

**FICHE SUJET DE THESE**

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	<b>FINANCEMENT :</b> <input checked="" type="checkbox"/> Demandé <input type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement :
Titre de la thèse : <b>C – NU – Génération de Tregs dérivées d'iPSc par des organoïdes thymiques pour la thérapie cellulaire de la maladie auto-immune APECED</b>		3 mots-clés : Cellules iPS Organoïdes de thymus Tolérance immunologique
Unité/équipe encadrante : UMR1064 -CR2TI / équipe 2		
Directeur de thèse : <b>Dr Matthieu Giraud</b>		N° de tél : 0240084723 Mail : matthieu.giraud@univ-nantes.fr
<u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u> APECED est une maladie auto-immune rare, sévère, caractérisée par de graves lésions dans de nombreux organes, et qui met en jeu le pronostic vital dès l'enfance. Elle est causée par des mutations dans le gène codant la protéine AIRE qui est l'activateur majeur de l'expression des antigènes du soi présentés par les cellules médullaires épithéliales du thymus (mTECs) aux thymocytes en cours de développement. La perte de fonction de AIRE conduit en un défaut d'élimination des thymocytes auto-actifs (reconnaissant les antigènes du soi) et de sélection des cellules T régulatrices (Tregs) dans le thymus. Ainsi de nombreux T autoréactifs et une plus faible diversité de Tregs vont sortir du thymus chez les patients APECED et déclencher des attaques auto-immunes contre leurs organes. Aucune thérapeutique traitant spécifiquement les causes d'APECED n'existe à ce jour. Les patients reçoivent des immunosuppresseurs et des antifongiques, et ont une espérance de vie très limitée. Augmenter significativement le nombre des Treg dirigés contre les antigènes du soi chez ces patients permettrait de supprimer les attaques auto-immunes dont ils sont sujets.		
<u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u> L'objectif principal de ce projet est de reconstituer à partir de cellules iPSc (iPSc) reprogrammées à partir de fibroblastes de patients APECED et corrigées pour la mutation du gène AIRE, une différenciation complète en cellules T matures et fonctionnelles in vitro grâce à des organoïdes thymiques issues de la différenciation de ces mêmes iPSc. Ce projet repose sur les avancées récentes de notre groupe avec la génération, à partir d'iPSc, d'organoïdes thymiques capables de soutenir la différenciation de précurseurs des thymocytes primaires (ETPs) en cellules T CD4 et T CD8 matures, et d'autre part, l'obtention d'ETPs par différenciation dirigée d'iPSc. Ces résultats majeurs permettent d'envisager la génération de T CD4 régulateurs par des organoïdes thymiques en partant d'iPSc de patients APECED corrigées pour les mutations de AIRE dans l'optique d'une utilisation en thérapie cellulaire. Pour atteindre cet objectif, le projet se thèse consistera à :		
<u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u> <b>1) Caractériser les organoïdes thymiques obtenus par différenciation d'iPSc de patients corrigés pour les mutations de AIRE.</b> Deux lignées iPSc issues de deux patients APECED ont été générées en collaboration avec le groupe du Dr Otonkoski de l'université d'Helsinki. Chacune de ces lignées a été corrigée pour la mutation du gène AIRE par CRISPR-cas9. Nous caractériserons la différenciation des iPSc génétiquement corrigées en organoïdes thymiques, puis testerons l'expression de AIRE et des autoantigènes du soi induits par AIRE comme témoins de maturité des organoïdes. <b>2) Différencier des ETPs issues d'iPSc en cellules T CD4 dans les organoïdes thymiques</b> Pour générer des T CD4 à partir des iPSc corrigées de patients APECED dans notre système d'organoïdes thymiques, une première étape consistera à induire la différenciation des iPSc en ETPs mais aussi en thymocytes immatures plus tardifs en suivant le protocole mis au point par notre équipe. Les ETPs ou autres types de thymocytes immatures obtenus seront réaggrégés dans des organoïdes thymiques issus des mêmes iPSc. La différenciation en cellules T CD4 que ces organoïdes supporteront, avec notamment la génération de Tregs, sera analysée. La diversité du répertoire TCR de ces cellules sera évaluée par scRNA-seq et séquençage TCR. <b>3) Obtenir de Treg CD4 par les organoïdes thymiques</b> Pour favoriser la différenciation T vers un destin Treg, nous suivrons deux stratégies complémentaires avec 1- l'expansion des cellules T matures générées par les organoïdes dans un milieu de culture enrichi avec de la rapamycine and 2- la surexpression du facteur principal de l'identité Treg, FOXP3, dans la lignée T dérivée des iPSc par infection lentivirale d'un vecteur d'expression constitutif ou inducible pour FOXP3. Nous nous attendons ainsi à augmenter significativement la proportion de Treg CD4 obtenues par les organoïdes et à déterminer les conditions de culture permettant l'expansion de ces cellules afin qu'elles puissent être utilisées pour supprimer les attaques auto-immunes après transfert chez les patients APECED.		
<u>Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes) :</u> Le candidat devra avoir obtenu un M2 avec de fortes notions en immunologie et biologie cellulaire et effectué son stage pratique autour de la culture et la différenciation des cellules iPSc. Le candidat devra aussi être désireux de ou savoir programmer en R.		
<u>3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Provin N, Giraud M. Differentiation of pluripotent stem cells into thymic epithelial cells and generation of thymic organoids: applications for therapeutic strategies against APECED. <b>Frontiers in Immunology</b> (2022), 13, 930963.</li> <li>Padonou F, Gonzalez V , Provin N , Yayilkam S, Jmari N, Maslovskaja J, Kisand K, Peterson P , Irla M , Giraud M. Aire-dependent transcripts escape Raver2-induced splice-event inclusion in the thymic epithelium. <b>EMBO Rep</b> (2022), 23(3):e53576.</li> </ul>		

- Flippe L, Gaignerie A, Sérazin C, Baron O, Saulquin X, Themeli M, Guillonneau C, David L. Rapid and Reproducible Differentiation of Hematopoietic and T Cell Progenitors From Pluripotent Stem Cells. **Front Cell Dev Biol.** (2020), 8, 577464

Collaborations nationales et internationales :

**Collaborations internationales : Part Peterson (Estonie) / Eliisa Kekalainen (Finland) (Réseau TARID)**

**Collaborations nationales : Magali Irla (CIML, Marseille) / Roberto Mallone (Institut Cochin, Paris)**