

Candidature prix de thèse Beth Levine

Nom : Pradel

Prénom : Baptiste

Mail : baptiste.pradel@crick.ac.uk

Date de la soutenance : 07/09/2023

Directeur(trice) de thèse : Lucile ESPERT

Adresse du laboratoire de thèse :

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)

1919 Route de Mende 34293 Montpellier Cedex 5

Lettre de motivation

Par cette lettre, je vous fais part de ma candidature pour le prix de thèse "Beth Levine". Durant ma thèse sous la direction de Lucile ESPERT, j'ai pu contribuer à l'avancée des connaissances sur le lien entre les protéines ATGs et l'infection par le VIH-1, associées à deux publications dans le journal Autophagy dont une signée en premier auteur.

Ma candidature est motivée par ma passion pour l'autophagie, une thématique qui occupe une grande place dans ma vie de jeune chercheur.

Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à trois congrès du CFATG avec une présentation orale en 2022 et un poster en 2023. J'ai apprécié l'esprit collégial de la communauté et la qualité des exposés et discussions pendant ces événements. Chaque année, ce congrès était inscrit dans ma tête, car c'était l'occasion de discuter de nos travaux formellement ou non, et j'en sortais avec de nouvelles idées et connaissances.

Déjà happé par l'autophagie au début de ma thèse, mon intérêt s'est accru au fil des années, tournant presque à l'obsession diront certains de mes collègues.

Le CFATG m'a également aidé en finançant ma participation au congrès EMBO 2022 sur l'autophagie se déroulant en Hongrie ce qui m'a permis d'étendre mon réseau au niveau international. Pour toutes ces raisons, je suis reconnaissant envers le CFATG pour son soutien et son apport dans les discussions scientifiques m'ayant aidés durant ma thèse.

En retour, j'ai voulu montrer mon investissement pour la communauté du CFATG. Ainsi, en 2021, suite à l'appel du bureau, je me suis volontiers investi dans l'organisation du CFATGonline, avec Ada Nowasad et Marie Nollet, pour maintenir la dynamique malgré la pandémie de COVID-19. Cette expérience m'a donné l'envie de possiblement m'engager dans le bureau du CFATG dans le futur.

Par la suite, j'ai rejoint en post-doctorat l'équipe de Maximiliano Gutierrez au Francis Crick de Londres qui s'intéresse, entre autres, aux protéines ATGs dans le contexte de la tuberculose. Mon ambition est de continuer l'étude des processus autophagiques en infectiologie, avec, dans un futur plus éloigné, l'objectif de mener indépendamment ma recherche dans cette thématique.

Ainsi, je serais honoré de voir mes travaux valorisés par l'obtention du prix de thèse car cela démontrerait ma contribution, modeste, dans l'étude des protéines ATGs dans un contexte infectieux, en adéquation avec mon projet professionnel futur.

En vous remerciant d'avance pour l'attention portée à cette lettre,

Baptiste

Résumé des travaux

Le VIH-1 est un rétrovirus pandémique dont l'infection chez l'Homme cause le SIDA. Ce virus cible les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes TCD4+ (LT CD4+), qui sont déplétés au cours de l'infection, expliquant l'immunodéficience développée chez les patients infectés non traités (Moir et al, 2011).

Au cours de son cycle répliatif dans la cellule cible, le VIH-1 fait face à diverses réponses immunes et intrinsèques ayant pour objectif de limiter la multiplication et la transmission de l'agent pathogène.

Cependant, au cours de l'évolution, le virus a développé des stratégies pour bloquer ces mécanismes, ou bien, les détourner à son propre profit.

L'autophagie, un processus de dégradation lysosomale de composés intracellulaires fait partie de l'arsenal d'immunité intrinsèque cellulaire. Largement conservé chez les eucaryotes, l'autophagie est régulé par les gènes atg codant pour plus de 40 protéines ATGs (Yamamoto et al, 2023).

D'abord identifiées vis-à-vis de leur fonction dans le mécanisme autophagique, la progression des connaissances a permis de mettre également en lumière leur fonctions non-autophagiques.

C'est le cas de LC3B, membre de la famille des protéines ATG8. Elles ont la particularité d'être modifiées par un système de conjugaison de type ubiquitin-like permettant leur liaison covalente avec un phospholipide. Ceci leur confère alors la capacité de s'ancrer à des membranes.

Initialement, ATG8/LC3B était décrite comme un marqueur de l'autophagie canonique et des autophagosomes, vésicules à double membranes. Cependant, des travaux ultérieurs démontrent la diversité des membranes ancrées par ATG8/LC3B aboutissant au modèle d'ATG8ylation qui définit l'ancrage de cette famille de protéines à une membrane, qu'elle soit simple ou double (Kumar et al, 2021).

Mes travaux de thèse ont eu lieu dans le groupe de Lucile ESPERT s'intéressant au rôle de l'autophagie et des protéines ATGs dans le cadre de l'infection par le VIH-1.

Ce groupe, pionnier dans le domaine, a notamment mis en évidence que le contact entre des LT CD4+ infectés et des LT CD4+ non infectés avoisinants entraînent chez ces derniers une autophagie nécessaire à leur mort par apoptose (Espert et al, 2006). Au cours de ma thèse, j'ai pu participé à une étude montrant que dans ce cadre, les peroxysomes, organelles cruciaux pour réguler le stress oxydant, étaient dégradés par autophagie sélective (Daussy et al, 2021).

Dans le contexte de l'infection productive des LT CD4+ par le VIH-1, mon équipe d'accueil a démontré un lien entre la cinétique d'infection et le niveau d'ATG8ylation dans la cellule (Sagnier et al, 2015). Après une première étape d'induction dans les étapes précoces du cycle de réplication (entre 0 et 4h post-infection), l'ATG8ylation est ensuite contrôlée (Alfaisal et al, 2019) puis totalement inhibée par l'action de protéines virales afin d'éviter la dégradation du virus (Sagnier et al, 2015).

L'objectif de ma thèse était d'identifier le rôle de l'induction précoce de l'ATG8ylation lors de l'infection des LT CD4+ par le VIH-1.

Plusieurs travaux indiquaient que les protéines ATGs peuvent favoriser la réplication virale (Brass et al, 2008; Eekels et al, 2012), suggérant un effet-proviral de cette ATG8ylation.

En complément, j'ai montré au cours de ma thèse, que le pré-traitement de LT CD4+ avec un inhibiteur de Vps34, requis pour l'ATG8ylation, diminue l'infection par le VIH-1. Plus précisément, nous avons décrit une diminution de la production de particules virales et également d'intermédiaires de la rétrotranscription suggérant un effet pro-viral de l'ATG8ylation dans les premières étapes du cycle viral.

Ainsi, nous avons voulu étudier, lors de ces étapes, la dynamique spatiotemporelle de l'ATG8ylation par microscopie à temps réel. Afin d'éviter les biais de surexpression, nous avons généré une lignée modèle de HEK293T, portant les récepteurs du VIH-1, éditée par CRISPR Knock-In afin d'exprimer une forme endogène de GFP-LC3B. Ces cellules éditées ont ensuite été infectées par des particules virales fluorescentes et imagées en 3D par microscopie confocale. Nous avons observé que des points de LC3B sont enrichis proche de la membrane plasmique après exposition aux particules virales et plus précisément proche des sites d'entrée. Ces observations ont été

confirmées par quantification.

(i) Pour mesurer l'enrichissement des points de LC3B proche de la membrane plasmique, nous avons marqué nos cellules avec la SirActin, colorant l'actine sous-corticale, indicatrice de la bordure cellulaire. Puis, nous avons mesuré la distance entre le marquage SirActin et les points de LC3B dans diverses conditions. Nos résultats montrent une diminution de la distance entre LC3B et la SirActin, lorsque les cellules éditées sont incubées avec les particules virales confirmant l'enrichissement de LC3B à la membrane plasmique. Afin d'étudier la signalisation impliquée dans ce phénomène, nous avons inhibé la fixation de la particule virale avec ses récepteurs. L'inhibition du co-récepteur CXCR4, avec la drogue AMD3100, n'affecte pas la localisation de LC3B en réponse au VIH-1. En revanche, lorsque l'on utilise des cellules éditées n'exprimant pas le récepteur CD4, on abolit le phénotype observé. Ces résultats indiquent que la fixation du VIH-1 au CD4 est responsable de l'enrichissement de LC3B proche de la membrane plasmique.

(ii) Pour quantifier la présence de LC3B proche des sites d'entrée viraux, nous avons suivi des particules virales entrant dans la cellule cible. Ensuite, nous avons généré une sphère de 1,5µm de diamètre autour de la particule et quantifié le nombre de points de LC3B dans cette zone, avant, pendant et après l'entrée du VIH-1. Cette valeur augmentant pendant l'entrée virale, nous avons conclu que LC3B est bien enrichi à la proximité des sites d'entrée du VIH-1. Ces résultats sont obtenus à la fois avec des virus utilisant le co-récepteur CXCR4 ou le co-récepteur CCR5, confirmant un effet indépendant du co-récepteur.

Ces données nous ont amené à étudier le rôle de l'ATG8ylation dans l'étape d'entrée virale. Pour cela, nous avons utilisé la méthode référence de BlamVpr assay, permettant de quantifier l'entrée par fusion à la membrane plasmique du VIH-1. Nous avons montré que la transduction de LT CD4+ avec des shRNA dirigés contre des protéines impliquées dans l'ATG8ylation (BECN1, ATG7) diminue l'entrée du VIH-1. En complément, la surexpression dans la cellule cible de la protéine LC3B, sous sa forme conjugable, favorise cette étape du cycle viral. Ces données indiquent que l'ATG8ylation facilite l'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible. Par la suite, nous voulions savoir si cet effet était lié à l'autophagie canonique dégradative ou une voie non-autophagique associée à l'ATG8ylation.

De façon intéressante, nous avons observé que le pré-traitement des LT CD4+ avec un cocktail d'antiprotéases n'entraîne pas une diminution de l'entrée virale, suggérant que l'ATG8ylation favorisant l'entrée est un processus non-dégradatif.

Pour confirmer cette observation par une approche génétique, nous avons transduit des LT CD4+ avec un shRNA dirigé contre ATG13, une protéine impliquée uniquement dans l'autophagie canonique. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer que l'effet pro-entrée de l'ATG8ylation était indépendant de l'autophagie canonique dégradative.

En conclusion, l'étude du rôle de l'ATG8ylation induite dans les phases précoces de l'infection des LT CD4+ par le VIH-1 nous a permis de montrer que (i) la protéine LC3B est enrichie proche des sites d'entrée viraux dans les premières étapes de l'infection et que (ii) la machinerie de conjugaison de LC3B et son ancrage aux membranes favorise l'entrée virale indépendamment de sa fonction dans l'autophagie canonique. L'ensemble de ces données mettent en évidence une nouvelle stratégie de détournement d'une machinerie cellulaire par le VIH-1 afin de réaliser une étape cruciale de son cycle de réplication.

