

Nom de l'unité de recherche:

UMR978 INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » (SIMHEL)

Nom de la direction de thèse / co-encadrement et ses coordonnées :

Dr Nadine VARIN-BLANK, DR INSERM / Dr Claudine IRLLES, MCF Université Sorbonne Paris Nord UMR978, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY

Email: nadine.varin@inserm.fr; claudineliliane.irlles@univ-paris13.fr

Téléphone : 01 48 38 77 72 ; 01 48 30 88 58

Titre : Caractérisation du trafic et de la fonction des endosomes vésiculaires contenant l'aminopeptidase IRAP dans les lymphocytes B normaux et de Leucémie Lymphoïde Chronique**Sujet de thèse :**

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une maladie caractérisée par une accumulation progressive de lymphocytes B CD5⁺ dysfonctionnels. Les patients présentent une grande hétérogénéité et une évolution clinique très variable, allant de formes indolentes (asymptomatiques) à des formes progressives ou qui ne répondent pas aux thérapies. Le laboratoire s'intéresse aux mécanismes mis en œuvre par les lymphocytes B tumoraux qui leur confèrent une capacité améliorée de survie, dont la signalisation du récepteur du lymphocyte B (BCR), ses co-récepteurs et la reprogrammation du microenvironnement. Les voies de signalisation endosomales dépendantes du BCR dans le contexte de la LLC restent très peu étudiées.

Le projet proposé s'inscrit dans l'étude du trafic endosomal du BCR dans les cellules B tumorales et en particulier, celui des endosomes de recyclage/stockage identifiés par la présence de l'aminopeptidase IRAP (Insulin Regulated Aminopeptidase), une protéine ancrée à la membrane des vésicules intracellulaires et régulant la maturation des endosomes. Les vésicules IRAP⁺ ont été montrées essentielles dans le trafic et la signalisation de plusieurs récepteurs immuns tels que les récepteurs des lymphocytes T (TCR) et des fragments Fc des Immunoglobulines (FcRs), composés de manière similaire au BCR, mais aussi dans la présentation antigénique croisée par les cellules dendritiques. L'absence de IRAP provoque des dérèglements du trafic vésiculaire de ces récepteurs vers la membrane plasmique ou vers les endosomes de recyclage avec pour conséquence une signalisation intracellulaire déficiente. L'expression et le rôle de IRAP dans les lymphocytes B restent complètement inconnus. Etant donné le rôle de la compartimentation spatiale de la signalisation en aval du BCR, le rôle encore non caractérisé de IRAP dans les cellules B et la similarité avec des récepteurs immuns pour lesquels la fonction des vésicules IRAP⁺ a été démontrée, reste à déchiffrer quelle est la fonction de ces endosomes dans les cellules B normales ou leucémiques. **L'objectif de ce projet de thèse consiste donc à caractériser les vésicules endosomales qui contiennent la molécule IRAP, à identifier leur implication dans le trafic et la signalisation du BCR et à comparer leur rôle potentiel dans la présentation antigénique croisée entre des lymphocytes B normaux, leucémiques, ou des lignées de cellules B modèles d'étude de LLC.** Le projet sera mené dans le cadre d'une collaboration avec deux équipes du LabEx INFLAMEX, du Dr. Ulrich Blank et du Dr. Loredana Saveanu (Centre de Recherche sur l'Inflammation, Faculté de Médecine Bichat, INSERM U1149).

1) Nous étudierons si les lymphocytes B mettent en place un mode d'action similaire à celui utilisé par les lymphocytes T où les endosomes IRAP⁺ régulent la localisation basale et la signalisation endosomale

du TCR. Pour cela, nous étudierons le trafic vésiculaire et les voies de signalisation endosomales après activation du BCR par microscopie confocale et imagerie en temps réel (plateforme IMAG'IC, Institut Cochin et Centre de Recherche sur l'Inflammation, Faculté de Médecine Bichat). Nous analyserons dans un premier temps si les vésicules endosomales IRAP+ sont les compartiments où sont localisés le BCR, les co-recepteurs et les autres molécules signalisation (signalosome avec les, kinases et les phosphatases) dans les cellules B normales et leucémiques. Nous caractériserons les vésicules IRAP+ en utilisant des marqueurs spécifiques des différents types d'endosomes (précoces, tardifs, lysosomaux, de stockage, , de fusion lysosomale et pour l'apprêtement/présentation antigénique). Ces analyses seront confirmées par une approche biochimique de co-immunoprécipitation et de fractionnement cellulaire ainsi que par cytométrie en flux. Ces méthodes seront complétées par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité catalytique de IRAP afin de déterminer si son activité aminopeptidase est impliquée dans la distribution cellulaire du signalosome.

2) L'absence de la protéine IRAP dans les lymphocytes T entraîne une déficience de signalisation du TCR, dépendante du compartiment endosomal. Par similitude, nous étudierons la déstabilisation du trafic endosomal et de la translocation vers la membrane plasmique des composants du BCR et des corécepteurs liée à l'invalidation de IRAP dans les cellules B en utilisant les mêmes approches d'imagerie confocale et de biochimie. Pour cela, nous établirons deux méthodes d'invalidation : avec des shRNA par transduction lentivirale et par le système CRISPR-Cas9 afin d'établir des lignées stables IRAP knockdown et knockout. Nous évaluerons alors l'impact de l'invalidation de IRAP sur les voies de signalisation du BCR et la survie des cellules. Nous analyserons également les niveaux d'expression et le profil d'activation des kinases et phosphatases en aval du BCR par des approches de cytométrie en flux multiparamétrique (phosphoflow) et de biochimie (Western Blot) et nous quantifierons les cytokines et chimiokines secrétées.

3) Pour caractériser le dialogue entre le lymphocyte B et le microenvironnement, nous nous intéresserons à la communication avec les lymphocytes T. Une première approche pour déterminer le rôle potentiel des endosomes IRAP+ dans la présentation antigénique sera l'étude de la localisation des molécules du CMH et de protéines telles que VAMP7 (protéine SNARE endolysosomale impliquée dans la présentation antigénique) dans ces compartiments IRAP+, dans les lignées de cellules B, cellules B normales et leucémiques par microscopie confocale. Il a été montré dans les cellules dendritiques que la présentation antigénique croisée a lieu spécifiquement dans les endosomes IRAP+.

L'ensemble de ce projet contribuera à construire un modèle permettant une meilleure compréhension du rôle des plateformes endosomales dans l'activation des cellules B tumorales et en particulier la dynamique de la localisation et du trafic des composants de la signalisation du BCR pour élucider leur implication dans la dysfonction de ces cellules.