clinique comme la thérapie CAR (Chimeric Antigen Receptor). J'ai peu travaillé sur les aspects *in vitro* de ce projet mais plutôt sur les expériences mises en place *in vivo* pour évaluer l'efficacité des cellules CAR T générées *ex vivo*.

Brièvement, le modèle développé fait appel à l'implantation sous cutanée de cellules tumorales/fibrosarcomes (24JKERB) dans des souris RAG-KO et au transfert adoptif à jour 7 environ, de cellules T exprimant un récepteur reconnaissant l'antigène ERBB2 spécifiquement exprimé sur la lignée 24JKERB (cellules Th1 ou Tregs générées en présence ou absence d' α KG). Le développement tumoral était ensuite mesuré sur 2-3 semaines et le contenu immunitaire des ganglions drainants et de la tumeur ont été analysés au sacrifice des animaux. Nous avons donc pu observer que la présence d' α KG *ex vivo* pendant l'activation modifie l'infiltration intra tumorale *in vivo* et la persistance des cellules transférées.

Il serait intéressant sur les prochaines expériences d'analyser d'autres organes lymphatiques comme la rate ou le thymus pour observer ce qui se passe en présence ou absence de cellules tumorales et / ou de traitements.

Pour améliorer le modèle déjà en place au laboratoire, j'ai généré une lignée tumorale 24JKERB exprimant la luciférase afin de faciliter le suivi des animaux avec l'utilisation d'imagerie par bioluminescence pour la visualisation du développement tumoral.

Dans un futur proche, on pourrait utiliser d'autres modèles tumoraux ou penser à un modèle humanisé avec génération de cellules CAR T humaines traitées ou non avec α KG *ex vivo* et injection de ces cellules dans des souris NSG implantées avec des cellules tumorales.

IV. Perspectives personnelles

Durant ces 3 années de Diplôme EPHE, j'ai dû apprendre à gérer les colonies de souris (accouplements, phénotypage, SBEA) mais j'ai aussi appris à maîtriser différents modes d'injections, les anesthésies, l'utilisation de produits à risques (cancérogène, mutagène et reprotoxique) etc... Cette expérience m'a permis de réaliser mon fort intérêt pour l'expérimentation *in vivo*. Dans ce contexte, j'ai pu enrichir mes connaissances en suivant la formation concepteur en expérimentation (ex-niveau I) ainsi qu'une formation chirurgie. J'ai également fait partie du comité Bien-être animal (SBEA) de la zone protégée de notre institut et depuis 2019, je fais partie du comité d'éthique régional Languedoc Roussillon (CEPAL) afin de pouvoir aider les personnes dans leurs demandes de saisine, enrichir mon expérience concernant d'autres types d'expérimentations *in vivo* ou dans la conception de demandes de saisine.

Fort de cette expérience et de mon implication/intérêt dans le développement d'expérimentations *in vivo*, je viens d'être recrutée en CDI par l'entreprise Sensorion en tant qu'assistante ingénieure *in vivo* pour mener des études pré-cliniques en pharmacologie sur des modèles rongeurs (rats et souris) dans le domaine de l'audition. Je suis également responsable du bien-être animal et de la formation continue dans l'entreprise.

Bibliographie

- Adjali, O., Rita R. Vicente, Christophe Ferrand, Chantal Jacquet, Cédric Mongellaz, Pierre Tiberghien, Karim Chebli, Valérie S. Zimmermann, et Naomi Taylor. 2005. « Intrathymic Administration of Hematopoietic Progenitor Cells Enhances T Cell Reconstitution in ZAP-70 Severe Combined Immunodeficiency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (38): 13586-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504268102>.
- Arpaia, E., M. Shahar, H. Dadi, A. Cohen, et C. M. Roifman. 1994. « Defective T Cell Receptor Signaling and CD8+ Thymic Selection in Humans Lacking Zap-70 Kinase ». *Cell* 76 (5): 947-58. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90368-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90368-9).
- Arsenio, J., Boyko Kakaradov, Patrick J. Metz, Gene W. Yeo, et John T. Chang. 2015. « Reply to: "CD8(+) T Cell Diversification by Asymmetric Cell Division" ». *Nature Immunology* 16 (9): 893-94. <https://doi.org/10.1038/ni.3234>.
- Berard, M., et David F. Tough. 2002. « Qualitative Differences between Naïve and Memory T Cells ». *Immunology* 106 (2): 127-38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01447.x>.
- Bruchard, M., et François Ghiringhelli. 2014. « [Tumor microenvironment: regulatory cells and immunosuppressive cytokines] ». *Medecine Sciences: M/S* 30 (4): 429-35. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004018>.
- Croft, M. 1994. « Activation of Naive, Memory and Effector T Cells ». *Current Opinion in Immunology* 6 (3): 431-37. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90123-6).
- Czechowicz, A., Daniel Kraft, Irving L. Weissman, et Deepta Bhattacharya. 2007. « Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches ». *Science* 318 (5854): 1296-99. <https://doi.org/10.1126/science.1149726>.
- Darrasse-Jèze, G., Anne-Sophie Bergot, Aurélie Durgeau, Fabienne Billiard, Benoît L. Salomon, José L. Cohen, Bertrand Bellier, Katrina Podsypanina, et David Klatzmann. 2009. « Tumor Emergence Is Sensed by Self-Specific CD44^{hi} Memory Tregs That Create a Dominant Tolerogenic Environment for Tumors in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2648-62. <https://doi.org/10.1172/JCI36628>.
- De Barros, S.C., Valérie S. Zimmermann, et Naomi Taylor. 2013. « Concise Review: Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Targeting the Thymus ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (7): 1245-51. <https://doi.org/10.1002/stem.1378>.
- Dimeloe, S., Anne-Valérie Burgener, Jasmin Grählert, et Christoph Hess. 2017. « T-Cell Metabolism Governing Activation, Proliferation and Differentiation; a Modular View ». *Immunology* 150 (1): 35-44. <https://doi.org/10.1111/imm.12655>.
- Donskoy, E., Deborah Foss, et Irving Goldschneider. 2003. « Gated Importation of Prothymocytes by Adult Mouse Thymus Is Coordinated with Their Periodic Mobilization from Bone Marrow ». *The Journal of Immunology* 171 (7): 3568-75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3568>.
- Egerton, M., K. Shortman, et R. Scollay. 1990. « The Kinetics of Immature Murine Thymocyte Development in Vivo ». *International Immunology* 2 (6): 501-7. <https://doi.org/10.1093/intimm/2.6.501>.

- Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, et C. D. Surh. 1999. « The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery ». *Immunity* 11 (2): 173-81. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80092-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80092-8).
- Foss, D.L., Elina Donskoy, et Irving Goldschneider. 2001. « The Importation of Hematogenous Precursors by the Thymus Is a Gated Phenomenon in Normal Adult Mice ». *Journal of Experimental Medicine* 193 (3): 365-74. <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.365>.
- Gattinoni, L., Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M. Paulos, Máire F. Quigley, Jorge R. Almeida, et al. 2011. « A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell-like Properties ». *Nature Medicine* 17 (10): 1290-97. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>.
- Gennery, A.R. 2019. « Long Term Outcome and Immune Function After Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency ». 2019. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00381/full>.
- Ghiringhelli, F. 2013. « surveillance immune antitumorale et échappement », 5.
- Goldrath, A. W., et M. J. Bevan. 1999. « Selecting and Maintaining a Diverse T-Cell Repertoire ». *Nature* 402 (6759): 255-62. <https://doi.org/10.1038/46218>.
- Goldrath, A.W. 2002. « Maintaining the Status Quo: T-Cell Homeostasis ». *Microbes and Infection* 4 (5): 539-45. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01570-8](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01570-8).
- Goldrath, A.W., L. Y. Bogatzki, et M. J. Bevan. 2000. « Naive T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-Driven Proliferation ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (4): 557-64. <https://doi.org/10.1084/jem.192.4.557>.
- Golubovskaya, V., et Lijun Wu. 2016. « Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy ». *Cancers* 8 (3): E36. <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>.
- Jaigirdar, S.A., et Megan K. L. MacLeod. 2015. « Development and Function of Protective and Pathologic Memory CD4 T Cells ». *Frontiers in Immunology* 6: 456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00456>.
- Kaech, S.M., Scott Hemby, Ellen Kersh, et Rafi Ahmed. 2002. « Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation ». *Cell* 111 (6): 837-51. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01139-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01139-x).
- Kieper, W. C., et S. C. Jameson. 1999. « Homeostatic Expansion and Phenotypic Conversion of Naïve T Cells in Response to Self Peptide/MHC Ligands ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13306-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13306>.
- Lanzavecchia, A., et Federica Sallusto. 2005. « Understanding the Generation and Function of Memory T Cell Subsets ». *Current Opinion in Immunology* 17 (3): 326-32. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.010>.
- Leeuwen, E.M.M. van, Jonathan Sprent, et Charles D. Surh. 2009. « Generation and Maintenance of Memory CD4(+) T Cells ». *Current Opinion in Immunology* 21 (2): 167-72. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.02.005>.
- Li, X.M., Ali Mohammad-Djafari, Mircea Dumitru, Sandrine Dulong, Elisabeth Filipiski, Sandrine Siffroi-Fernandez, Ali Mteyrek, et al. 2013. « A Circadian Clock Transcription Model for the Personalization of Cancer Chronotherapy ». *Cancer Research* 73 (24): 7176-88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1528>.
- Löhning, M., Ahmed N. Hegazy, Daniel D. Pinschewer, Dorothea Busse, Karl S. Lang, Thomas Höfer, Andreas Radbruch, Rolf M. Zinkernagel, et Hans Hengartner. 2008. « Long-Lived Virus-Reactive Memory T Cells Generated from Purified Cytokine-Secreting T

- Helper Type 1 and Type 2 Effectors ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (1): 53-61. <https://doi.org/10.1084/jem.20071855>.
- Lopes, Noëlla, Arnauld Sergé, Pierre Ferrier, et Magali Irla. 2015. « Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction ». *Frontiers in Immunology* 6: 365. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00365>.
- Loughran, S.J., Simon Haas, Adam C. Wilkinson, Allon M. Klein, et Marjorie Brand. 2020. « Lineage Commitment of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors: Insights from Recent Single Cell and Lineage Tracing Technologies ». *Experimental Hematology* 88: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.07.002>.
- MacLeod, C.M., et E.B. Glen. 2017. « The Production Effect in Memory ». 2017. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0963721417691356>.
- Mahnke, Y.D., Tess M. Brodie, Federica Sallusto, Mario Roederer, et Enrico Lugli. 2013. « The Who's Who of T-Cell Differentiation: Human Memory T-Cell Subsets ». *European Journal of Immunology* 43 (11): 2797-2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>.
- McKinstry, K.K., Tara M. Strutt, et Susan L. Swain. 2010. « The Potential of CD4 T-Cell Memory ». *Immunology* 130 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03259.x>.
- Miller, J. F. a. P. 1962. « Immunological Significance of the Thymus of the Adult Mouse ». *Nature* 195 (4848): 1318-19. <https://doi.org/10.1038/1951318a0>.
- Mondino, A., Valérie Dardalhon, Rodrigo Hess Michelini, Severine Loisel-Meyer, et Naomi Taylor. 2010. « Redirecting the Immune Response: Role of Adoptive T Cell Therapy ». *Human Gene Therapy* 21 (5): 533-41. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.033>.
- Mueller, S.N., Thomas Gebhardt, Francis R. Carbone, et William R. Heath. 2013. « Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence ». *Annual Review of Immunology* 31 (1): 137-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>.
- Murali-Krishna, K., et R. Ahmed. 2000. « Cutting Edge: Naive T Cells Masquerading as Memory Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (4): 1733-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.4.1733>.
- Nakamura, Tatsuya, Syunzo Hatooka, Takeshi Kodaira, Hiroyuki Tachibana, Natsuo Tomita, Rie Nakahara, Haruo Inokuchi, et al. 2009. « Determination of the Irradiation Field for Clinical T1-T3N0M0 Thoracic/Abdominal Esophageal Cancer Based on the Postoperative Pathological Results ». *Japanese Journal of Clinical Oncology* 39 (2): 86-91. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyn131>.
- Nitta, T., Sachiko Nitta, Yu Lei, Martin Lipp, et Yousuke Takahama. 2009. « CCR7-Mediated Migration of Developing Thymocytes to the Medulla Is Essential for Negative Selection to Tissue-Restricted Antigens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40): 17129-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906956106>.
- Notarangelo, L.D. 2010. « Primary Immunodeficiencies ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2): S182-194. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.053>.
- Raphael, I., Saisha Nalawade, Todd N. Eagar, et Thomas G. Forsthuber. 2015. « T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases ». *Cytokine* 74 (1): 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
- Roifman, C. M., D. Hummel, H. Martinez-Valdez, P. Thorner, P. J. Doherty, S. Pan, F. Cohen, et A. Cohen. 1989. « Depletion of CD8+ Cells in Human Thymic Medulla Results in

- Selective Immune Deficiency ». *The Journal of Experimental Medicine* 170 (6): 2177-82. <https://doi.org/10.1084/jem.170.6.2177>.
- Straathof, Karin C., Kanchan Rao, Matthias Eyrich, Geoff Hale, Prudence Bird, Eleanor Berrie, Lucinda Brown, et al. 2009. « Haemopoietic Stem-Cell Transplantation with Antibody-Based Minimal-Intensity Conditioning: A Phase 1/2 Study ». *The Lancet* 374 (9693): 912-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60945-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60945-4).
- Surh, C.D., et Jonathan Sprent. 2008. « Homeostasis of Naive and Memory T Cells ». *Immunity* 29 (6): 848-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002>.
- Takahama, Y. 2006. « Journey through the Thymus: Stromal Guides for T-Cell Development and Selection ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (2): 127-35. <https://doi.org/10.1038/nri1781>.
- Vicente, R., Oumeya Adjali, Chantal Jacquet, Valérie S. Zimmermann, et Naomi Taylor. 2010. « Intrathymic Transplantation of Bone Marrow-Derived Progenitors Provides Long-Term Thymopoiesis ». *Blood* 115 (10): 1913-20. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-229724>.
- Voehringer, David, Hong-Erh Liang, et Richard M. Locksley. 2008. « Homeostasis and Effector Function of Lymphopenia-Induced “Memory-like” T Cells in Constitutively T Cell-Depleted Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (7): 4742-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4742>.
- Wan, Y.Y., et Richard A. Flavell. 2009. « How Diverse--CD4 Effector T Cells and Their Functions ». *Journal of Molecular Cell Biology* 1 (1): 20-36. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp001>.
- Yong, C.S.M., Valerie Dardalhon, Christel Devaud, Naomi Taylor, Phillip K. Darcy, et Michael H. Kershaw. 2017. « CAR T-Cell Therapy of Solid Tumors ». *Immunology and Cell Biology* 95 (4): 356-63. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.128>.
- Yong, C.S.M., Liza B. John, Christel Devaud, Miles H. Prince, Ricky W. Johnstone, Joseph A. Trapani, Phillip K. Darcy, et Michael H. Kershaw. 2016. « A Role for Multiple Chimeric Antigen Receptor-Expressing Leukocytes in Antigen-Specific Responses to Cancer ». *Oncotarget* 7 (23): 34582-98. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9149>.



Cancer et immunodéficiences : Développement d'immunothérapies par transfert adoptif

RIVIERE Anaïs

04/10/2021

Résumé

La thérapie cellulaire est aujourd'hui une méthode plus que prometteuse. En effet, déjà utilisée en clinique, elle permet de soigner des personnes notamment atteintes d'immunodéficiences ou de cancers. Cependant, des limitations demeurent concernant l'utilisation de ces approches et c'est pourquoi, au cours de ces 3 années, mes travaux ont porté sur l'optimisation de deux types de thérapie cellulaire : la correction d'immunodéficiences génétiques en cellules T par ciblage direct du thymus, et l'évaluation de l'impact du conditionnement (radiothérapie *versus* chimiothérapie) sur le devenir des cellules T dans le contexte de thérapies anti-tumorales.

Dans un premier temps, je me suis donc intéressée à l'optimisation du traitement d'immunodéficiences génétiques par transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Dans ce contexte, mon laboratoire d'accueil a précédemment montré, dans un modèle murin d'immunodéficiences liées à ZAP-70, que le ciblage direct des CSH dans le thymus permet d'obtenir une reconstitution plus rapide et plus efficace des cellules T à partir de l'injection de moins de cellules. Suite à ces résultats, il était important de caractériser les étapes précoces de la prise de greffe et de différenciation des cellules progénitrices injectées. Nous avons ainsi pu montrer une expansion importante (>200x) des progéniteurs hématopoïétiques directement injectés dans le thymus en 3 semaines. Cette expansion est associée à la différenciation des progéniteurs en cellules T matures selon une cinétique et les stades physiologiques. De manière intéressante, nous avons également observé une restauration rapide de l'environnement thymique ainsi que la différenciation de cellules T régulatrices. Mes travaux ont ainsi permis de mettre en évidence une prise de greffe efficace et la mise en place rapide d'une thymopoïèse optimale après ciblage de progéniteurs hématopoïétiques dans le thymus.

En parallèle, je me suis intéressée à un projet visant à optimiser les immunothérapies anti-cancer par transfert adoptif de cellules T. L'immunothérapie par transfert adoptif de cellules T représente une approche innovante particulièrement prometteuse qui s'appuie sur l'injection de cellules T autologues spécifiques d'antigènes tumoraux, préalablement manipulées et amplifiées *ex vivo*, chez des patients rendus lymphopéniques par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Toutefois, même si l'état lymphopénique est induit par ces 2 protocoles de conditionnements, leurs effets sur l'environnement de l'hôte ainsi que sur le devenir des cellules T greffées sont mal connus. Par le biais de modèles murins, nous avons pu démontrer que le devenir des cellules T diffère après transfert dans des souris irradiées ou traitées par chimiothérapie Busulfan®/ Cyclophosphamide® (Bu/Cy). Ainsi, après transfert dans des animaux irradiés, on observe une prolifération préférentielle des cellules T CD8, alors qu'un transfert chez des souris traitées Bu/Cy se traduit par une prolifération rapide des cellules T CD4. De plus, ces comportements sont associés à différents phénotypes et notamment un pourcentage élevé des cellules T régulatrices dans les souris Bu/Cy. L'ensemble de ces travaux montrent que les traitements lymphopéniques génèrent des environnements distincts capables de moduler le devenir des cellules T greffées.