

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **17 janvier 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur LAGRANGE Brice**

Titre des travaux : « *Identification des mécanismes induits par l'IFN- γ seul ou combiné à des agents chimiothérapeutiques à l'origine de la mort programmée des cellules tumorales* »

Résumé



J'ai effectué mon doctorat dans le domaine de la cancérologie au sein du centre de recherche international unité Inserm 866 à Dijon. Mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle des microARN (miARN) dans la régulation de la différenciation macrophagique humaine. Nous avons reproduit le processus de différenciation macrophagique *in vitro* à partir de monocytes issus du sang périphérique traités avec du CSF-1 (*Colony stimulating factor-1*). Suite à l'analyse du profil d'expression des miARN au cours du processus de différenciation, mon projet s'est orienté sur l'étude de miR-142-3p dont le taux d'expression diminue le plus fortement au cours de cette différenciation. J'ai montré que miR-142-3p forme une boucle d'auto-régulation négative avec EGR2 (*Early growth response 2*), un facteur de transcription connu pour réguler positivement la différenciation macrophagique. Cette boucle est essentielle au bon déroulement de la différenciation. Par ailleurs, j'ai observé une altération de cette boucle de régulation dans les monocytes de patients atteints d'une leucémie myélomonocytaire chronique suggérant une implication de ce mécanisme dans la leucémogénèse. Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Cell Research* ainsi que d'une revue publiée dans Médecine Sciences. Durant ces années, j'ai également contribué à la publication d'autres études au sein de mon équipe ainsi que la publication d'une étude d'une équipe de la même unité de recherche.

J'ai ensuite intégré le CIRI unité Inserm 1111 au sein du groupe du Dr. Azzak Belaouaj-Bentaher. Au sein de ce groupe, j'ai été responsable de deux projets associant maladie pulmonaire et infection bactérienne. Mon premier projet portait sur l'aggravation des symptômes des malades souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) suite à des infections bactériennes. La BPCO qui est provoquée majoritairement par le tabagisme (80% des cas) est la troisième cause de mortalité dans le monde. Pour ce projet, je me suis intéressé à l'impact du processus inflammatoire et de la surproduction de mucus caractéristique de la maladie, sur le développement de cette pneumopathie. Par des approches à la fois *in vivo* et *in vitro*, j'ai étudié le rôle de la phospholipase cPLA2 α (*cytosolic phospholipase A2 alpha*) dans l'exacerbation de la BPCO suite à une infection par la bactérie *Haemophilus influenzae*. A partir de phospholipides membranaires, cPLA2 α va libérer de l'acide

arachidonique qui est transformé en éicosanoïdes, médiateurs importants de la réponse inflammatoire. Par ces travaux, j'ai confirmé la responsabilité de cPLA2 α dans l'hyperproduction de mucus facteur aggravant de la maladie. Dans un second projet, mes recherches s'orientaient plus particulièrement sur la compréhension de la fonction des polynucléaire neutrophile (PNN) lors d'une infection pulmonaire par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. L'utilisation de cellules primaires murines et humaines m'ont permis de démontrer l'importance des PNN dans la production du médiateur pro-inflammatoire IL(Interleukin)-1 β lors d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa*. Par la suite, des modèles de souris génétiquement modifiées ont été utilisés pour démontrer la responsabilité de l'activation du complexe multiprotéique, inflammasome, dans la production de l'IL-1 β tout en réfutant l'action des sérines protéases originellement connues comme le mécanisme responsable de la maturation de l'IL-1 β dans le PNN. Bien que mes travaux n'aient pas pu aboutir à des publications faute de temps et de financement, j'ai tout de même participé à la publication de travaux préalablement initiés dans ce groupe.

Après ce premier contrat postdoctoral, j'ai rejoint l'équipe du Dr. Thomas Henry (Directeur de Recherche 2, Inserm), au sein également du CIRI U1111. Une des thématiques principales du laboratoire était de comprendre comment le macrophage détecte *Francisella novicida* (*F. novicida*). Cette bactérie proche de *Francisella tularensis*, agent responsable de la maladie tularémie, se réplique dans le cytosol des cellules. L'objectif de l'équipe était d'identifier les mécanismes mis en place pour limiter la croissance bactérienne voire pour tuer ces bactéries intracytosoliques suite au traitement des cellules avec la cytokine IFN(*Interferon*)- γ . Chez la souris, plusieurs études ont mis en évidence le rôle majeur du complexe protéique cytosolique appelé inflammasome AIM2 (*Absent in melanoma 2*) dans la détection de *Francisella* au niveau cytosolique. La reconnaissance de l'ADN bactérien par AIM2 déclenche l'activation de la caspase-1 pro-inflammatoire permettant la maturation et sécrétion des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 ainsi que la mort du macrophage infecté. Lorsque j'ai été recruté, l'équipe était en train de démontré que les protéines GBP (*Guanylate binding protein*) dont l'expression est dépendante de l'IFN- γ , bloquaient la réplication bactérienne et induisaient indirectement l'activation de l'inflammasome AIM2. Ces résultats ont été par la suite publiés dans la revue *Nature Immunology*. Mon travail a été d'identifier si le mécanisme de reconnaissance de *Francisella* au niveau du cytosol était conservé chez le macrophage humain. Ce projet portait à la fois sur l'identification de la composition de l'inflammasome activé par *Francisella* et sur le rôle des protéines GBP pour lesquels rien n'avait encore été décrit chez l'Homme dans la littérature. L'inflammasome correspond à une plateforme moléculaire qui se forme dans la cellule suite à la détection d'un pathogène. La formation de cette plateforme aboutit à la libération de cytokines pro-inflammatoires et à la mort de la cellule infectées par pyroptose. Les cytokines libérées vont avoir un rôle important dans l'orientation de la réponse immunitaire et la pyroptose permet de détruire la niche de réplication du pathogène. Ces mécanismes sont donc essentiels dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Pour initier ce projet, l'extinction transitoire de gènes sélectionnés pour leurs rôles chez la souris a été réalisée dans les macrophages primaires humains. Afin d'effectuer par la suite des études mécanistiques plus poussées, l'un de mes principaux objectifs pour ce projet a été de mettre au point la technologie CRISPR-Cas9. Dans notre cas, le développement de cette technique au sein du laboratoire m'a permis de générer des lignées cancéreuses monocytaires humaines éteintes totalement pour l'expression de certains gènes identifiés lors de l'étude sur les macrophages primaires. J'ai ainsi obtenu des résultats significatifs quant à l'interaction des protéines GBP avec la bactérie. Ces données ont fait l'objet d'une publication très récente. J'ai également démontré que le mécanisme de reconnaissance de *F. novicida* est différent entre l'Homme et la souris. Ces travaux ont également été à l'origine d'une publication. Au cours de ces années,

j'ai aussi contribué à la publication d'études en collaboration avec des équipes en France et à l'étranger ainsi que des publications de l'équipe.

Actuellement, mon activité de recherche s'effectue au sein du pôle 7 Biosciences, Technologies et Éthique de l'UR Confluence Sciences et Humanités (EA1598). Il s'agit d'une unité de recherche pluridisciplinaire qui vise à croiser les approches à la fois anthropologiques, scientifiques et sociales. Le pôle 7, sous la responsabilité du Pr. Philip Lawrence, a pour thématique principale l'étude de la pathogenèse de l'infection chronique à l'hépatite B et des cancers du foie. Dans ce contexte, en accord avec mes expériences professionnelles précédentes, j'ai choisi d'orienter mes recherches sur l'implication de l'immunité cytosolique induite par l'IFN- γ dans la réponse immunitaire antitumorale et plus particulièrement sur l'induction de la mort cellulaire programmée. Je travaille en collaboration directe avec le Dr. Marine Hillaire sur les projets que j'ai initié.

Le cancer représente un défi sanitaire mondial important, nécessitant des stratégies de traitement innovantes. L'une des principales caractéristiques du cancer est la résistance à la mort cellulaire. De nombreuses approches thérapeutiques actuelles visent à induire l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, certains patients sont réfractaires au traitement en raison de l'échec des voies de signalisation apoptotiques. L'IFN- γ est apparu comme un acteur crucial pour promouvoir les différents types de mort cellulaire programmée. De nombreuses études ont montré que l'IFN- γ favorise la mort cellulaire lorsqu'il est associé à des médicaments chimiothérapeutiques. Cependant, les mécanismes induits par l'IFN- γ restent inconnus. Nos premiers résultats démontrent un effet contradictoire de la cytokine sur la mort cellulaire dépendant de l'agent chimiothérapeutique utilisé pour traiter les cellules. Une augmentation du taux de mort cellulaire est observée à 24 h lorsque l'étoposide et le paclitaxel sont associés à l'IFN- γ . Cet effet synergique est lié à la perturbation du potentiel membranaire mitochondrial par l'IFN- γ et à une augmentation de l'activité de la caspase-3/7. Inversement, l'IFN- γ réduit la mort cellulaire induite par le sorafénib. En outre, nos résultats remettent en question la notion selon laquelle IRF1 est le seul médiateur de la mort cellulaire induite par l'IFN- γ .

Ces résultats soulignent l'importance des mécanismes d'interaction spécifiques entre les IFN- γ et les médicaments chimiothérapeutiques. Les variations du type de mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques pourraient contribuer à ces réponses. De plus, comme IRF1 ne semble pas être impliqué dans les mécanismes décrits, cette étude suggère que d'autres gènes stimulés par l'IFN- γ interviennent dans le processus de mort cellulaire.