



**HAL**  
open science

# De la tolérance immunitaire à la thérapie génique de l'infection par le VIH

Gilles Marodon

► **To cite this version:**

Gilles Marodon. De la tolérance immunitaire à la thérapie génique de l'infection par le VIH. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. tel-00595034

**HAL Id: tel-00595034**

**<https://theses.hal.science/tel-00595034>**

Submitted on 23 May 2011

**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.

# Habilitation à Diriger les Recherches

Année 2010/2011

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6



Dr Gilles MARODON

UPMC CNRS UMR 7211 / INSERM U959

Hôpital de la Pitié Salpêtrière

PARIS

## Table des matières

I. Curriculum vitae .....	3
II. Publications.....	7
III. Travaux scientifiques .....	9
A. Le système immunitaire normal et pathologique .....	9
B. La différenciation des lymphocytes T dans le thymus .....	12
1. De la sélection des thymocytes immatures à la régulation du gène CD4.....	12
2. De l'induction de la tolérance immunitaire à la plasticité des lymphocytes T régulateurs .....	15
C. De l'immuno-physiopathologie de l'infection par le VIH à la thérapie génique .....	19
1. Une nouvelle population de cellules infectées par le VIH in vivo.....	19
2. Développement d'un modèle animal de l'infection par le VIH chez la souris humanisée.....	20
D. Projet de recherche .....	22
1. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la tolérance immunitaire .....	22
2. Stratégies thérapeutiques translationnelles.....	24
a) Thérapie génique de l'infection par le VIH .....	24
b) Modulation pharmacologique de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs humains.....	28
E. Conclusions.....	33
F. Références.....	33
IV. Expérience d'encadrement.....	40
V. Résumé en français .....	42
VI. Résumé en anglais.....	43

## I. Curriculum vitae

### Adresse professionnelle :

UPMC/CNRS UMR 7211 INSERM U959  
83, Bd de l'Hôpital  
CERVI – Hôpital de la Pitié Salpêtrière  
75013 PARIS  
01 42 17 74 68  
[gilles.marodon@upmc.fr](mailto:gilles.marodon@upmc.fr)

### Adresse personnelle :

59, rue Saint Blaise, 75020 PARIS  
01 75 50 19 48/06 45 15 29 48  
[gilles.marodon@noos.fr](mailto:gilles.marodon@noos.fr)

Né à Bourges (18) le 21/10/1965 - Marié - 2 enfants

### *Diplômes*

- 1994 Doctorat Sciences de la Vie (spécialité : immunologie), Université Pierre et Marie Curie, Paris (Mention très honorable avec félicitations du jury)
- 1991 Diplômes d'Étude Approfondie (DEA) d'Immunologie, Université Pierre et Marie Curie, Institut Pasteur
- 1990 Maîtrise Biologie Cellulaire/Immunologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris
- 1988 Maîtrise Biologie Cellulaire/Génétique, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

### *Expériences professionnelles*

- 2006-présent Chargé de Recherche CR1 INSERM, Unité CNRS 7211 INSERM U959 – Immunologie, Immunopathologie, Immunothérapie, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris, Dir : Pr D. Klatzmann
- 1999-2006 Chercheur post-doctorant, Unité CNRS UMR 7087 – Biologie et thérapeutique des pathologies immunitaires, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris  
Supervision : Pr D. Klatzmann
- 1995 - 1998 Chercheur post-doctorant, Département d'Immunologie - Weill Medical College of Cornell University (New York, USA), Supervision : Pr D.N Posnett
- 1991 – 1994 Doctorant en Sciences de la Vie spécialité Immunologie, INSERM U345, Institut Necker, Directeur de thèse: Dr B. Rocha

### *Encadrement et enseignement*

- Encadrement et formation de 6 Assistants Ingénieurs (2001-2010), 4 étudiants en Master 1 et 2 (2001-2010), d'un doctorant (depuis 2007) et d'un chercheur post-doctorant (2007-2008)
- Enseignement :
  - Master PRI, Master ImmunoTech, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2000-2010 (env 10h/an)
  - Supbiotech : Gene Therapy (20h ; 2008,2009,2010)
  - Epsilon ; Bases de l'Immunologie (10h ; 2008)
  - Agence Nationale du Médicament Vétérinaire : L'immunité anti-tumorale (24h, 2010) (au titre de la Formation continue de l'UPMC)

### *Réalisations*

- Financements de projets
  - en tant qu'investigateur principal: ANRS (2007-2009 ; 150 k€) ANRS (2009-2011 ; 220 k€) AFM (2008-2010 ; 75k€), IFR113 (2008 ; 10 k€) ANR (2010-2013 ; en cours d'évaluation)
  - en tant que partenaire : ANR (2005-2008 ; 180 k€)
- Interventions orales :
  - "Activation and Differentiation of T lymphocytes", Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (1994)
  - IX<sup>ème</sup> Conférences Jacques Cartier "Pathogenèse du SIDA", S<sup>te</sup>-Adèle, Québec, Canada (1996)
  - "Molecular Aspects of Viral Immunity", Keystone Symposia, Tammarron, CO, USA (1998)
  - I<sup>ère</sup> journée de la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique, Paris (2000)
  - IV<sup>ème</sup> réunion annuelle de l'American Society of Gene Therapy, Seattle, WA, USA (2001)
  - IV<sup>ème</sup> journées de la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique, Paris (2004)
  - XIII<sup>ème</sup> Congrès annuel de la Société Européenne de Thérapie Génique, Prague, République (2005)
  - XIII<sup>ème</sup> Colloque Cytokines du Croisic (Société Française d'Immunologie, 2010)
- Interventions orales invitées :
  - Atelier technologique du Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie (Lyon, 11/2007)
  - French-Israeli Workshop on Regulatory T cells, Tolerance and Immunotherapy (14-15 September 2008)
  - Immunotoxicology of Gene Therapy : a joint Clinigene think-tank (Paris, 01/2009)

- Congrès annuel de la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique (2009, Paris)
- « Systems biology approaches to Immunology – getting insights into the complexities of the immune system », 4/11/2009, Becton Dickinson, Rungis
- Brevet délivré 31.12.2008 publié sous le numéro WO/2005/117989 « Drugs for the prevention or treatment of immunodeficiencies, autoimmune diseases or for the induction of immune tolerance »

### *Responsabilités*

- Co-organisateur de la journée scientifique inter-IFR de la Pitié Salpêtrière sur le thème des micros-ARN (27 Novembre 2008)
- Responsable au sein de l'unité de la veille technologique et scientifique et du développement durable (définitions des besoins et achats de nouvelles technologies et de logiciels experts, mise en place de technologies de remplacement aux protocoles polluants, etc)
- Correspondant Bibliovie/BiblioINSERM pour la gestion de l'accès aux ressources électroniques du laboratoire
- Co-responsable scientifique de la plateforme des Souris Humanisées Pitié-Salpêtrière (ShuPS)

### *Appartenance à des sociétés savantes*

- Membre du conseil d'administration de la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique
- Membre de la Société Française d'Immunologie
- Membre du bureau du Réseau Cellules Souches (USCI) de l'UPMC

### *Collaborations*

- Nationales:
  - ImmunID Tech., CEA Grenoble: Etude du répertoire immunitaire humain chez la souris humanisée
  - INSERM UMR-S 681 (Paris): Induction de la tolérance immunitaire au FVIII par injection intrathymique de vecteurs lentiviraux
  - Institut Pasteur: Infection de souris humanisées par le VIH à tropisme CCR5
  - INSERM UMR-S 945 (Paris)/ Laboratoire de Virologie AP-HP La Pitié-Salpêtrière: Thérapie génique de l'infection par le VIH chez la souris humanisée
- Internationales:

- NIAID MHC tetramer core facility (Dr A. Stout) : Class-II tetramers for tracking HA-specific CD4+ T cells in mice
- Dr D. von Laer (Francfort, Allemagne) : A membrane bound form of T20 for inhibition of HIV infection
- Pr J. Huehn (Braunschweig, Allemagne) : Methylation status of foxp3 regulatory sequences
- Dr B. Balderas, (Becton-Dickinson, San Diego, USA) : Nouveaux réactifs pour la cytométrie de flux
- Dr H. Kissel (Taconic-Artemis, Cologne, Allemagne) : Nouveau modèle murin de déficits enzymatiques inductibles
- Dr K. Reimann (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard, USA) : Rôle des cellules T CD8+ dans le contrôle de l'infection par le VIH chez la souris humanisée

## II. Publications

	Publications dans des revues à comité de lecture	IF 2008
1	<b>MARODON, G.</b> AND ROCHA, B. 1994. GENERATION OF MATURE T CELLS IN THE THYMUS: CD4 OR CD8 DOWN-REGULATION OCCURS AT DIFFERENT STAGES OF THYMOCYTE DEVELOPMENT. <i>EUR. J. IMMUNOL</i> 24:196-204	4,86
2	<b>MARODON, G.</b> AND ROCHA, B. 1994. ACTIVATION AND "DELETION" OF SELF-REACTIVE MATURE AND IMMATURE T CELLS DURING ONTOGENY OF MLS-1A MICE: IMPLICATIONS FOR NEONATAL TOLERANCE INDUCTION. <i>INT. IMMUNOL.</i> 6:1899-1904.	3,16
3	CHIES*, J. A., <b>MARODON*</b> , G., JORET*, A. M., REGNAULT, A., LEMBEZAT, M. P., ROCHA, B., AND FREITAS, A. A. 1995. PERSISTENCE OF V BETA 6+ T CELLS IN MLS-1A MICE. A ROLE FOR THE THIRD COMPLEMENTARITY-DETERMINING REGION (CDR3) OF THE T CELL RECEPTOR BETA CHAIN IN SUPERANTIGEN RECOGNITION. <i>J IMMUNOL</i> 155:4171-8 *EQUAL CONTRIBUTIONS.	6,00
4	LUCAS, B., <b>MARODON, G.</b> , AND PENIT, C. 1995. CD4LOTCRINT THYMOCYTE SUBSET DO NOT BELONG TO THE CD8 LINEAGE PATHWAY. <i>J. IMMUNOL.</i> 156:1743-1747.	6,00
5	<b>MARODON, G.</b> , WARREN, D., FILOMIO, M. C., AND POSNETT, D. N. 1999. PRODUCTIVE INFECTION OF DOUBLE NEGATIVE T CELLS WITH HIV IN VIVO. <i>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA</i> 96:11958-11963.	9,38
6	<b>MARODON, G.</b> , LANDAU, N. R., AND POSNETT, D. N. 1999. ALTERED EXPRESSION OF CD4, CD54, CD62L, AND CCR5 IN PRIMARY LYMPHOCYTES PRODUCTIVELY INFECTED WITH THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS. <i>AIDS RES HUM RETROVIRUSES</i> 15:161-71.	2,02
7	POSNETT, D. N., EDINGER, J. W., MANALAVAN, J. S., IRWIN, C., AND <b>MARODON, G.</b> 1999. DIFFERENTIATION OF HUMAN CD8 T CELLS: IMPLICATIONS FOR IN VIVO PERSISTENCE OF CD8+CD28- CYTOTOXIC EFFECTOR CLONES. <i>INT. IMMUNOL.</i> 11:229-241.	3,18
8	ZHAO-EMONET, J. C., <b>MARODON, G.</b> , PIOCHE, C., COSSET, F.-L., AND KLATZMANN, D. 2000. T-CELL SPECIFIC EXPRESSION FROM MO-MLV RETROVIRAL VECTORS CONTAINING A CD4 MINI-PROMOTER/ENHANCER. <i>J. GENE MED.</i> 2:416-425.	3,14
9	<b>MARODON, G.</b> 2001. CD4 DOWN MODULATION ON T-CELLS: AN 'IMMUNE' CHECKPOINT FOR HIV. <i>IMMUNOL LETT</i> 79:165-8.	2,85
10	BOYER, O., <b>MARODON, G.</b> , COHEN, J. L., LEJEUNE, L., IRINOPOULOU, T., LIBLAU, R., BRUNEVAL, P., AND KLATZMANN, D. 2002. HUMAN CD4 EXPRESSION AT THE LATE SINGLE-POSITIVE STAGE OF THYMIC DEVELOPMENT SUPPORTS T CELL MATURATION AND PERIPHERAL EXPORT IN CD4-DEFICIENT MICE. <i>J IMMUNOL</i> 169:4347-53.	6,00
11	<b>MARODON, G.</b> , MOULY, E., BLAIR, E. J., FRISEN, C., LEMOINE, F. M., AND KLATZMANN, D. 2003. SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION IN HUMAN AND MOUSE CD4+ CELLS USING LENTIVIRAL VECTORS WITH REGULATORY SEQUENCES FROM THE CD4 GENE. <i>BLOOD</i> 101:3416-23.	10,43
12	<b>MARODON, G.</b> AND KLATZMANN, D. 2004. IN SITU TRANSDUCTION OF STROMAL CELLS AND THYMOCYTES UPON INTRATHYMIC INJECTION OF LENTIVIRAL VECTOR. <i>BMC IMMUNOL.</i> 5:18-24.	2,66
13	DARRASSE-JEZE, G., <b>MARODON, G.</b> , CATALA, M., SALOMON, B., AND KLATZMANN, D. 2004. ONTOGENY OF CD4+CD25+ REGULATORY/SUPPRESSOR	10,43



	T CELLS IN THE HUMAN FETUS. <i>BLOOD</i> 105:4715-4721.	
<b>14</b>	ADJALI, O., <b>MARODON, G.</b> , STEINBERG, M., MONGELLAZ, C., THOMAS-VASLIN, V., JACQUET, C., TAYLOR, N., AND KLATZMANN, D. 2005. IN VIVO CORRECTION OF ZAP-70 IMMUNODEFICIENCY BY INTRATHYMIC GENE TRANSFER. <i>J CLIN INVEST</i> 115:2287-95.	<b>16,56</b>
<b>15</b>	BILLIARD, F., LITVINOVA, E., SAADOUN, D., DJELTI, F., KLATZMANN, D., COHEN, J. L., <b>MARODON*, G.</b> , AND SALOMON*, B. 2006. REGULATORY AND EFFECTOR T-CELL ACTIVATION LEVELS ARE PRIME DETERMINANTS OF IN VIVO IMMUNE REGULATION. <i>J IMMUNOL</i> 177 2167-2174 *EQUAL CONTRIBUTIONS.	<b>6,00</b>
<b>16</b>	<b>MARODON, G.</b> , FISSON, S., LEVACHER, B., FABRE, M., SALOMON, B., AND KLATZMANN, D. 2006. INDUCTION OF ANTIGEN-SPECIFIC TOLERANCE BY INTRATHYMIC INJECTION OF LENTIVIRAL VECTORS. <i>BLOOD</i> 108:2972-2978.	<b>10,43</b>
<b>17</b>	MOULY, E., DORIVAL, C., PFLUMIO, F., BAILLOU, C., COULOMBEL, L., LEVY, Y., LEMOINE, F. M., KLATZMANN, D., AND <b>MARODON, G.</b> 2007. CD4 REGULATION IN HUMAN LYMPHOID NON-T-CELLS: A ROLE FOR THE SILENCER ELEMENT. <i>MOL IMMUNOL</i> 44:267-275.	<b>3,55</b>
<b>18</b>	<b>MARODON, G.</b> , DESJARDINS, D., MERCEY, L., BAILLOU, C., PARENT, P., MANUEL, M., CAUX, C., BELLIER, B., PASQUAL, N., AND KLATZMANN, D. 2009. HIGH DIVERSITY OF THE IMMUNE REPERTOIRE IN HUMANIZED NOD.SCID.GC-/- MICE. <i>EUR J IMMUNOL</i> 39:2136-2145.	<b>4,86</b>
<b>19</b>	GRINBERG-BLEYER, Y., D. SAADOUN, A. BAEYENS, F. BILLIARD, J.D. GOLDSTEIN, S. GREGOIRE, G.H. MARTIN, R. ELHAGE, N. DERIAN, W. CARPENTIER, <b>G. MARODON, D.</b> KLATZMANN, E. PIAGGIO, AND B.L. SALOMON. 2010. PATHOGENIC T CELLS HAVE A PARADOXICAL PROTECTIVE EFFECT IN MURINE AUTOIMMUNE DIABETES BY BOOSTING TREGS. <i>J CLIN INVEST</i> 120:4558-4568.	<b>16,56</b>
<b>20</b>	GOLDSTEIN, J., R.S. BALDERAS, AND <b>G. MARODON.</b> 2011. CONTINUOUS ACTIVATION OF THE CD122/STAT-5 SIGNALING PATHWAY DURING SELECTION OF ANTIGEN-SPECIFIC REGULATORY T CELLS IN THE MURINE THYMUS. <i>PLOS ONE</i> IN PRESS	<b>4,35 (IF2009)</b>

Niveau des revues	Nombre de signatures en premier ou dernier auteur	Nombre de signatures dans un autre rang d'auteur	Facteur d'impact des revues concernées
A	<b>8</b>	<b>5</b>	De 4,35 à 16,56
B	<b>4</b>	<b>0</b>	De 2,02 à 3,55
Autres	<b>2</b>	<b>1</b>	De 2,66 à 3,14

h index (Web of Science)= 11

### **III. Travaux scientifiques**

Mes travaux de recherche s'articulent autour de deux axes majeurs : d'une part, l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la tolérance immunitaire et d'autre part, l'étude des mécanismes immuno-physio-pathologiques de l'infection par le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). De ces deux grands axes émerge une activité de recherche translationnelle visant à établir des thérapies innovantes des maladies du système immunitaire.

#### ***A. Le système immunitaire normal et pathologique***

Le système immunitaire est un ensemble d'organes, de tissus, de cellules, et de molécules, largement diffusé dans l'ensemble du corps. Contrairement à d'autres systèmes physiologiques statiques, les acteurs du système immunitaire sont constamment en mouvement, que ce soit dans les circulations lymphatiques et sanguines mais aussi dans les tissus. Il apparaît donc pertinent d'observer le système immunitaire comme un réseau complexe dynamique.

Le réseau immunitaire est composé de l'immunité innée, première ligne de défense contre les microbes, et de l'immunité adaptative, hautement spécifique et douée de mémoire. L'immunité innée est de plus en plus reconnue comme un événement initial de la réponse adaptative et non pas comme un élément détaché de celle-ci (1).

Les lymphocytes T proviennent de précurseurs se différenciant dans la moelle osseuse. La migration de ces précurseurs dans le sang et leur « nichage » dans le thymus sont sous le contrôle de nombreuses chimiokines, telle que CXCR4/CXCL12 (2). Une fois arrivés dans le thymus, les prothymocytes subissent de nombreuses étapes de différenciation associant division, prolifération, et mort. Toutes ces étapes sont induites par un dialogue constant entre la cellule et son micro-environnement. Il faut environ deux semaines entre l'entrée d'un prothymocyte dans le thymus et la sortie de sa « progéniture ». Durant ce laps de temps, les thymocytes sont sélectionnés de telle manière que les lymphocytes soient rendus tolérants aux antigènes de l'organisme qui les abrite. Le répertoire des lymphocytes T résulte de la combinaison des gènes variables et constants et de l'ajout aléatoire de nucléotides à la jonction de ces éléments. La diversité de séquences du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR) est faramineuse théoriquement même si le nombre et la distribution de ces séquences est encore basée sur des estimations (3). La diversité du répertoire conditionne la capacité des

lymphocytes à reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentant les fragments protéiques (peptide) du soi ou d'organismes étrangers. La reconnaissance du soi dans le thymus conduit le thymocyte immature soit à se différencier vers les cellules T de la lignée CD4 et CD8, soit à être éliminé directement par apoptose. Les lymphocytes T survivent-ils de façon aléatoire à la sélection thymique ou bien sont-ils l'aboutissement de processus de différenciation hautement programmés ? Ces questions difficiles ont conduit les immunologistes à se scinder en deux « écoles » : une pensait détenir les preuves absolues d'une différenciation aléatoire des lymphocytes T alors que l'autre affirmait, preuves à l'appui, que le destin des lymphocytes T dans le thymus était exclusivement dictée par le microenvironnement. En tout état de cause, les lymphocytes circulants sont les « survivants » d'un processus qui élimine de fait 95% des thymocytes immatures générés. La nécessité d'une telle débauche d'énergie pour générer des lymphocytes T fonctionnels est expliquée par les immunologistes par la génération aléatoire des récepteurs à l'antigène dans le thymus, source d'auto-réactivité dangereuse possible.

Les immunologistes continuent de découvrir et de détailler les mécanismes sophistiqués contrôlant ou tout du moins limitant, l'auto-réactivité des lymphocytes T. L'élimination physique des thymocytes les plus dangereux par induction d'apoptose (sélection négative) en est un. D'autres mécanismes de sélection génèrent des lymphocytes T dits « régulateurs » et ce dès la vie fœtale, comme nous l'avons démontré chez l'homme (4). Cette population de cellules définie par l'expression de marqueurs tels que CD25<sup>1</sup> ou le facteur de transcription foxp3 sont capables de contrôler l'activation dangereuse des lymphocytes T en périphérie. L'origine thymique d'une partie de ces lymphocytes T régulateurs fait penser qu'ils sont chargés de contrôler l'auto-réactivité des lymphocytes ayant échappé au filtre de la sélection thymique. Leur rôle dans de nombreuses situations d'activation du système immunitaire en dehors de toute auto-réactivité et l'acquisition de la fonction régulatrice en périphérie par des lymphocytes « classiques » laissent penser que leur fonction au sein du système immunitaire dépasse le simple contrôle de l'auto-réactivité.

L'importance du filtre de la sélection thymique dans la physiologie normale du système immunitaire peut être illustrée par les faits suivants : une souris ou un humain dépourvu de cellules ou molécules essentielles à la sélection thymique telle que AIRE (5) développe de graves symptômes auto-immuns (6). Le diabète auto-immun est aussi probablement associé à des niveaux d'expression de l'insuline dans le thymus trop faible pour

---

<sup>1</sup> Chaîne alpha du récepteur à l'IL-2

assurer une sélection complète (7, 8). Des résultats similaires associant les niveaux d'expression du récepteur à l'acétylcholine dans le thymus et le développement de la Myasthénie Gravis ont été rapportés (9). Toutes les maladies autoimmunes n'ont pas pour origine un défaut de sélection thymique mais résultent d'interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux. La composante «sélection thymique » est néanmoins encore inconnue pour bon nombre d'entre elles.

Parallèlement à certaines maladies du système immunitaire d'origine génétique, les microbes s'invitent régulièrement à venir perturber l'homéostasie du système. Ces perturbations ont des conséquences plus ou moins importantes pour l'organisme, et ce toujours pour les mêmes raisons génétiques ou environnementales. Même un virus mortel comme le VIH n'échappe pas à la règle puisque certaines personnes sont génétiquement résistantes à l'infection car n'exprimant pas le co-récepteur CCR5 nécessaire avec CD4 à l'entrée du virus. Quoi qu'il en soit, une fois le virus entré se déclenche une cascade d'événements aboutissant à la mort de l'individu infecté. Le modèle actuel de la physiopathologie de l'infection par le VIH est sujet à de nombreux débats, mais peut être résumé comme suit. Les premières étapes de l'infection des cellules T CD4<sup>+</sup> se situe au niveau des muqueuses. Différentes données ont montré qu'à ce niveau se produit une déplétion massive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (10, 11). Cette déplétion pourrait être la cause de l'entrée de fragments microbiens dans la circulation par des mécanismes encore mal connus. Ces fragments microbiens pourraient provoquer l'hyperactivation chronique du système immunitaire chez les patients non-traités (12), cause possible d'une partie de la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (13). Ainsi, le virus pourrait jouer à deux niveaux (directs et indirects) sur le taux de CD4 circulants, d'une part en détruisant directement les cellules qu'il infecte et d'autre part (secondairement ?) en induisant une immunodéficience massive dans les muqueuses, conduisant à la perturbation du système.

La meilleure connaissance de la physiopathologie de l'infection par le VIH sera certainement cruciale pour construire un vaccin efficace. En attendant, et face à la toxicité des traitements et à l'émergence des résistances, il est urgent de penser des stratégies thérapeutiques alternatives aux traitements anti-rétroviraux actuels. Parmi celles-ci, la thérapie génique présente de sérieux arguments (14). En effet, différentes stratégies ont montré l'efficacité de la thérapie génique à prévenir la réplication virale *in vitro*, ce qui a conduit à la mise en place de nombreux essais cliniques (14). Parmi ces stratégies à but cliniques, citons celles visant à prévenir l'infection de cellules CD4<sup>+</sup> générées de novo à partir de précurseurs hématopoïétiques, soit en agissant sur l'expression du co-récepteur

CCR5 par différents moyens (siRNA, Zn-finger nucléases ou intrakines) (15-17), soit en forçant l'expression de gènes médicaments empêchant l'attachement et/ou la fusion du virion avec la membrane plasmique de la cellule (18). La pertinence de CCR5 comme cible thérapeutique est d'autant plus évidente que de récents résultats ont montré une guérison complète <sup>2</sup> de l'infection par le VIH chez un patient ayant reçu une greffe de moelle pour traiter sa leucémie (19). Le praticien a eu la possibilité d'utiliser un donneur histocompatible mais mutant pour CCR5. Plus de 20 mois ans après la greffe, le virus restait indétectable en l'absence de tout traitement antirétroviral. Plus remarquable encore, les lymphocytes T CD4+ rejoignaient des niveaux quasiment normaux. Collectivement, ces résultats montrent que la thérapie génique ciblant l'expression de CCR5 est la piste la plus prometteuse à ce jour.

## ***B. La différenciation des lymphocytes T dans le thymus***

### **1. De la sélection des thymocytes immatures à la régulation du gène CD4**

Le thymus joue un rôle central dans la différenciation du système immunitaire adaptatif. La différenciation des thymocytes immatures en lymphocytes T CD4 et CD8 hautement spécialisés est un problème fondamental de biologie. Il s'agit de comprendre comment est organisée la différenciation de précurseurs pluri-potents en cellules de plus en plus différenciées dans leur fonction. On voit donc que cette problématique rejoint celle de nombreuses autres disciplines. Le micro-environnement est-il le maître du jeu ou bien le hasard joue-t-il aussi un rôle? Quelle est la part du déterminisme génétique? Ce problème a tenu une place centrale dans l'immunologie moderne au cours des années 90 avec des milliers de publications des laboratoires les plus renommés. S'affrontait alors les tenants du modèle purement instructif (les molécules du CMH de classe I ou II conditionnent/instruisent le destin des lymphocytes vers les lignées CD8 et CD4) et les « supporters » du modèle stochastique/sélectif (seules les cellules ayant perdu aléatoirement l'expression du co-récepteur en accord avec la spécificité de leur TCR poursuivent la maturation vers les lignées CD4 ou CD8). Mes travaux de thèse montraient que la perte d'expression des corécepteurs était tout sauf aléatoire. Par différents critères, nous montrions que la séparation des deux lignées s'effectuait à des stades différents de la maturation thymique, suggérant pour la première fois que la différenciation des lymphocytes T dans le thymus était un processus asymétrique (20). Ces résultats, complétés par la démonstration que la population

---

<sup>2</sup> Alors que la réversion de la séropositivité des enfants diagnostiqués à la naissance provient probablement de faux positifs, ce patient est à l'heure d'aujourd'hui, le premier cas avéré de guérison de l'infection par le VIH

CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup> ne contenaient pas les précurseurs des cellules CD8 (21), ont été confirmés par d'autres (22-24). Même si certaines de nos hypothèses se sont révélées fausses par la suite, il n'en reste pas moins que nos résultats démontraient que la séparation des deux lignées suivait un schéma précis non-aléatoire. Compte tenu des difficultés du modèle stochastique/sélectif à expliquer l'existence de cette population CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> contenant les précurseurs des cellules matures CD4 et CD8, le modèle a été peu à peu abandonné<sup>3</sup>.

Le modèle instructif est aujourd'hui renforcé avec la proposition d'un nouveau modèle intégrant les données de cinétique et d'intensité dans la transduction du signal (25). Dans ce modèle, les cellules présentant une faible affinité pour les molécules de classe I sont directement dirigées vers la lignée CD8 sans passer par la population intermédiaire CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup>. Pour celles présentant des affinités plus élevées pour les molécules de classe I et II, la perte de CD8 conduit les cellules vers cette population intermédiaire. Là, en l'absence de signal fort médié par les molécules de classe I, les cellules choisiraient la lignée CD4 en poursuivant la perte d'expression de CD8. En somme, tout se résumerait aux mécanismes moléculaires contrôlant l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 et de leur sensibilité à l'intensité du signal reçu par le TCR.

On sait aujourd'hui, grâce à une lignée de souris « naturellement » déficientes dans la génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (souris HD<sup>4</sup>), que le facteur de transcription ThPOK joue un rôle majeur dans la différenciation des lymphocytes T CD4 (25). En accord avec le modèle instructif/cinétique, il y a de forts arguments expérimentaux soulignant la sensibilité de ThPOK à la transduction du signal par le TCR. ThPOK pourrait agir sur une séquence particulière du gène CD4, le répresseur, chargée d'empêcher la transcription du gène dans les cellules non-CD4. Dans les cellules exprimant CD4, ThPOK est fixé au début du répresseur et pourrait agir comme un répresseur-du-répresseur. De même, il a été montré que ThPOK réprimerait les aussi les gènes impliqués dans la différenciation des cellules CD8. Ainsi, de nombreux travaux ont identifiés les protéines Runx1 et Runx3 comme essentielles à la régulation du gène CD4 et Runx et ThPOK interagissent. Une première étape dans le thymus impliquerait la répression de l'expression du gène CD4 par Runx3 alors qu'une régulation épigénétique indépendante de Runx3 serait impliquée dans les cellules CD8<sup>+</sup> les plus matures (26). La meilleure preuve d'une régulation épigénétique était apportée par l'expérience suivante : l'ablation génétique du répresseur du gène CD4 dans les cellules CD8<sup>+</sup> matures in

---

<sup>3</sup> Il existe d'autres arguments en la défaveur du modèle stochastique mais l'intérêt de les présenter en détail ici est limité

<sup>4</sup> Helper-Deficient

vitro ne conduisait pas à la réexpression de CD4 au contraire de ce qui se passait dans le thymus (27).

Notre laboratoire a été pionnier dans l'utilisation des séquences régulatrices du gène CD4 pour diriger l'expression d'un transgène dans les seules cellules CD4 (28, 29). Mon projet à mon retour des Etats-Unis était d'intégrer cette propriété dans des vecteurs de transfert de gènes lentiviraux (dérivés du VIH) pour développer une stratégie de thérapie génique de l'infection par le VIH. A cette fin, différentes combinaisons génétiques de séquences régulatrices préalablement validées pour leur spécificité (30) furent intégrés dans des vecteurs de transfert de gènes rétroviraux et leur spécificité validée (31). Puis, j'ai construit et validé *in vivo* les vecteurs génétiques spécifiques des lymphocytes T totaux ou des seules cellules CD4<sup>+</sup> (32). Cette dernière spécificité était assurée par l'inclusion du répresseur du gène CD4 humain dans les séquences régulatrices du vecteur. Nous montrions alors que le répresseur contenu dans le vecteur lentiviral était parfaitement fonctionnel dans les cellules CD8 matures (32), un résultat montrant que la machinerie moléculaire nécessaire à la répression du gène CD4<sup>5</sup> était présents et fonctionnels dans les cellules CD8<sup>+</sup> matures humaines (ce résultat jette à mes yeux quelques doutes sur l'hypothèse du « tout épigénétique »).

La régulation du gène CD4 pourrait être différente chez l'homme et chez la souris, comme les résultats suivants le suggèrent. Nous voulions établir si la spécificité envers les lymphocytes T totaux des vecteurs lentiviraux que nous avons construit et validé chez la souris pouvait aussi être observée chez l'homme. Par différents critères, nous avons montré que la réponse était clairement non. La spécificité des séquences régulatrices du gène CD4 n'était pas suffisante pour abroger l'expression du transgène dans les lymphocytes B humains (33). Ce résultat était surprenant car aucune expression significative n'avait été décelé dans les lymphocytes B murins avec les mêmes séquences. Seules des différences dans la régulation du gène CD4 entre les deux espèces pouvaient expliquer ces résultats. Cela constituait un revers sérieux dans notre projet de thérapie génique d'un déficit immunitaire restreint aux lymphocytes T (34). Il était en effet particulièrement désagréable de constater que ce que nous démontrions chez la souris n'était pas vérifié chez l'homme et de fait rendait irréaliste l'utilisation des séquences régulatrices du gène CD4 en l'état pour diriger l'expression d'un transgène thérapeutique dans les seuls lymphocytes T chez l'homme. Les avantages certains de la correction *in vivo* d'un déficit génétique ont depuis motivé une autre

---

<sup>5</sup> Constitué de nombreux facteurs en sus des protéines Runx

équipe du laboratoire à rechercher une meilleure combinaison génétique plus apte à atteindre la spécificité requise pour l'application.

## **2. De l'induction de la tolérance immunitaire à la plasticité des lymphocytes T régulateurs**

Parallèlement aux événements de différenciation des thymocytes immatures vers les lignées CD4 ou CD8 se déroulent les étapes cruciales au maintien d'un système immunitaire tolérant aux constituants de l'organisme. Une grande partie des antigènes présent en périphérie sont exprimés dans le thymus par une sous-population spécialisée de cellules, les cellules épithéliales thymiques (35). Ces cellules sont tenues pour responsable de l'élimination des clones les plus autoréactifs et de la sélection des lymphocytes T régulateurs (36). Là aussi, le débat entre les tenants d'un modèle instructif ou stochastique visant à expliquer la génération thymique des lymphocytes T régulateurs a été ouvert <sup>6</sup>. Il avait été initialement montré que l'expression d'un antigène dans le thymus entraînait une sélection accrue de lymphocytes T régulateurs (37, 38), résultats en faveur d'un modèle instructif. Au contraire, dans d'autres modèles de souris transgéniques, les lymphocytes T régulateurs étaient présents en quantité constante après expression de quantités croissantes d'antigène montrant qu'ils résistaient à la sélection négative, ce qui donnait une fausse impression de sélection positive (39).

Face à ces résultats discordants, nous avons cherché à établir un modèle moins biaisé ne dépendant ni de l'affinité du TCR pour le peptide, ni de modèles doubles voire triples transgéniques. Nous avons montré que l'injection d'un vecteur lentiviral exprimant l'hémagglutinine du virus de la grippe (HA) dans le thymus de souris transgénique pour un TCR spécifique de HA conduisait bien à la sélection négative des thymocytes spécifiques (40). Ce protocole permettait d'initier l'expression de l'antigène cognitif dans le thymus à façon, sans la nécessité d'un modèle de souris transgéniques inductibles, complexe à mettre en œuvre et dont les résultats peuvent être questionnés. Plus intéressante était l'observation de l'augmentation du nombre absolu de lymphocytes T régulateurs spécifiques de HA dans le thymus de souris traitées par le même protocole (41), démontrant sans équivoque que l'expression de l'antigène dans le thymus est bien capable d'instruire la génération de novo de lymphocytes T régulateurs. Il n'en reste pas moins que ces résultats étaient obtenus dans un modèle de souris transgénique. Qu'en est-il de la réalité physiologique ? Nos travaux initiaux

---

<sup>6</sup> Quoique dans une moindre mesure que celui concernant les lignées CD4 ou CD8



montraient que la sélection négative des cellules réactives à un superantigène endogène s'accompagnait de la sélection concomitante de cellules spécifiques exprimant CD25 (42, 43), un processus en tout point analogue à la sélection des lymphocytes T régulateurs dans une souris transgénique exprimant l'antigène cognitif dans le thymus. Nous avons récemment repris ce modèle et nos résultats indiquent clairement que ces cellules CD25<sup>+</sup> spécifiques du superantigène sont également foxp3<sup>+</sup> et donc possèdent probablement une fonction régulatrice (44). Nous démontrons donc dans deux modèles différents que l'expression de l'antigène est suffisante pour induire la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques dans le thymus, résultats fortement en faveur d'un modèle où l'avidité de la réaction TCR-CMH de classe II induit <sup>7</sup> le thymocyte à exprimer foxp3.

Nos résultats indiquent que les cellules « régulatrices » sélectionnées par les superantigènes représentent la majeure partie des lymphocytes T foxp3<sup>+</sup> dans les premiers jours qui suivent la naissance (44). Leur proportion décroît par la suite. Il a été récemment démontré que la taille limitée de la niche des lymphocytes T régulateurs dans le thymus limite le nombre ces cellules qui peut être généré (45, 46). Les superantigènes endogènes, exprimés tot durant l'ontogénie, et ayant un fort potentiel de stimulation pourraient contribuer à former des lymphocytes T régulateurs initialement puis la sélection négative aidant, les autres spécificités dirigées contre les autoantigènes « rempliraient » progressivement la niche laissée vacante par la disparition progressive des lymphocytes T régulateurs spécifiques des superantigènes<sup>8</sup>. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que l'expression des autoantigènes dans le thymus murin s'accroît durant les premiers jours de vie (47). Savoir quel impact cette cinétique pourrait avoir sur la formation du répertoire des lymphocytes T régulateurs est une question ouverte.

Dans notre étude, nous montrions que l'expression forcée de la préproinsuline chez la souris NOD spontanément diabétique pouvait infléchir le développement de la glycémie (41). Ainsi, l'expression d'un antigène dans le thymus par les vecteurs lentiviraux était capable de moduler la tolérance à cet antigène. Ce constat nous a amené à examiner quel pourrait être l'impact fonctionnel de l'expression forcée de l'antigène dans le thymus sur une réponse immune déclenchée en périphérie. Moduler la tolérance immunitaire en influant directement sur la sélection thymique pourrait avoir des applications en autoimmunité mais aussi pour prévenir une réponse immune contre le transgène thérapeutique en thérapie génique. Pour

---

<sup>7</sup> Instruit ?

<sup>8</sup> Cette vacance pourrait résulter d'une remontée de la délétion des thymocytes spécifiques plus tôt dans la différenciation CD4/CD8 dans les premiers jours après la naissance

cela, nous avons d'abord démontré que le vecteur lentiviral exprimant HA déclenchait une forte réponse immunitaire après injection sous-cutanée. Cette réponse est visible dans le compartiment CD4, CD8 et conduit à éliminer une tumeur exprimant HA plus rapidement que des souris immunisées avec un vecteur exprimant la GFP (48). Cette excellente immunogénicité des vecteurs lentiviraux avait déjà été noté par d'autres (49, 50). Nos résultats soutiennent l'hypothèse qu'un vecteur lentiviral dérivé du VIH pourrait être un vaccin efficace contre le VIH (51). Nos résultats indiquent aussi que l'injection du vecteur exprimant HA dans le thymus contrôle de façon dose dépendante la réponse CD8 se développant en périphérie après immunisation avec le vecteur exprimant HA (48). La faisabilité clinique de l'injection intrathymique de vecteurs lentiviraux reste néanmoins incertaine.

La génération des lymphocytes T régulateurs dans le thymus étant sous la dépendance de l'antigène, le signal délivré par le TCR est crucial dans ce processus et de nombreuses publications montrent que la disruption du signal médié par le TCR impact très fortement la génération de lymphocytes T régulateurs dans le thymus. Les cytokines et notamment celles utilisant la chaîne commune  $\gamma c$  (CD132) sont aussi très impliquées. Le récepteur à de nombreuses cytokines (IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21) partagent en effet CD132. Cette molécule est constitutivement couplée à la tyrosine kinase JAK3, responsable de la phosphorylation de STAT5, qui peut se dimériser et atteindre le noyau pour y jouer son rôle de facteur de transcription. La phosphorylation de JAK3 est réalisée par l'appariement de la chaîne  $\beta$  du récepteur (CD122) avec CD132, partagé par l'IL-2 et l'IL-15, qui elle est couplée à JAK1. Ainsi, une cascade d'événements (eux-mêmes auto-régulés) conduisent de la fixation de l'IL-2 ou de l'IL-15 au récepteur CD122/CD132 à la phosphorylation de STAT5. L'IL-2 joue un rôle crucial dans l'homéostasie périphérique des lymphocytes T régulateurs, les souris en étant dépourvues succombant rapidement, probablement par atteintes auto-immunes d'organes vitaux (52). Ce n'est pas le cas des souris déficientes en IL-15, suggérant que l'IL-2 compense parfaitement le manque d'IL-15. Par contre, les souris déficientes en CD122 miment la situation des souris IL-2-KO et succombent rapidement d'auto immunité (53). Dans les deux cas, les lymphocytes T régulateurs sont absents en périphérie mais présents dans le thymus (54-56). Le rôle de STAT5 dans l'initiation de l'expression de foxp3 a été montré en croisant des souris CD122-KO avec des souris exprimant une forme de CD122 activant uniquement STAT5 (57). Dans ces souris, on restaure la génération de lymphocytes T régulateurs et la maladie est abolie. Des sites de fixation de STAT5 dans les séquences régulatrices du gène foxp3 ont été décrits chez la souris (58). Il a été montré que les souris

double-déficientes en IL-2 et en IL-15 présentent aussi une absence de cellules foxp3+ dans le thymus, expliquant par là même pourquoi les souris déficientes soit en IL-2, soit en CD25 ne présentaient pas de défaut particulier dans la génération de cellules foxp3+ dans le thymus (54, 55). L'IL-15 pourrait compenser l'absence de l'IL-2 pour la génération thymique mais pas pour le maintien périphérique des cellules foxp3+. Est-ce parce que les cellules foxp3+ générées avec de l'IL-15 ne sont pas régulatrices (59) que les souris déficientes en IL-2 tombent malades? Ou bien est-ce parce que les cellules foxp3+ ne survivent pas à l'absence d'IL-2 ? Ou bien autre chose ?

Pour réexaminer ces questions, nous avons quantifié les thymocytes exprimant simultanément foxp3 et la forme phosphorylée (activée) de STAT5 (pSTAT5). Grâce à un protocole optimisé, nous avons montré que pSTAT5 est associée à l'expression de foxp3 dans le thymus de souris non manipulées (44). Le signal disparaît rapidement si on ne fixe pas les cellules dans les 30 mn. qui suivent le sacrifice, indiquant que pSTAT5 détecté ex vivo indique un événement d'activation survenu quelques minutes avant le sacrifice de la souris. De façon à déterminer quel pouvait être le rôle de cette phosphorylation basale de STAT5 dans les cellules foxp3+, nous avons ciblé l'activité de JAK3 grâce à des inhibiteurs pharmacologiques. Après un traitement d'une heure, on observe une perte de l'expression de foxp3 et de son ARNm dans des cellules T régulatrices matures en présence d'IL-2 (60). Ainsi, nous suggérons la nécessité d'un signal constant à travers le récepteur à l'IL-2 pour maintenir l'expression de foxp3 dans le thymus et la fonction régulatrice en périphérie. Ces résultats pourraient expliquer la perte spontanée de foxp3 dans une proportion importante de lymphocytes T régulateurs dans des conditions normales, perte conduisant à la génération de cellules pathogéniques (61). La question se pose alors de savoir si dans les souris dépourvues d'IL-2, ce ne serait pas la conversion de lymphocytes T foxp3+ sélectionnés dans le thymus sur des antigènes du soi qui conduirait à la pathologie auto immune plutôt qu'un défaut de lymphocytes T régulateurs per se. La vision d'une lignée fixe de lymphocytes T régulateurs foxp3+ doit être remplacée par une vision plus plastique, où l'immunorégulation pourrait apparaître et disparaître au gré de l'environnement pro- ou anti-inflammatoire. Cette notion avait été abordée dans une nos publications montrant le lien étroit entre activation des cellules effectrices et activation des lymphocytes T régulateurs, plaçant l'environnement inflammatoire au cœur de l'immunorégulation (62). Cette vision est d'autant plus pertinente que la démonstration du passage de cellules foxp3 à des cellules auxiliaires folliculaires dans les plaques de Peyer a été récemment rapportée (63). Clairement, STAT5 joue un rôle prépondérant dans le maintien de foxp3 et déchiffrer les mécanismes moléculaires régulant ce

gène crucial de l'immunité pourrait apporter de nouvelles pistes pour des traitements de certaines affections.

### ***C. De l'immuno-physiopathologie de l'infection par le VIH à la thérapie génique***

Bien que la problématique de la différenciation thymique soit fascinante, j'ai à la fin de ma thèse ressenti le besoin d'explorer d'autres champs de l'Immunologie, et particulièrement la réponse immune en action contre le virus VIH.

#### **1. Une nouvelle population de cellules infectées par le VIH *in vivo***

Un des premiers événements suivant l'entrée du virus dans une cellule T CD4<sup>+</sup> est la perte d'expression de la molécule CD4 à la surface (64). Cette perte prévient la surinfection de la cellule et procure un environnement plus propice à la réplication virale (65). Dans ce contexte, j'entrepris d'étudier dans un premier temps *in vitro* les événements affectant la cellule infectée dans laquelle se réplique activement le virus et ce afin de discriminer les effets directs des effets indirects de l'infection sur la mort cellulaire. Pour cela, j'exploitai un nouvel outil mis au point par le laboratoire du Dr N. Landau<sup>9</sup>, à savoir un virus VIH répliquatif exprimant une petite molécule murine détectable facilement en cytométrie de flux<sup>10</sup> (66). Grâce à cet outil, nous observions (i) qu'un nombre important de cellules infectées ne produisait pas d'ARNm viraux ni de particules infectieuses et (ii) que l'apoptose était détectable uniquement dans les cellules où était observé la réplication virale. De plus, nous montrions des modifications d'expression de molécules de surface importantes, telles que CD54 (ICAM-1), CD62L ou CCR5 lui-même (66). Nous montrions que *nef* n'était pas nécessaire à la perte d'expression de CD4, contredisant le dogme prévalent de l'époque (67). Des cellules T CD4<sup>-</sup> infectées par le virus apparaissaient clairement dans notre culture, confirmant que la réplication virale était bien associée à la perte d'expression de CD4. Qu'en était-il *in vivo* chez les patients ? Curieusement, alors que des centaines de publications se concentraient sur les mécanismes moléculaires de cette perte d'expression de CD4 (induites par la coopération entre *nef*, *vpr* et *env*), les preuves que ce phénomène se déroulait *in vivo* manquaient. Nous avons alors entrepris l'étude systématique des sous-populations lymphocytaires T qui pourraient porter le virus chez les patients. L'hypothèse était que si le virus induisait la perte d'expression de CD4 à la surface des lymphocytes T infectés, alors

---

<sup>9</sup> A l'époque à l'Aaron Diamond Foundation

<sup>10</sup> Ce virus était néanmoins dépourvue de la protéine virale *nef*

nous devons retrouver du virus dans les cellules T n'exprimant ni CD4 ni CD8. Nous avons montré que 80% des donneurs VIH+ de notre étude avait du virus dans le compartiment des cellules T double négatives (DN) n'exprimant ni CD4 ni CD8 (68). Le virus se répliquait dans cette population, comme attesté par la présence d'ARN viraux et leur capacité à produire du virus infectieux in vitro (68). D'autres études ont depuis repris et confirmé ces résultats chez le singe et chez l'homme (69-71). Récemment, il a été montré que la population DN produit 10 fois plus de virus comparé aux lymphocytes T CD4+ quiescents ou activés (71). La plupart des études sur les réservoirs viraux se concentrent sur les populations cellulaires infectées maintenant l'expression de CD4, qui selon nos résultats et d'autres (71) contiennent essentiellement du virus non-répliatif. Quel pourrait être l'impact de cette découverte sur notre compréhension de l'immunopathologie de l'infection ? J'ai proposé dans un modèle théorique que la perte d'expression de CD4 à la surface des cellules infectées spécifiques du virus pourrait empêcher le contact optimal entre le TCR et les molécules du CMH de classe II, infléchissant ainsi l'activation des cellules T spécifiques du virus (72). Bien qu'aucune preuve expérimentale ne soit venue étayer ce modèle, l'infection préférentielle des cellules spécifiques du virus a elle été démontré (73). L'impact exact des cellules DN infectées par le VIH sur la physio-pathologie de l'infection reste à établir. Une partie de mon projet se propose de réévaluer cette question dans un modèle animal de l'infection par le VIH.

## **2. Développement d'un modèle animal de l'infection par le VIH chez la souris humanisée**

C'est à l'occasion de la problématique de différences inter-espèces dans la spécificité des vecteurs lentiviraux que mon intérêt pour les modèles animaux de l'hématopoïèse humaine fût éveillé. En effet, en 2004 paru un article présentant les mérites d'un nouveau modèle de souris humanisées par injection de cellules souches du cordon ombilical <sup>11</sup> (74). Pour la première fois, il devenait possible assez simplement de générer des lymphocytes T humains à longue durée de vie dans une souris sans que celle-ci ne succombe sous l'attaque de ceux-ci. L'intérêt de ce modèle pour mes projets était double ; d'une part, il allait permettre d'évaluer la spécificité des vecteurs lentiviraux dans un contexte de cellules humaines et d'autre part, il constituait une nouvelle possibilité pour développer un modèle de l'infection par le VIH chez la souris. Aussi, lorsque les souris NOD.SCID.gc<sup>null</sup> (NSG) apparurent au

---

<sup>11</sup> Un modèle similaire existait en fait dans les souris NOD.SCID.gc<sup>-/-</sup> depuis plusieurs années mais leur description n'avait pas eu le même retentissement que l'article de Science (Ito, et al. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100:3175-3182.)

catalogue du Jackson Laboratory, nous commandâmes un couple de souris pour lancer nos propres expérimentations. Avant de poursuivre, il fallait que nous puissions qualifier le modèle comme immunologiquement pertinent. Ceci fut fait entre 2006 et 2009, date de parution de l'article présentant nos travaux chez la souris NSG (75). Brièvement, nous montrions que les lymphocytes T humains générés dans les souris NSG possédaient une diversité élargie de leur répertoire (75). Cette diversité pouvait être mise au service d'une réponse immune fonctionnelle contre des antigènes du virus de l'hépatite C (VHC). Par contre, aucune trace d'une réponse anticorps anti-VHC n'était détectable dans le sérum des souris humanisées immunisées. Ainsi nous montrions qu'en l'état, le modèle pouvait être intéressant pour étudier la réponse immune anti-VIH (au moins sa composante cellulaire). Une deuxième publication analysant en détail la composition du répertoire immunitaire humain est actuellement soumise pour publication (76). Les résultats de l'étude montre que la distribution de plus de 40% des réarrangements V-J est conservée entre homme et souris humanisées. Ces résultats suggèrent donc une influence prépondérante du déterminisme génétique dans la représentation des réarrangements V-J des TCR chez l'homme.

Connaissant la valeur du modèle pour générer des lymphocytes T CD4+ humains et dans l'optique du développement de la thérapie génique anti-VIH, nous avons voulu savoir si la spécificité de nos vecteurs observée chez le rongeur pouvait être transposable à l'homme. Pour cela, nous avons donc transduit des cellules souches hématopoïétiques humaines de sang de cordon avec les vecteurs lentiviraux spécifiques et déterminé leur profil d'expression dans différentes populations cellulaires après reconstitution de souris NSG. Nos résultats indiquent que les séquences régulatrices du gène CD4 incluant le répresseur confèrent une excellente spécificité d'expression aux seuls lymphocytes T CD4+ (résultats non publiés).

En collaboration avec S. Garcia à l'Institut Pasteur et avec A.G Marcelin à La Pitié Salpêtrière, nous avons cherché à établir les paramètres immunologiques et virologiques de l'infection par un VIH utilisant CCR5 comme co-récepteur (le même tropisme que celui des virions sexuellement transmis chez l'homme) dans ce modèle. Il avait déjà été rapporté dans la littérature que les souris humanisées étaient susceptibles à l'infection par le VIH utilisant CXCR4 comme co-récepteur (77) mais nous avons décrit une cinétique totalement différente de celles rapportées jusqu'à présent. Les souris ont été suivies plus de 150 jours après infection et la virémie, la fréquence des lymphocytes T CD4+ humains, la diversité virale et la réponse anticorps ont été mesurées. Nous observons un pic de virémie en phase primaire accompagné d'une réduction de la fréquence des cellules CD4+ dans le sang. En accord avec nos résultats et notre hypothèse, nous observons aussi que la proportion de cellules DN

corrèle mieux avec la charge virale que celle des lymphocytes T CD4+, suggérant que la population DN produit bien la majorité des particules infectieuses.

L'ensemble de ces résultats ouvrent la possibilité d'utiliser le modèle des souris humanisées pour mieux comprendre la physiopathologie de l'infection et surtout pour juger de l'efficacité d'une thérapie génique anti-VIH à prévenir la perte des cellules CD4+ et à diminuer la charge virale des animaux traités. Une question majeure reste la pertinence physiologique du modèle des souris humanisées infectées par le VIH. La question est recevable, tout comme celle de la pertinence du modèle de l'infection de lymphocytes de singe avec le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ou de virus chimères entre le VIH et le SIV. Au vu des résultats encourageants glanés chez le singe mais décevant une fois appliqués à l'homme, la question de la validité d'un modèle de souris hébergeant des lymphocytes T humains infectés avec le VIH est prégnante.

## ***D. Projet de recherche***

Dans la continuité de nos travaux précédents, notre projet de recherche comprend un volet fondamental étudiant les mécanismes cellulaires et moléculaires de la tolérance immunitaire et un volet plus appliqué avec (i) le développement de la thérapie génique de l'infection par le VIH et (ii) la modulation pharmacologique de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs chez l'homme.

### **1. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la tolérance immunitaire**

Après avoir montré que STAT5 était un régulateur essentiel de l'expression de foxp3, nous chercherons maintenant à déterminer l'impact de telle ou telle voie de signalisation sur la sélection négative et la génération des lymphocytes T foxp3+ dans le thymus des souris. De façon à accroître la pertinence physiologique de nos résultats par rapport à un modèle de souris transgénique monoclonale, nous étudierons la sélection de lymphocytes T régulateurs spécifiques d'un superantigène exprimé naturellement par certaines souches de souris depuis des millions d'années. Ce modèle des superantigènes a servi à établir l'importance de la sélection négative dans le thymus (78), ainsi que la génération de lymphocytes T régulateurs même si ceux-ci n'étaient pas encore bien définis phénotypiquement à l'époque (42, 79). On sait aujourd'hui que ces lymphocytes CD25+ sélectionnés dans le thymus par leur rencontre avec un superantigène exprime aussi foxp3 (nos résultats et (80)). Les signaux associés à la génération de lymphocytes T régulateurs dans ce modèle n'ont en revanche jamais été décrits.

Nous chercherons à mettre en évidence des signaux spécifiques dans les cellules T exprimant un TCR Vb6, soit sélectionnés négativement, soit sélectionnés en lymphocytes T régulateurs. Nous utiliserons la cytométrie de flux pour quantifier le signal reçu par le thymocyte au cours de son développement dans différentes sous-populations. Toujours pour des raisons de pertinence physiologique, nous chercherons à détecter les signaux directement *ex vivo*, comme nous l'avons déjà fait pour les signaux CD122/STAT5. Nous nous concentrerons sur les molécules les plus importantes telles que Nur77, Bim ou PD-1, les seules constamment retrouvées à travers les différents modèles de sélection négative dans le thymus (81). L'hypothèse est que l'expression de l'une de ces molécules pourrait discriminer entre un thymocyte engagé vers la mort plutôt que vers la lignée régulatrice. Le signal reçu par le TCR sera quantifié en mesurant les phosphorylations de CD3z, ZAP-70, Lck, LAT, et SLP-76, molécules initiales dans la voie d'activation par le TCR. Le rôle des signaux transmis par les MAPK (ERK, p38 ou JNK) dans la sélection négative ou l'engagement vers la lignée régulatrice sera recherchée toujours en cytométrie de flux, la seule technologie capable de nous renseigner sur l'état d'activation de cette voie de signalisation fondamentale dans la différenciation ou la prolifération cellulaire au sein de populations complexes. Si les signaux étaient trop faibles ou fugaces pour être directement détectés *ex vivo*, un protocole d'activation de quelques minutes à quelques heures *in vitro* sera utilisé pour amplifier les signaux reçus *in vivo* et faciliter ainsi leur détection *ex vivo*. Cette partie du projet a pour but de mieux comprendre les événements biochimiques menant à l'expression de foxp3 ou à la mort cellulaire, mais a surtout pour but de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

De façon à généraliser nos résultats, une autre partie du projet cherchera à établir un profil global d'expression de phosphoprotéines dans les cellules exprimant foxp3 dans le thymus et en périphérie. Nous utiliserons le modèle des souris foxp3-GFP (82) pour trier et cultiver les cellules exprimant la GFP<sup>12</sup>. Ce profil sera établi grâce à l'utilisation de « puces » à anticorps capables de quantifier simultanément la forme totale et phosphorylée d'une centaine de molécules impliquées dans différentes voies de signalisation intra-cellulaire. La comparaison de ce profil avec celui obtenu avec des cellules foxp3<sup>+</sup> de la périphérie et avec des cellules foxp3<sup>-</sup> devrait permettre de déduire une voie de signalisation définissant la voie d'activation de fox3 par les cellules immatures. Outre l'intérêt fondamental d'une telle description (actuellement de nombreuses questions et controverses existent quant à la voie

---

<sup>12</sup> Dans ces souris transgéniques, toutes les foxp3<sup>+</sup> sont GFP<sup>+</sup> mais toutes les GFP<sup>+</sup> ne sont pas forcément foxp3



d'activation responsable de l'acquisition de foxp3), nous entrevoyons des applications pratiques. Telle ou telle voie d'activation restreinte à l'expression de foxp3 pourrait représenter de nouvelles cibles pharmacologiques pour l'immunothérapie. On pourrait soit renforcer cette voie, soit l'inhiber et ce en fonction de la pathologie à traiter par adjonction médicamenteuses de telle ou telle molécule modulant les voies de signalisation affectant l'homéostasie ou la fonction des cellules T régulatrices.

## **2. Stratégies thérapeutiques translationnelles**

### **a) Thérapie génique de l'infection par le VIH**

#### **(1) Rationnel**

Il a été estimé que dans le sang des patients infectés, plus de 95% de l'ADN viral se trouve dans les lymphocytes T CD4+ comparé aux monocytes (71). D'autre part, des études ont montré que les lymphocytes T CD4+ sont responsables en grande partie de la charge virale plasmatique. On peut donc émettre l'hypothèse que diminuer la charge virale cellulaire dans les lymphocytes T CD4+ devrait avoir un effet majeur sur la charge virale. Le but de notre approche de thérapie génique anti-VIH n'est pas de « stériliser » l'individu de son infection mais de prévenir l'infection *de novo* de lymphocytes T CD4+ afin de préserver un compartiment de cellules fonctionnelles. La construction des vecteurs lentiviraux spécifiques des lymphocytes T CD4+ avait pour but de faire exprimer un gène anti-VIH spécifiquement dans les cellules cibles de l'infection. L'idée était qu'en utilisant cette spécificité, l'effet thérapeutique sera maximisé tout en diminuant de possibles effets secondaires liés à l'expression ectopique du transgène. Notre hypothèse de travail postule que les lymphocytes T CD4+ exprimant les gènes thérapeutiques auront un avantage sélectif par rapport aux autres lymphocytes, comme il l'a déjà été démontré avec le gène dominant-négatif RevM10 (83) et comme nous l'avons montré avec notre combinaison de gènes dans une lignée *in vitro*. L'avantage sélectif des lymphocytes T CD4+ transduits devrait permettre aux cellules « protégées » de persister et ainsi d'augmenter la fréquence des cellules capables de réagir efficacement contre le virus. Une meilleure réponse immune anti-virale pourrait alors permettre d'enclencher un cercle vertueux aboutissant à un contrôle à long-terme de la réplication virale par des lymphocytes « résistants » à l'infection. Cette stratégie devrait permettre un contrôle de la charge virale en l'absence d'anti-rétroviraux.

Le choix d'un gène thérapeutique anti-VIH doit prendre en compte les risques de résistances associés, les risques de recombinaisons génétiques entre le vecteur et le virus, et

enfin tenir compte de l'immunogénicité de ce gène. Notre stratégie repose sur l'utilisation de gènes thérapeutiques apportant une résistance à l'infection la plus précoce et la plus complète possible. En effet, il est beaucoup plus difficile pour le virus de développer des résistances contre des molécules bloquant les étapes précoces de l'infection (avant l'intégration du génome du virus dans la cellule-hôte) que contre des molécules ciblant les protéines virales synthétisées suite à la réplication. Nous utiliserons dans un vecteur lentiviral à expression spécifique des lymphocytes T CD4+, un gène thérapeutique développé par l'équipe du Dr van Laer (Georg-Speyer-Haus, Francfort) et basé sur l'inhibition de la fusion entre gp41 et la membrane plasmique, le peptide T20 membranaire. Le peptide T20 est déjà utilisé en clinique sous sa forme soluble, en complément des autres traitements. En effet, il est l'un des rares composés à agir en amont de l'infection puisqu'il prévient la fusion entre le virion et la membrane plasmique de la cellule en se fixant à la gp41 du virus. De nombreuses variantes du T20 membranaire ont été synthétisées et parmi celles-ci le peptide C46 a fait la preuve de sa capacité à inhiber de nombreux isolats de virus différents (18). Les perspectives ouvertes par le peptide inhibiteur de fusion dérivé de la gp41 sont intéressantes, mais restent néanmoins théoriquement limitées par la possible survenue de variants viraux classiques moins sensibles à l'interaction avec T20. Plus récemment, il a été montré qu'un faible niveau de CCR5 membranaire potentialise non seulement l'effet protecteur de T20 (84), mais également celui des ligands de CCR5 (85). Nous postulons donc que des lymphocytes CD4+ T20+ CCR5<sup>low</sup> pourraient être particulièrement résistants à l'infection par le VIH, le virus ne pouvant « répondre » que par la sélection de doubles mutations, à la fois accroissant l'affinité de l'enveloppe pour CCR5 (pour compenser un faible niveau d'expression) et diminuant la liaison à T20. Il faut également souligner qu'un changement de tropisme (R5→X4) ne représente pas le mode d'échappement principal aux molécules ciblant CCR5 (86). La diminution du niveau d'expression de CCR5 ne devrait donc pas non plus favoriser l'apparition *in vivo* de souches X4 hautement pathogènes.

L'équipe de Guy Gorochov utilise depuis de nombreuses années la technique de «Phage-display» pour la sélection et l'évolution moléculaire de protéines humaines (17, 87, 88). L'équipe a récemment décrit des mutants de la chimiokine RANTES (CCL5) présentant un effet anti-VIH-1 fortement potentialisé (17, 88). Il a été montré que certains mutants de RANTES hyper-agonistes pour CCR5 exercent leur effet antiviral en induisant une modulation prolongée de ce récepteur, beaucoup plus importante que celui obtenu avec la chimiokine sauvage (17, 88). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par d'autres (85, 86, 89) par transfection à des cellules de la chimiokine sauvage modifiée pour être retenue au

niveau du réticulum endoplasmique (RANTES-KDEL). De telles cellules voyaient leur niveau de CCR5 membranaire réduit par le transgène (par rétention intra-cellulaire de CCR5 par son « intrakine ») et donc leur sensibilité au VIH réduite. Nous postulons que cet effet sera fortement potentialisé en utilisant sous cette forme intrakine les mutants de forte affinité pour CCR5 que nous avons décrits.

## ***(2) Physiopathologie de l'infection par le VIH chez la souris humanisée***

Nos résultats préliminaires indiquent que l'infection aigüe par le VIH chez la souris humanisée conduit à un pic transitoire de virémie. Cette virémie initiale est supposée être contrôlée par les lymphocytes T CD8+ (90), les meilleures preuves étant apporté par la démonstration que la déplétion des lymphocytes T CD8+ entraîne une augmentation simultanée de la charge virale chez le singe (91) et par un modèle mathématique chez l'homme (92). Pour l'instant nous n'avons pas d'évidence que les lymphocytes T CD8+ contrôle la virémie chez la souris humanisée infectée. Aussi, un groupe de souris humanisées sera infectée par le VIH et sacrifié 20 jours après. La production d'IFN-g sera mesurée in vitro par ELISPOT après restimulation des lymphocytes humains par du virus VIH inactivé. La méthode d'inactivation n'est pas encore définie car nos résultats préliminaires avec du virus inactivé par l'aldrithiol-2 ont montré un fort bruit de fond dans la production d'IFN-g de sujets sains (résultats non publiés). Les cellules humaines seront triés sur la base de CD45 avant le test de façon à normaliser le nombre de cellules par test et d'augmenter le seuil de détection de la réponse, comme nous l'avons précédemment montré (75). Les souris non-infectées serviront de contrôle négatif alors que des lymphocytes de sang de patient infectés serviront de contrôle positif. Dans une autre série d'expériences, l'effet de la déplétion des lymphocytes T CD8 par un anticorps injecté in vivo sur la charge virale sera mesurée. Il est attendu que si les lymphocytes T CD8 jouent un rôle important dans la résolution de la virémie durant la phase primaire de l'infection, la production d'IFN-g soit clairement visible et que la déplétion des lymphocytes CD8 soit accompagnée d'une augmentation de la charge virale. Ces résultats permettront soit de confirmer, soit d'infirmer le modèle actuel. Dans le premier cas, l'intérêt du modèle des souris humanisées s'en trouverait renforcé pour des études vaccinales. Dans le second cas, ce serait plutôt le nombre de cibles qui conditionnerait la réplication virale dans la phase primaire de l'infection, comme cela a été proposé par des modèles mathématiques (93).

Pendant cette phase primaire de l'infection, nous chercherons à établir si la population infectée par le VIH est détectable dans le modèle. Pour cela, des marquages en cytométrie de flux utilisant un anticorps contre la capsid virale permettra de quantifier et de phénotyper les cellules infectées *in vivo*. Une proportion enrichie en cellules DN est attendue dans les cellules infectées par le VIH comparée aux cellules non-infectées. De plus, les charges virales cellulaires en ARN et en ADN dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou DN seront mesurées par PCR quantitative de façon à confirmer que la population DN contient bien la majorité des cellules produisant des virions infectieux. Ces résultats ouvriraient de nouvelles perspectives thérapeutiques et confirmeraient que le centre d'intérêt des études sur la physiopathologie de l'infection devrait être la population produisant les virions infectieux, à savoir les lymphocytes DN.

### ***(3) Essai pré-clinique chez la souris humanisée***

Les souris immunodéficientes NSG greffées avec des cellules souches hématopoïétiques humaines développent une majorité de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (75). Nos résultats préliminaires montrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont déplétés après infection avec un VIH utilisant CCR5 comme co-récepteur. Ces souris constituent donc un modèle idéal pour juger de la thérapie génique de l'infection par le VIH après transfert de gènes dans les cellules souches. Nous prévoyons un effort particulier pour optimiser le transfert de gènes dans les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon utilisées pour humaniser les souris. Notamment, nous utiliserons la retronectine comme substrat pour les transductions, celle-ci pouvant jouer un rôle avec certains vecteurs. Nous testerons aussi différents rapports entre nombre de particules virales et nombre de cellules cibles, celui-ci dépendant aussi de la nature du vecteur utilisé. Ces optimisations *in vitro* seront réalisées avec notre propre source de cellules progénitrices collectées à la maternité de l'hôpital.

Après reconstitution avec les cellules CD34<sup>+</sup> transduites par les vecteurs lentiviraux dans des conditions optimales, les différents groupes de souris seront infectés avec le VIH Bal (10 ng de p24 par souris) par voie intraveineuse dans notre animalerie A3. L'impact de notre traitement sur l'infection par le VIH sera évalué en mesurant la déléition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi que la charge et la diversité virale. Selon notre hypothèse, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant les gènes thérapeutiques devraient rapidement émerger suite à la réplication virale et à la sélection de lymphocytes résistants. Une matrice de marquage pour la cytométrie de flux sera donc réalisée sur les prélèvements, pour détecter l'expression de CD45, CD3, CD19, CD4, CD8 ainsi que de T20 et P2. Nous mettrons un accent particulier sur le suivi de

la fréquence des lymphocytes T CD4+ et DN en fonction du temps. Ces données nous renseigneront sur la capacité de notre stratégie à inhiber la réplication virale dans la phase primaire et/ou à sélectionner des lymphocytes T résistants durant la phase chronique de l'infection. Les charges virales dans le sérum seront mesurées par PCR quantitative en temps réel ciblant le gène de l'intégrase par une équipe partenaire sur le projet. Un effet notable sur la charge virale plasmatique ou cellulaire serait la preuve de l'intérêt de notre stratégie pour bloquer l'entrée du virus durant la phase primaire de l'infection. Néanmoins, et comme expliqué plus haut, une forte proportion de cellules T CD4+ devra exprimer les gènes thérapeutiques pour observer un effet sur la charge virale plasmatique durant cette phase. La pression de sélection exercée par le traitement sur le virus pourrait faire apparaître des variants résistants durant la phase chronique. De façon à évaluer cette possibilité, la boucle V3 et la gp41 du VIH isolés des souris aux différents stades de l'infection seront séquencées. On pourra ainsi établir des arbres phylogénétiques à partir des séquences obtenues pour comparer la diversité virale (quasi-espèce) générée chez la souris humanisée et chez l'homme.

La démonstration d'un effet anti-viral marqué de notre stratégie chez la souris humanisée serait la première pierre posée vers un essai clinique. Le protocole pourrait consister en la collecte de cellules souches sanguines mobilisées par le G-CSF chez un patient infecté, d'amplifier cette population tout en la modifiant génétiquement à l'aide des vecteurs lentiviraux et de la réinjecter chez le patient. Un effet maximal de la thérapie serait obtenu si la reconstitution des lymphocytes T à partir des cellules transduites était rapide. La lymphopénie du patient favorisera la reconstitution des lymphocytes T, aussi un conditionnement lympho-ablatif pourrait être requis pour augmenter les chances de succès de la thérapie. D'autres progrès dans l'expansion, la transduction et la cinétique de génération des lymphocytes T à partir de ces précurseurs transduits seront aussi des facteurs importants pour le futur de la thérapie génique.

## **b) Modulation pharmacologique de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs humains**

### ***(1) Sensibilité des lymphocytes T foxp3+ à des inhibiteurs de JAK3/STAT5***

Nos résultats suggèrent que le signal médié par la voie CD122/JAK3/STAT5 est requis pour maintenir l'expression de foxp3 chez la souris. Qu'en est-il chez l'homme ? Bien que les inhibiteurs de JAK3 soient proposés comme immunosuppresseur (94), nous montrons chez la souris que cette classe d'inhibiteur a un effet marqué sur l'expression de foxp3. On

peut donc imaginer que l'utilisation contrôlée de ces inhibiteurs puisse servir à moduler la fonction suppressive du système immunitaire chez l'homme. Les doses à utiliser pour atteindre l'expression de foxp3 sans affecter la fonction effectrice des autres lymphocytes T pourraient être différentes. La phosphorylation basale de STAT5 détectée ex vivo chez la souris témoigne en effet d'un événement d'activation survenu quelques minutes auparavant in vivo, la phosphorylation de toute protéine dans son environnement étant un événement fugace. Cette activation basale pourrait provenir d'une dose extrêmement limitée d'IL-2 ou d'IL-15, puisque des doses faibles de ces cytokines suffisent à initier le signal uniquement dans les cellules foxp3+. Ceci laisse penser qu'une dose faible d'inhibiteurs pourrait avoir un impact sur l'expression de foxp3 sans affecter la réponse effectrice. La recherche de telles doses sera difficile chez l'homme : seul un essai clinique contrôlé apportera la réponse. Notons toutefois que les données de la littérature indiquent une déplétion de 38% des cellules CD4+CD25+<sup>13</sup> chez des patients traités par un inhibiteur de JAK3, indiquant qu'à la dose utilisée, l'inhibiteur a bien un effet sur l'homéostasie des cellules régulatrices (95).

Avant d'utiliser la pharmacologie pour moduler l'activité suppressive des cellules T foxp3+ humaines, les observations faites chez la souris devront être reproduites dans les lymphocytes T régulateurs humains. Pour étudier la sensibilité des cellules foxp3+ à l'inhibition du signal JAK3, les lymphocytes T régulateurs humains seront purifiés sur la base de l'expression de CD25 et de CD45RA, la meilleure combinaison actuellement disponible pour définir et différencier les lymphocytes T régulateurs foxp3+ quiescents ou activés (96). Ces cellules purifiées seront soumises pendant différents laps de temps à l'action de différents inhibiteurs de JAK3/STAT5 à différentes doses. La viabilité des lymphocytes traités sera mesurée in vitro par un nouveau test compatible avec le marquage pour la molécule foxp3. On recherchera une condition permettant d'observer la perte de foxp3 tout en gardant une viabilité à long terme. La capacité suppressive des lymphocytes traités sera mesurée in vitro dans un test d'inhibition de prolifération de lymphocytes T autologues stimulés par des billes portant des anticorps anti-CD3/anti-CD28, collectés au moment du tri des lymphocytes T régulateurs. Les résultats nous permettront de proposer une nouvelle application des inhibiteurs de JAK3 pour diminuer l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs. Notre hypothèse sera évaluée dans un modèle où la diminution de l'activité suppressive favoriserait la réponse anti-tumorale chez l'homme.

## ***(2) Immunothérapie du cancer colo-rectal par déplétion pharmacologique des lymphocytes T régulateurs***

---

<sup>13</sup> Incluant des lymphocytes foxp3+

### (a) Rationnel

Le rôle adverse des lymphocytes T régulateurs sur la réponse immunitaire anti-tumorale a été bien documenté chez la souris (97) et est suspectée chez l'homme (98). Si la démonstration de la sensibilité des cellules foxp3<sup>+</sup> humaines à l'action des inhibiteurs de JAK3 est faite, alors on pourrait proposer cette classe d'inhibiteur pour traiter des patients souffrant de cancer afin de « débrider » la réponse anti-tumorale effectrice. L'administration directe de l'inhibiteur in vivo aura néanmoins des effets distincts et opposés: (i) des effets positifs en diminuant l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs (et peut être aussi agir directement sur la tumeur, un grand nombre d'entre elles exprimant pSTAT5), (ii) ou des effets négatifs en affectant la réponse anti-tumorale (même si une dose affectant préférentiellement les cellules foxp3<sup>+</sup> est déterminé in vitro, un effet sur la réponse effectrice ne pourra jamais être totalement écarté). Alternativement à l'administration directe des inhibiteurs in vivo, le traitement de lymphocytes T ex vivo avant leur réinjection chez le patient est une piste d'immunothérapie possible. En effet, il a été montré au laboratoire et ailleurs que la déplétion des lymphocytes T régulateurs permettait une meilleure réponse allogénique (99) mais aussi une meilleure efficacité anti-tumorale des cellules T effectrices (100). Basé sur ces résultats, notre laboratoire a initié deux essais cliniques utilisant la déplétion ex vivo de lymphocytes T régulateurs pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anti-tumorale par transfert de lymphocytes T. Un essai concerne le traitement des rechutes leucémiques multiples par infusion de lymphocytes T allogéniques dépourvus d'activité régulatrice. Le second vise à traiter les métastases hépatiques suite à un cancer colo-rectal (CRC) après déplétion des lymphocytes T régulateurs du greffon de lymphocytes T autologues injectés chez le patient. La déplétion des lymphocytes T régulateurs dans ces essais est réalisée par tri magnétique des cellules CD25<sup>-</sup>. Plusieurs inconvénients sont associés à cette stratégie: (i) les cellules CD25<sup>+</sup> incluent des cellules effectrices, les déléter joue donc en défaveur de l'objectif recherché, (ii) les cellules CD25<sup>+</sup> n'incluent pas la totalité des cellules foxp3<sup>+</sup>, ce qui a deux conséquences grévant la lecture de l'efficacité du protocole: une est que les cellules fonctionnellement régulatrices ne sont pas totalement délétes du greffon, et l'autre est que ces cellules foxp3<sup>+</sup> « contaminantes » vont très rapidement générer une population CD25<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> régulatrice in vivo. Pour pallier à ces inconvénients, nous proposons une nouvelle stratégie d'immunothérapie qui utiliserait non pas une déplétion physique mais une déplétion pharmacologique des lymphocytes T foxp3<sup>+</sup> du greffon.

Le cas de figure idéal serait que le traitement pharmacologique entraîne une perte permanente de l'expression de foxp3 dans des cellules qui maintiendrait leur viabilité une fois injectées in vivo. De part leur réactivité contre les antigènes du soi plus importante que les lymphocytes T totaux <sup>14</sup>, on peut imaginer que les lymphocytes T régulateurs « convertis » puisse se diriger efficacement vers une réponse contre la tumeur, celle-ci exprimant nombre d'antigènes du soi <sup>15</sup>.

Chez un patient lymphopénique (après traitement par irradiation ou chimiothérapie), une réponse autoimmune pourrait se déclencher suite à l'immunothérapie par transfert de lymphocytes T autologues déplétés en lymphocytes T régulateurs. Le déclenchement d'une autoimmunité serait plutôt un « bon » signe, témoignant en effet d'une activité effectrice dirigé contre les cibles exprimant les antigènes du soi. L'espoir est que la tumeur fasse partie de ces cibles. Des résultats encourageants en ce sens utilisant des lymphocytes spécifiques ont été rapportés pour le mélanome métastatique (101). Le contrôle pharmacologique de l'autoimmunité tout en préservant l'effet antitumoral est un enjeur majeur de tout traitement d'immunothérapie utilisant les lymphocytes T régulateurs. Seul l'essai clinique permettra d'apprécier la balance bénéfice/risque dans des situations médicales où de tels protocoles seraient justifiés. Néanmoins, et toujours dans l'optique d'augmenter les chances de succès d'un essai clinique long et coûteux, un modèle animal serait fort utile. Les collaborations existantes entre le service de chirurgie digestive et notre centre d'investigations cliniques tant au niveau recherche qu'essai clinique nous incite à proposer de développer un modèle de réponse immune contre le cancer colorectal CRC humain chez la souris NSG.

#### **(b) Du modèle animal du CRC à l'immunothérapie**

La souris NSG, comparé aux souris NOD/SCID « simple » est plus apte (de plusieurs ordres de magnitude) à héberger différents types de tumeurs primaires humaines, telle que des tumeurs du poumon (102), des mélanomes primaires (103) ou métastatiques (104), ou des leucémies lymphoïdes ou myéloïdes (105, 106). A priori, les cellules tumorales de CRC devraient aussi donner de meilleurs résultats dans ce fond génétique que dans la souris NOD/SCID déjà utilisée pour isoler la cellule souche tumorale CD133+ (107, 108). Récemment, il a été montré que les tumeurs primaires pouvaient être rejetées une fois implantées dans des souris NSG après transfert de cellules T matures éduquées ex vivo à reconnaître les antigènes tumoraux (109, 110). Notre projet est de démontrer que les

---

<sup>14</sup> Rappelons que les lymphocytes T foxp3+ sont sélectionnés sur la base de la reconnaissance d'antigènes du soi dans le thymus

<sup>15</sup> En sus des antigènes tumoraux



lymphocytes T régulateurs préviennent le rejet de la tumeur dans un modèle de la réponse immune anti-tumorale chez la souris NSG. Les résections tumorales seront obtenues auprès des services compétents de l'Hôpital. Le tri des cellules souches tumorales CD133+ sera réalisé dans notre laboratoire grâce à un trieur de cellules. Nous chercherons dans un premier temps à déterminer si les caractéristiques histologiques observées chez le patient (pour lequel ces données sont systématiquement collectées) sont retrouvés dans le modèle animal. Un lot homogène de souris NSG sera greffée avec une suspension cellulaire de cellules CD133+ en sous-cutané. Préalablement à la greffe, les cellules seront transduites avec un vecteur lentiviral exprimant la luciférase, une procédure ne prenant que quelques heures et hautement efficace. La croissance tumorale sera mesurée par bioluminescence *in vivo* après injection de luciférine et la morphologie des tumeurs caractérisée par analyse histologique selon les protocoles classiques de coloration anatomo-pathologique. Cette partie du projet cherche à établir les meilleures conditions de greffe de cellules tumorales primaires chez la souris NSG non manipulée.

Nous grefferons ensuite des tumeurs CRC primaires HLA-A2+ dans des souris NSG HLA-A2 transgéniques reconstitués à la naissance avec des progéniteurs hématopoïétiques HLA-A2+ de foie fœtaux, de façon à déterminer l'immunocompétence anti-tumorale du système immunitaire humain à l'état basal chez la souris. D'après les données de la littérature, celle-ci devrait être plutôt faible. Nous chercherons alors à savoir si la diminution *in vivo* de l'activité régulatrice des cellules foxp3+ ne pourrait pas favoriser cette réponse. Pour cela nous traiterons les animaux, soit avec un anticorps bloquant CD25, soit avec des inhibiteurs de JAK3/STAT5 déterminés comme efficace à éliminer les cellules foxp3+ *in vitro*. Les résultats attendus permettraient pour la première fois d'obtenir un modèle animal simple de la réponse immune anti-tumorale contrôlée par les lymphocytes T régulateurs humains. Si la tumeur n'était pas rejetée malgré les traitements "anti-Treg", nous chercherions alors à pourvoir le système immunitaire avec un antigène modèle exprimé dans la tumeur. Une fois les tumeurs implantées, on vaccinera les animaux avec l'antigène modèle, soit sous forme soluble, soit sous forme de vecteurs viraux, soit sous forme de peptides pulsés sur des cellules dendritiques humaines HLA-A2+. La vaccination devrait enclencher le rejet de la tumeur. Dans ces conditions, on cherchera à établir le rôle des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de ce rejet en examinant la cinétique de la croissance tumorale en présence des différents traitements "anti-Treg" mentionnés plus haut. Un rejet plus rapide pourrait être observé si les lymphocytes T régulateurs jouaient un rôle adverse dans le rejet de la tumeur. Les arguments expérimentaux en faveur d'un rejet direct de la tumeur seront recherchés en

déterminant la fréquence, le nombre et le phénotype des lymphocytes T infiltrant la tumeur. On cherchera particulièrement à quantifier la fraction de lymphocytes T exprimant foxp3 au sein et en périphérie de la tumeur. L'évolution de la masse tumorale sera mesurée par bioluminescence *in vivo*.

Une limitation au modèle de thérapie cellulaire du cancer chez la souris NSG vient en effet de la réaction du greffon-contre-l'hôte (GVH) qui se développe lorsqu'on injecte des lymphocytes T humains dans ces souris immunodéficientes (111). Dans ces conditions, le rejet de la tumeur pourrait provenir de mécanismes indirects, tels que l'activation massive des LyT activés par la GVH (e.g sécrétion de TNF, possiblement anti-tumoral). Les résultats de la littérature nous indiquent toutefois qu'il est possible de dissocier la mort induite par la GVH de celle induite par la croissance tumorale dans ce même modèle de souris NSG (112). Notre projet vise à développer un modèle animal de l'immunothérapie anti-tumorale indépendant de l'effet GVH, en éliminant les expérimentations de transfert de lymphocytes T matures chez des souris portant des tumeurs établies. Nos résultats devraient favoriser l'utilisation de nouvelles molécules pharmacologiques pour moduler l'activité régulatrice *in vivo* durant la réponse immune anti-tumorale.

## **E. Conclusions**

La curiosité scientifique a toujours motivé mon parcours et mes projets de recherche, ceux que j'ai rejoint comme ceux que j'ai initié. Aujourd'hui, la recherche fondamentale implique des investissements humains et financiers considérables. La transition d'une recherche plus « individualiste » à une recherche d'équipe ou de plate-forme s'accompagne d'une modification des responsabilités incombant au chercheur. Les différentes strates « d'évaluation » (recrutement, progression, financements, résultats, publications) font qu'une incertitude croissante sur sa place dans la compétition internationale et dans la société le questionne en permanence. Ma démarche en vue de défendre mon Habilitation à Diriger les Recherches fait partie d'une réponse à ce questionnement. Ce diplôme me permettra de mieux m'insérer dans la vie collective de nos institutions pour y insuffler mes idées et transmettre celle des autres.

## **F. Références**

1. Iwasaki A & Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963):291-295.

2. Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, & Petrie HT (2003) Critical Role for CXCR4 Signaling in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus *J Immunol* 171(9):4521-4527.
3. Nikolich-Zugich J, Slifka MK, & Messaoudi I (2004) The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4(2):123-132.
4. Darrasse-Jeze G, *et al.* (2005) Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood* 105(12):4715-4721.
5. Nagamine K, *et al.* (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17(4):393-398.
6. Anderson MS, *et al.* (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298(5597):1395-1401.
7. Pugliese A, *et al.* (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 15(3):293-297.
8. Vafiadis P, *et al.* (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDD2 locus. *Nat Genet* 15(3):289-292.
9. Giraud M, *et al.* (2007) An IRF8-binding promoter variant and AIRE control CHR1A1 promiscuous expression in thymus. *Nature* 448(7156):934-937.
10. Brenchley JM, *et al.* (2004) CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* 200(6):749-759.
11. Mehandru S, *et al.* (2004) Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* 200(6):761-770.
12. Brenchley JM, *et al.* (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12(12):1365-1371.
13. Sedaghat AR, *et al.* (2008) Chronic CD4+ T-Cell Activation and Depletion in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Type I Interferon-Mediated Disruption of T-Cell Dynamics. *J. Virol.* 82(4):1870-1883.
14. Rossi JJ, June CH, & Kohn DB (2007) Genetic therapies against HIV. *Nat Biotech* 25(12):1444-1454.
15. Perez EE, *et al.* (2008) Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26(7):808-816.
16. Qin XF, An DS, Chen IS, & Baltimore D (2003) Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):183-188.
17. Hartley O, *et al.* (2003) Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J Virol* 77(12):6637-6644.
18. Egelhofer M, *et al.* (2004) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry in Cells Expressing gp41-Derived Peptides. *J. Virol.* 78(2):568-575.
19. Hutter G, *et al.* (2009) Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 360(7):692-698.
20. Marodon G & Rocha B (1994) Generation of mature T cells in the thymus: CD4 or CD8 down-regulation occurs at different stages of thymocyte development. *Eur. J. Immunol* 24(1):196-204.
21. Lucas B, Marodon G, & Penit C (1995) CD4<sup>lo</sup>TcR<sup>int</sup> thymocyte subset do not belong to the CD8 lineage pathway. *J.Immunol.* 156:1743-1747.
22. Lucas B & Germain RN (1996) Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* 5(5):461-477.

23. Suzuki H, Punt JA, Granger LG, & Singer A (1995) Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* 2(4):413-425.
24. Lundberg K, *et al.* (1995) Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4-8+TCRhi thymocytes. *J Exp Med* 181(5):1643-1651.
25. He X, Park K, & Kappes DJ (2010) The Role of ThPOK in Control of CD4/CD8 Lineage Commitment. *Annual Review of Immunology* 28(1):295-320.
26. Taniuchi I, *et al.* (2002) Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111(5):621-633.
27. Zou YR, *et al.* (2001) Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage. *Nat Genet* 29(3):332-336.
28. Salmon P, Giovane A, Wasylyk B, & Klatzmann D (1993) Characterization of the human CD4 gene promoter: transcription from the CD4 gene core promoter is tissue-specific and is activated by Ets proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16):7739-7743.
29. Salmon P, *et al.* (1996) Characterization of an intronless CD4 minigene expressed in mature CD4 and CD8 T cells, but not expressed in immature thymocytes. *J Immunol* 156(5):1873-1879.
30. Zhao-Emonet JC, Boyer O, Cohen JL, & Klatzmann D (1998) Deletional and mutational analyses of the human CD4 gene promoter: characterization of a minimal tissue-specific promoter. *Biochim Biophys Acta* 1442(2-3):109-119.
31. Zhao-Emonet JC, *et al.* (2000) T-cell specific expression from Mo-MLV retroviral vectors containing a CD4 mini-promoter/enhancer. *J. Gene Med.* 2:416-425.
32. Marodon G, *et al.* (2003) Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 101(9):3416-3423.
33. Mouly E, *et al.* (2007) CD4 regulation in human lymphoid non-T-cells: A role for the silencer element. *Mol Immunol* 44(4):267-275.
34. Adjali O, *et al.* (2005) In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer. *J Clin Invest* 115(8):2287-2295.
35. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, & Klein L (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2(11):1032-1039.
36. Hinterberger M, *et al.* (2010) Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4+ T cell tolerance. *Nat Immunol* 11(6):512-519.
37. Jordan MS, *et al.* (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2(4):301-306.
38. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, & von Boehmer H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3(8):756-763.
39. van Santen H-M, Benoist C, & Mathis D (2004) Number of T Reg Cells That Differentiate Does Not Increase upon Encounter of Agonist Ligand on Thymic Epithelial Cells. *J. Exp. Med.* 200(10):1221-1230.
40. Marodon G & Klatzmann D (2004) In situ transduction of stromal cells and thymocytes upon intrathymic injection of lentiviral vector. *BMC Immunol.* 5(1):18-24.
41. Marodon G, *et al.* (2006) Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* 108(9):2972-2978.
42. Marodon G & Rocha B (1994) Activation and "deletion" of self-reactive mature and immature T cells during ontogeny of Mls-1a mice: implications for neonatal tolerance induction. *Int. Immunol.* 6(12):1899-1904.

43. Chies\* JA, *et al.* (1995) Persistence of V beta 6+ T cells in Mls-1a mice. A role for the third complementarity-determining region (CDR3) of the T cell receptor beta chain in superantigen recognition. *J Immunol* 155(9):4171-4178 \*equal contributions.
44. Goldstein J, Balderas RS, & Marodon G (2011) Continuous activation of the CD122/STAT-5 signaling pathway during selection of antigen-specific regulatory T cells in the murine thymus. *PLoS ONE* In press.
45. Leung MW, Shen S, & Lafaille JJ (2009) TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3+ cells is limited to small clonal sizes. *J Exp Med* 206(10):2121-2130.
46. Bautista JL, *et al.* (2009) Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat Immunol* 10(6):610-617.
47. Gäbler J, Arnold J, & Kyewski B (2007) Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 37(12):3363-3372.
48. Faideau B, *et al.* (2011) Intrathymic injection of lentiviral vector curtails the peripheral immune response in BALB/c mice. *En préparation.*
49. Esslinger C, *et al.* (2003) In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J Clin Invest* 111(11):1673-1681.
50. Rowe HM, *et al.* (2006) Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. *Mol Ther* 13(2):310-319.
51. Dai BB, *et al.* (2009) HIV-1 Gag-specific immunity induced by a lentivector-based vaccine directed to dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20382-20387.
52. Sadlack B, *et al.* (1993) Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75(2):253-261.
53. Suzuki H, *et al.* (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268(5216):1472-1476.
54. D'Cruz LM & Klein L (2005) Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6(11):1152-1159.
55. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, & Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6(11):1142-1151.
56. Soper DM, Kasproicz DJ, & Ziegler SF (2007) IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* 37(7):1817-1826.
57. Burchill MA, *et al.* (2007) IL-2 Receptor beta-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 178(1):280-290.
58. Zorn E, *et al.* (2006) IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108(5):1571-1579.
59. Imamichi H, Sereti I, & Lane HC (2008) IL-15 acts as a potent inducer of CD4(+)CD25(hi) cells expressing FOXP3. *Eur J Immunol* 38(6):1621-1630.
60. Goldstein J, Taleb K, Mercey L, & Marodon G (2009) Plasticity of nTreg lineage commitment: loss of foxp3 expression upon CD122 signaling inhibition. *Eur J Immunol* 39 (S1):S420.
61. Zhou X, *et al.* (2009) Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10(9):1000-1007.
62. Billiard F, *et al.* (2006) Regulatory and effector T-cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol* 177 (4):2167-2174 \*equal contributions.
63. Tsuji M, *et al.* (2009) Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323(5920):1488-1492.

64. Salmon P, *et al.* (1988) Loss of CD4 membrane expression and CD4 mRNA during acute human immunodeficiency virus replication. *J Exp Med* 168(6):1953-1969.
65. Piguet V, Schwartz O, Le Gall S, & Trono D (1999) The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* 168:51-63.
66. Marodon G, Landau NR, & Posnett DN (1999) Altered expression of CD4, CD54, CD62L, and CCR5 in primary lymphocytes productively infected with the human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(2):161-171.
67. Aiken C, *et al.* (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76:853-864.
68. Marodon G, Warren D, Filomio MC, & Posnett DN (1999) Productive infection of double negative T cells with HIV in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11958-11963.
69. Huete JMB, *et al.* (2001) Detection of viral RNA in CD4(-) CD8(-) and CD4(-) CD8(-) lymphocytes in vivo in rhesus monkeys infected with simian immunodeficiency virus of macaques. *Aids Res. Hum. Retrovir.* 17(4):349-360.
70. Cheney KM, *et al.* (2006) HIV type 1 persistence in CD4(-)/CD8(-) double negative T cells from patients on antiretroviral therapy. *Aids Res. Hum. Retrovir.* 22(1):66-75.
71. Kaiser P, *et al.* (2007) Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Peripheral Blood Predominantly Takes Place in CD4/CD8 Double-Negative T Lymphocytes. *J. Virol.* 81(18):9693-9706.
72. Marodon G (2001) CD4 down modulation on T-cells: an 'immune' checkpoint for HIV. *Immunol Lett* 79(3):165-168.
73. Douek DC, *et al.* (2002) HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417(6884):95-98.
74. Traggiai E, *et al.* (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104 - 107.
75. Marodon G, *et al.* (2009) High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.*gc*<sup>-/-</sup> mice. *Eur J Immunol* 39(8):2136-2145.
76. Pham HP, *et al.* (2011) Extensive overlap of the T cell repertoire combinatorial diversity in humans and humanized mice. *Submitted.*
77. Watanabe S, *et al.* (2007) Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R $\{\gamma\}$ null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109(1):212-218.
78. Kappler JW, Staerz U, White J, & Marrack P (1988) Self-tolerance eliminates T cells specific for MIs-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 332:35.
79. Papiernik M, *et al.* (1998) Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10(4):371-378.
80. Cabrera G, *et al.* (2008) Early increases in superantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells during mouse mammary tumor virus infection. *J Virol* 82(15):7422-7431.
81. Baldwin TA & Hogquist KA (2007) Transcriptional Analysis of Clonal Deletion In Vivo. *J Immunol* 179(2):837-844.
82. Wang Y, *et al.* (2008) Th2 lymphoproliferative disorder of Lat(Y136F) mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3(+) regulatory T cells. *Journal of Immunology* 180(3):1565-1575.
83. Ranga U, *et al.* (1998) Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1201-1206.

84. Heredia A, *et al.* (2007) CCR5 density levels on primary CD4 T cells impact the replication and Enfuvirtide susceptibility of R5 HIV-1. *Aids* 21(10):1317-1322.
85. Schroers R, Davis CM, Wagner HJ, & Chen SY (2002) Lentiviral transduction of human T-lymphocytes with a RANTES intrakine inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection. *Gene Ther* 9(13):889-897.
86. Yang AG, *et al.* (1997) Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21):11567-11572.
87. Dorgham K, *et al.* (2008) Engineered CCR5 superagonist chemokine as adjuvant in anti-tumor DNA vaccination. *Vaccine* 26(26):3252-3260.
88. Gaertner H, *et al.* (2008) Highly potent, fully recombinant anti-HIV chemokines: reengineering a low-cost microbicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46):17706-17711.
89. Bai X, *et al.* (1998) Genetic co-inactivation of macrophage- and T-tropic HIV-1 chemokine coreceptors CCR-5 and CXCR-4 by intrakines. *Gene Ther* 5(7):984-994.
90. McMichael AJ, *et al.* (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10(1):11-23.
91. Schmitz JE, *et al.* (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283(5403):857-860.
92. Goonetilleke N, *et al.* (2009) The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 206(6):1253-1272.
93. Petravic J, Loh L, Kent SJ, & Davenport MP (2008) CD4+ target cell availability determines the dynamics of immune escape and reversion in vivo. *J Virol* 82(8):4091-4101.
94. O'Shea JJ, Pesu M, Borie DC, & Changelian PS (2004) A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat Rev Drug Discov* 3(7):555-564.
95. van Gorp EAFJ, *et al.* (2009) The Effect of the JAK Inhibitor CP-690,550 on Peripheral Immune Parameters in Stable Kidney Allograft Patients. *Transplantation* 87(1):79-86.
96. Miyara M, *et al.* (2009) Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30(6):899-911.
97. Shimizu J, Yamazaki S, & Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10):5211-5218.
98. Mougiakakos D, *et al.* (2010) Regulatory T Cells in Cancer. *Advances in Cancer Research*, eds George FVW & George K (Academic Press), Vol Volume 107, pp 57-117.
99. Cohen JL, *et al.* (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196(3):401-406.
100. Darrasse-Jeze G, *et al.* (2009) Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 119(9):2648-2662.
101. Dudley ME, *et al.* (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298(5594):850-854.
102. Simpson-Abelson MR, *et al.* (2008) Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into NOD-scid IL2Rgamma(null) mice. *J Immunol* 180(10):7009-7018.

103. Quintana E, *et al.* (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456(7222):593-598.
104. Carreno BM, *et al.* (2009) Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases. *Clin Cancer Res* 15(10):3277-3286.
105. Agliano A, *et al.* (2008) Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 123(9):2222-2227.
106. Sanchez PV, *et al.* (2009) A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23(11):2109-2117.
107. Ricci-Vitiani L, *et al.* (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445(7123):111-115.
108. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, & Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445(7123):106-110.
109. Carpenito C, *et al.* (2009) Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3360-3365.
110. Paulos CM, *et al.* (2010) The Inducible Costimulator (ICOS) Is Critical for the Development of Human TH17 Cells. *Science Translational Medicine* 2(55):55ra78.
111. van Rijn RS, *et al.* (2003) A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2<sup>-/-</sup>gammac<sup>-/-</sup> double-mutant mice. *Blood* 102(7):2522-2531.
112. Markley JC & Sadelain M (2010) IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood* 115(17):3508-3519.



## IV. Expérience d'encadrement

Mon expérience d'encadrement a commencé aux Etats Unis durant mon stage post-doctoral. Comme il est d'usage là-bas, les étudiants « under-graduate » passent une partie de leur été en laboratoire afin de choisir leur laboratoire d'accueil pour leur Ph.D. Plusieurs de ces étudiants ont collaboré aux projets que je développai alors. J'ai notamment supervisé le travail de M<sup>r</sup> Irwin pour aboutir à la démonstration que les lymphocytes T CD28- (s'accumulant avec l'âge et corrélés avec certaines pathologies) dérivait des lymphocytes T CD28+ (1).

De retour en France, j'ai encadré M<sup>elle</sup> Blair durant son stage Erasmus en 2001/2002. Avec elle, j'ai mis au point la technologie des vecteurs lentiviraux au laboratoire et obtenus la plupart des résultats obtenus chez la souris. Les résultats de son travail ont été inclus dans un article paru dans *Blood* en 2003 (2). J'ai aussi durant cette période formé de nombreuses assistantes ingénieurs de l'Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Avancées (ESTBA). Cette formation englobait la conception et la réalisation des expérimentations, ainsi que la tenue du cahier de laboratoire. Mon premier financement propre m'a permis de recruter M<sup>elle</sup> Mercey pour le projet Thérapie génique VIH de 2006 à 2010 en tant qu'assistante ingénieure. A l'occasion de ce contrat, M<sup>elle</sup> Mercey a participé à toutes les étapes du projet des souris humanisées, ce qui lui a valu une place d'auteur dans la publication (3). Avec M<sup>elle</sup> Mercey, nous avons aussi pu acquérir des données sur la susceptibilité des souris humanisées à l'infection par le VIH (4), données qui feront l'objet d'une publication une fois quelques points complémentaires acquis par le doctorant maintenant en charge du projet. En effet, M<sup>r</sup> Petit a rejoint l'équipe au début du mois de Mai 2010 pour un stage de 3 mois et a été lauréat d'une allocation doctorale auprès du SIDAction. M<sup>r</sup> Petit a entamé sa thèse à l'automne 2010 et la plupart des résultats exposés dans ce mémoire sur les souris NSG infectées par le VIH proviennent de son travail.

Mr Mouly a collaboré à mes projets de stage post doctoral durant son travail de thèse. Les résultats qu'il a pu acquérir avec les vecteurs lentiviraux spécifiques ont été inclus dans deux publications, une parue dans *Blood* en 2003 (2) et une parue dans *Molecular Immunology* en 2007 (5).

J'ai encadré le travail de M2 de M<sup>elle</sup> Dodille en 2004 sur un autre projet de thérapie génique de l'infection par le VIH non décrit ici. Ce travail est poursuivi par un étudiant en

thèse sous la direction du Pr Klatzmann, et les résultats acquis par M<sup>elle</sup> Dodille devraient être inclus dans une future publication.

Après ma nomination à l'INSERM en 2006, j'ai eu la chance de pouvoir travailler rapidement avec un étudiant inscrit en M2 « Physiologie de la Réponse Immune ». M<sup>r</sup> Goldstein a donc entamé son travail de recherche sous ma supervision début 2007. Il a développé la technologie des marquages Phosflow durant son stage de M2. Son travail de thèse l'a conduit à étudier la régulation du gène *foxp3* par le facteur de transcription STAT5. Une partie de son travail est sous presse (6) alors qu'une autre partie est en cours de finalisation. D'autre part, le travail de Mr Goldstein est inclus dans une publication dans *The Journal of Clinical Investigation* en tant que collaborateur d'une étude dirigé par le Dr B Salomon (7).

Le projet d'induction de tolérance intrathymique après injection de vecteurs lentiviraux de transfert de gènes avait été initié par M<sup>elle</sup> Faideau, alors en stage post-doctoral au laboratoire, suite à notre publication dans *Blood* en 2006 (8). Ce projet a profité ensuite du travail de deux étudiantes en M2, M<sup>elle</sup> Gottrand en 2009 et M<sup>elle</sup> Taleb en 2010. J'ai formé celles-ci à la chirurgie intrathymique, à l'expérimentation en cytométrie de flux, à la culture cellulaire, et à l'analyse des données. L'ensemble des résultats acquis devrait donner lieu à une publication en 2011 (9).

1. Posnett DN, *et al.* (1999) Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+CD28- cytotoxic effector clones. *Int. Immunol.* 11:229-241.
2. Marodon G, *et al.* (2003) Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 101(9):3416-3423.
3. Marodon G, *et al.* (2009) High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.*gc*<sup>-/-</sup> mice. *Eur J Immunol* 39(8):2136-2145.
4. Mercey L, *et al.* (2009) Towards HIV Gene Therapy in Humanized Mice. *Human Gene Therapy* 20(6):668-668.
5. Mouly E, *et al.* (2007) CD4 regulation in human lymphoid non-T-cells: A role for the silencer element. *Mol Immunol* 44(4):267-275.
6. Goldstein J, Balderas RS, & Marodon G (2011) Continuous activation of the CD122/STAT-5 signaling pathway during selection of antigen-specific regulatory T cells in the murine thymus. *PLoS ONE* In press.
7. Grinberg-Bleyer Y, *et al.* (2010) Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* 120(12):4558-4568.
8. Marodon G, *et al.* (2006) Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* 108(9):2972-2978.
9. Faideau B, *et al.* (2011) Intrathymic injection of lentiviral vector curtails the peripheral immune response in BALB/c mice. *En préparation.*

## V. Résumé en français

Le système immunitaire est un réseau d'organes, de cellules et de molécules reliés dynamiquement chargé de surveiller l'intégrité de l'organisme. La meilleure connaissance de son fonctionnement est de nature à amener de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter nombre de maladies telles que le cancer, les maladies auto immunes ou les maladies infectieuses.

Nos travaux sur la tolérance immunitaire ont montré sans équivoque dans deux modèles différents qu'une population spécialisée de lymphocytes T exprimant le facteur de transcription foxp3 était sélectionnée par l'expression de l'antigène cognitif dans le thymus. La redécouverte de cette population de lymphocytes a rejoint les avancées majeures de l'immunologie moderne. Nous avons montré chez la souris que l'expression de foxp3, tenu pour responsable de la fonction suppressive dans le système immunitaire, était instable et très sensible à l'action d'inhibiteurs « coupant » la voie de signalisation initié par l'IL-2. Nous rechercherons d'autres voies de signalisation spécifique aux lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un modèle « naturel » de sélection thymique. Cette étude systémique permettra de définir de nouvelles cibles pour une inhibition pharmacologique ou génétique de foxp3. L'utilisation d'inhibiteur de foxp3 présente un intérêt évident pour l'immunothérapie anti-tumorale où la fonction régulatrice joue contre l'élimination de la tumeur. Nous avons pour projet de transposer nos résultats obtenus chez la souris à l'homme afin de développer une stratégie d'immunothérapie anti-tumorale. Nous prévoyons de développer un modèle du cancer colo-rectal humain chez la souris NOD.SCID.gc-/- afin de pouvoir valider l'idée que la déplétion pharmacologique de lymphocytes T régulateurs avant transfert de lymphocytes T a un vrai impact sur la réponse contre la tumeur autologue.

Nous avons par ailleurs montré que dans ce modèle de souris, le transfert de cellules souches hématopoïétiques humaines conduisait à la génération de lymphocytes T CD4+ susceptibles à l'infection par le VIH. Nous prévoyons dans un second projet d'utiliser ce nouveau modèle animal de l'infection pour tout d'abord questionner la vision actuelle de l'immunopathologie de l'infection en déterminant (i) si la réponse des lymphocytes T CD8+ est bien responsable de la résolution du pic de virémie durant la phase primaire de l'infection par le VIH et (ii) si la population de lymphocytes T double négatifs est bien la population responsable de la production de la majorité des virions infectieux. Dans un second temps, nous prévoyons d'utiliser les souris humanisées pour valider une stratégie de thérapie génique de l'infection par le VIH. La spécificité des vecteurs lentiviraux envers les lymphocytes T CD4, gage de sécurité et d'efficacité maximum, a été validé chez la souris et chez l'homme. Aussi, nous avons construit des vecteurs exprimant une combinaison de gènes thérapeutiques inhibant la fusion du virion avec la membrane de la cellule, soit en entrant en compétition avec la gp41 virale, soit en modulant l'expression de CCR5 à la surface. Le suivi des souris traitées puis infectées sera réalisée en mesurant la charge virale et la fréquence des lymphocytes T CD4+ afin de juger de la qualité de la reconstitution immunitaire après thérapie génique. L'ensemble de ces travaux et projets vise à transposer les résultats de nos travaux de recherche les plus fondamentaux au service du patient.

## VI. Résumé en anglais

The immune system is a network of organs, cells and molecules dynamically linked to monitor the integrity of the body. A better understanding of its operating mode is likely to lead to new therapeutic avenues for treating many diseases such as cancer, autoimmune diseases and infectious diseases.

Our work on immune tolerance has unequivocally shown in two different models that a specialized population of T cells expressing the transcription factor *foxp3* was selected by the expression of the cognitive antigen in the thymus. The rediscovery of this population of cells has joined major advances of modern immunology, its clinical potentials being so numerous. We have shown in mice that the expression of *foxp3*, held responsible for the suppressive function in the immune system, was unstable and very sensitive to an inhibitory action on the signaling pathway initiated by IL- 2. We will look for other specific signalisation pathways in regulatory T cells in mice in a model of « natural » thymic selection. This systemic study will define new targets for pharmacological or genetic inhibitors of *foxp3*. The use of *foxp3* inhibitors is of obvious interest for tumor immunotherapy in which the regulatory function of the immune system acts against the elimination of the tumor. We plan to implement the results obtained in mice to humans to develop an anti-tumor immunotherapy protocol. We first plan to develop a model of human colorectal cancer in immunodeficient NOD.SCID.gc-/- mice in order to validate the idea that depleting regulatory T cells before transfer of T cells has a real impact on the immune response against the autologous tumor.

We have shown that the transfer of human haematopoietic stem cells in this strain of mice led to the generation of CD4 + T cells susceptible to infection by HIV. We plan a second project using this model to first challenge the current view of the immunopathology of infection by determining (i) whether the response of CD8 + T cells is responsible for the resolution of peak viremia during the primary phase of HIV infection and (ii) if the population of double negative T cells is truly responsible for producing the majority of infectious virions. In a second step, we plan to use humanized mice to validate a strategy for gene therapy of HIV infection. The specificity of lentiviral vectors to CD4 T cells has been validated in mice and humans. The specificity of expression to HIV targets is to ensure safety and effectiveness of the procedure. Therefore, we constructed lentiviral vectors expressing a combination of therapeutic genes that inhibit the fusion of the virion with the cell membrane, either by competing with the viral gp41, or by modulating the expression of CCR5 on the surface. The monitoring of treated infected mice will be performed by measuring viral load and the frequency of CD4 + T cells in order to judge the quality of immune reconstitution after gene therapy. All of the works and projects presented here intend to implement the result of basic research to the patient.