



Jeunes
Chercheurs

Livret
des **communications**
soumises

LA LIQUE

CONTRE LE CANCER

Jeune et chercheur, qu'espérer de mieux ?

FRANÇOIS GUILLEMIN,

Président du Conseil scientifique national de la Ligue contre le cancer

La journée « Jeunes & Chercheurs » a été pensée par le service « Recherche » de la Ligue avec l'adhésion enthousiaste du Conseil scientifique national et l'aide extrêmement précieuse de ses Commissions d'expertise nationales, qu'elles soient ici vivement remerciées. Les jeunes chercheurs ont accordé un accueil encore plus enthousiaste au concept dynamique de cette journée. Cette mobilisation, concrétisée par l'envoi de 130 abstracts, nous a conduit à maintenir l'évènement, malgré les conditions exceptionnelles de repli sanitaire, mais sous un format différent. Merci à tous !

Malgré sa longue histoire, la Ligue est certainement restée trop discrète vis-à-vis de ce qu'elle peut revendiquer : **premier financeur associatif indépendant de la recherche en cancérologie en France.** Elle est depuis son origine un partenaire pour les chercheurs, tout au long de leur carrière.

La formation des scientifiques les plus jeunes au métier de la recherche constitue pour la Ligue un domaine d'investissement stratégique et prioritaire. Sur les dix dernières années, la Ligue a financé près de 1 800 allocations doctorales pour un montant total de plus de 51 millions d'euros. De 2015 à 2019, environ 200 doctorants ont été soutenus annuellement tout au long de leurs parcours, 1^{ère}, 2^e, 3^e et 4^e année de thèse, pour un budget annuel moyen de six millions d'euros. Ce montant représente à lui seul 16 % du total du soutien à la recherche financée par la Ligue sur cette période. Et, dans un environnement où la crise sanitaire et ses répercussions économiques contraignent fortement les ressources de la Ligue, le caractère prioritaire de l'investissement dans la formation des jeunes chercheurs en cancérologie a été réaffirmé par le Conseil d'administration en juin dernier. C'est là que se joue l'avenir de la recherche qui cristallise tous espoirs de la Ligue, des patients et de ceux, donateurs et testateurs, qui lui octroient les moyens pour agir.

Avec l'organisation de la journée « Jeunes & Chercheurs » la Ligue a souhaité ostensiblement montrer la confiance accordée aux jeunes chercheurs qu'elle a choisi de financer mais également leur rappeler ce qui est attendu d'eux. Jeune et chercheur... que pourrait-on espérer de mieux pour soi en tout début d'apprentissage professionnel ? Au-delà, le métier de chercheur permet de s'intégrer à une communauté dont la diversité est une vraie richesse et réalise un remarquable *continuum*. Le chercheur a la possibilité de participer à l'une des plus belles réalisations de l'humanité : la découverte, la construction, la transmission et l'essaimage des connaissances et des savoirs.

Viser l'excellence et faire progresser son domaine de recherche sont les exigences attendues pour tout jeune chercheur bénéficiant du soutien de la Ligue. Ces jeunes chercheurs dans lesquels la Ligue croît et investit ne représentent qu'une fraction des effectifs de leur classe d'âge : une fraction sélectionnée pour sa réussite à l'issue d'un parcours qui nécessite intelligence et labeur. Nos espérances et celles de tous nos concitoyens touchés par le cancer - malades, parents et proches - sont immenses. Nous avons confiance en eux.



Programme

20 octobre 2020

Diffusion en ligne sur [Ligue-cancer.tv](https://www.ligue-cancer.tv) et Facebook

09h00 - 10h00 : Accueil sur Ligue-cancer.tv et Facebook

10h00 - 12h00 : La Recherche avance !

- Introduction – Pr François Guillemin, Président du Conseil Scientifique National
- Présentations scientifiques et présentation de projets de thèse en 180 secondes, échanges avec l'auditoire
- Vote en ligne pour les meilleures présentations
- Mot de clôture du Pr Axel Kahn, Président de la Ligue contre le cancer

13h00 : Remise des prix

13h05 - 14h30 : La recherche s'affiche

- Ouverture de la séance posters en Ligne

14h30 - 16h00 : Engagés pour guérir

- Échanges avec des scientifiques confirmés : chercheurs, entrepreneurs



Sommaire

Présentations orales

Abstract 001

Ciblage des fonctions transcriptionnelles de NLRP3 pour promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale Th17 *in situ* - Intérêts thérapeutiques en cancérologie

Théo ACCOGLI - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 002

Étude d'un nouveau gène de prédisposition aux cancers du rein familiaux impliqué dans l'autophagie

Florine ADOLPHE - 4^e année de thèse 2019

Abstract 003

Impact fonctionnel des mutations *TCF12* dans les cellules d'origine des gliomes et dans la gliomagenèse

Sofia ARCHONTIDI - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 004

Rôle des histones désacétylases dans la réponse aux thérapies dans les cancers gastriques

Amandine BADIE - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 005

L'immunothérapie adjuvante ciblant le ganglioside GD2 O-acétylé permet de contourner la résistance à la chimiothérapie induite par les cellules souches de glioblastome

Meriem BAHRI - 1^{ère} année de thèse 2016

Abstract 006

CD163 and IL-4R α expressing TAMs as potential therapeutic targets in melanoma

Elodie BAUDOIN - 4^e année de thèse 2019

Abstract 007

Modulation de l'activité de l'oncogène KRAS par BCLxL : aspects mécanistiques et implications thérapeutiques

Nina-Maya BELAID - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 008

Identification d'un nouveau marqueur de CTCs : CD44v6

Guillaume BELTHIER - 4^e année de thèse 2019

Abstract 009

Rôle du variant *de novo* dans CABIN1 et de la mutation somatique dans KRAS chez un patient avec un déficit immunitaire et un syndrome lymphoprolifératif

Marta BENAVIDES-NIETO - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 010

Cibler les molécules inhibitrices de la signalisation intracellulaire «CISH» dans les cellules Natural Killer

Pierre-Louis BERNARD - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 011

Caractérisation et quantification cellulaire de la délivrance des vésicules extracellulaires dans les cellules receveuses

Émeline BONSERGENT - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 012

La leucémie aigüe myéloïde murine altère la réponse des cellules Natural Killer à l'interleukine-15

Berna BOU TAYEH - 4^e année de thèse 2019

Abstract 013

Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs d'HSP110

Vincent CABAUD GIBOUIN – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 014

Fonction et régulation de l'ADN polymérase spécialisée et dans la stabilité des régions intrinsèquement difficiles à répliquer

Alice CAHN – 4^e année de thèse 2019

Abstract 015

DAXX contribue à l'organisation de l'hétérochromatine et protège l'intégrité génomique des cellules pluripotentes

Antoine CANAT – 4^e année de thèse 2019

Abstract 016

Gp96, a complement C3 chaperone, plays a critical role in alternative M2 macrophages

Killian CHAUMONNOT – 4^e année de thèse 2019

Abstract 017

La Mambaquarétine, une toxine de venin de mamba vert, nouvel antagoniste du récepteur V2 pour le diagnostic et le traitement potentiel du cancer rénal

Amélia CHORFA – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 018

Boron neutron capture therapy assisted by boron-enriched polysaccharide nanogels

Simon CONINX – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 019

L'autophagie, une cible thérapeutique potentielle dans les Néoplasies Myéloprolifératives JAK2V617F

Charly COURDY – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 020

MDR1 expression identifies a TH1.17 effector population resistant to chemotherapy treatments that could play a pivotal role in anti-cancer immunity

Anthony DI ROIO – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 021

Le complexe Polycomb PRC2 : Étude intégrative de sa dynamique de recrutement et de la régulation de son activité

Seynabou DIOP – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 022

E-cadhérine : Nouvel acteur du remodelage matriciel lors de la carcinogénèse pancréatique

Aurélié DOBRIC – 4^e année de thèse 2019

Abstract 023

Étude de la régulation des activités de la télomérase

Lou DURET – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 024

Multidirectional MRT markedly exceeds the therapeutic index of broad beams for intracerebral rat 9L gliosarcoma

LAURA ELING – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 025

Étude moléculaire et fonctionnelle du récepteur à activité Tyrosine Kynase PTK7 et ciblage dans le cancer colorectal

Laetitia GANIER – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 026

Identification et optimisation d'agents anticancéreux par une approche de « Fragment-based drug discovery » : application au complexe protéique syntenin/syndecan

Manon GARCIA – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 027

L'ARN non codant NEAT1 est un activateur traductionnel de l'expression des facteurs (lymph)angiogéniques lors du stress hypoxique

Anne-Claire GODET – 4^e année de thèse 2018

Abstract 028

Malignité des tumeurs mutées sur le gène SDHB : Rôle de l'homéostasie du fer et du stress oxydant

Judith GONCALVES - 4^e année de thèse 2019

Abstract 029

Recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie anti checkpoints en utilisant l'analyse transcriptomique en cellule unique de cellules T CD8+ mémoire "stem-cell-like"

Paul GUEGUEN - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 030

Effet anti-leucémique prophylactique et thérapeutique induit par le peptide dérivé d'AAC-11 RT53

Justine HABAULT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 031

Le rôle de PARP3 dans le cancer de la prostate

Daisy HARWOOD - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 032

Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse

Jades HEBRAS - 4^e année de thèse 2019

Abstract 033

Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin

Aurélia JOLY - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 034

Implication des bisphénols dans la tumorigenèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ER α 36 et BMP2

Nora JUNG - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 035

Complexes Thérapeutiques Nanométriques : Développement d'agents bimodaux IRM multifonctionnels ciblant le cholangiocarcinome

Memona KHAN - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 036

Étude du rôle du TGF-beta dans le contrôle de la réactivité des lymphocytes T contre les antigènes tumoraux

Ossama LABIAD - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 037

Régulateurs de l'expression de PD-L1 dans le mélanome : approche de criblage innovante pour identifier des médicaments efficaces dans le traitement du mélanome cutané

Sophie LACHAUD - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 038

Foxp3 regulatory T cells activate tumor-produced TGF-beta : a key mechanism to prevent T cell anti-tumor immune response

Alexandra LAINE - 4^e année de thèse 2018

Abstract 039

New therapeutic weapons to induce selective killing of myeloma cells

Jean-Marie LAMBERT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 040

Inhibition of CD147/VEGFR-2 interaction decreases malignant phenotype of melanoma models

Alexandra LANDRAS - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 041

Implication du métabolisme dans la résistance de l'ostéosarcome aux inhibiteurs des protéines à bromodomains

Mélanie LAVAUD - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 042

L'activité physique spontanée en condition d'obésité favorise l'immunité anti-tumorale conduisant à un ralentissement de la croissance tumorale mammaire

Delphine LE GUENNEC - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 043

Identification of a Novel Subset of Neutrophils in scRNAseq Data from Lung Cancer Patient's Peripheral Blood

Pacôme LECOT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 044

Contrôle de la plasticité épithélium/mésenchyme : approches génomiques chez la drosophile

Alexandra MANCHENO-FERRIS - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 045

Développement d'anticorps pH-dépendants avec un meilleur profil de sécurité pour l'immunothérapie du cancer

Tristan MANGEAT - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 046

Lumière sur les cellules tumorales

Hussein MEHIDINE - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 047

Exploration de la plasticité de l'inactivation du chromosome X dans le système hématopoïétique, chez l'humain

Madeleine MOSCATELLI - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 048

Changements fonctionnels de la translocase de la membrane interne mitochondriale lors de l'import des protéines à préséquence

Cyril MOULIN - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 049

Expression différentielle des points de contrôle immunitaires au cours des lymphoproliférations post transplantation EBV+ et EBV

Cecilia NAKID - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 050

Étude du rôle des récepteurs au S1P et de leurs interactions dans la migration des lymphocytes T

Antoinette NEYRA - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 051

La double fonction PKC ϵ : Exploration de la relation entre la migration cellulaire et la division cellulaire

Amandine NICOLLE - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 052

Rôle des vésicules extracellulaires stromales suite à un traitement au Folfirinox dans la chimiorésistance du cancer pancréatique

Jérémy NIGRI - 4^e année de thèse 2019

Abstract 053

Les cellules X : Un nouvel espoir dans la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Anne-Beatrice NOTARANTONIO - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 054

Fonction d'une sous-unité du complexe médiateur de transcription dans la prolifération des tissus

Adeline PAYET - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 055

Design, synthesis and biological evaluation of new CA-4 analogues series as potent anti-tubulin agents targeting colchicine binding site

Shannon PECNARD - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 056

Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more efficient and less toxic targeting of brain tumors

Patricia PIRIS - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 057

Identification des voies de signalisation dépendantes de PKA dans la migration et la dissémination métastatique des cellules du cancer du sein

Mathilde PRPONNET - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 058

Restauration de l'activité tumeur-suppresseur du miR-16 dans le mélanome uvéal

Anais QUÉMÉNER - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 059

Intestinal epithelial development and defense: functional analysis in zebrafish

Soraya RABAHI - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 060

Nouvel effet du sécrétome de cellules sénescentes sur des cellules tumorales : la transdifférentiation neuroendocrine

Clotilde RAYNARD - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 061

Development of a novel anti-cancer strategy for Adrenocortical Carcinoma by nanovectorisation of microRNAs via Lipidots®

Soha REDA EL SAYED - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 062

CoSiAn - Analyse de Similarité par Combinaison utilisée afin d'améliorer la détection de similarité entre deux molécules et de faciliter la sélection de poses après amarrage moléculaire

Victor REYS - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 063

Nouvelles voies chromatiniennes de répression des éléments transposables

Emeline ROGER - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 064

Rôle de la désensibilisation de CXCR4 dans la spécification lympho-myéloïde des progéniteurs hématopoïétiques multipotents

Vincent RONDEAU - 4^e année de thèse 2019

Abstract 065

Translatome-based classification of pancreatic cancer reveals a metabolic dependency of a new tumor subtype

Saueun SHIN - 4^e année de thèse 2019

Abstract 066

Caractérisation du rôle de la particule 5S libre dans le contrôle du cycle cellulaire

Sophie TAGNERES - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 067

Rôle de la barrière sang-nerf dans la neuropathie induite par l'oxaliplatine

Sonia TAÏB - 4^e année de thèse 2019

Abstract 068

Rôle de l'instabilité génomique dans le potentiel métastatique des cellules tumorales circulantes (CTC) de cancer bronchique non à petite cellule (CBNPC)

Tala TAYOUN - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 069

Origines de la létalité cellulaire consécutive à une dérégulation de la recombinaison homologe dans les cellules humaines

Mélissa THOMAS - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 070

La protéine GILZ : un nouveau modulateur important de la biologie des cellules dendritiques

Mathias VETILLARD - 4^e année de thèse 2019

Abstract 071

Comprehensive transcriptomic characterization of 1 600 sarcomas for diagnosis and immune contexture

Julien VIBERT - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 072

SALL4 expression defines a molecular subset of pancreatic ductal adenocarcinoma with poor prognostic features

Angélique VIENOT - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 073

Étude par biologie structurale intégrée de complexes de complexes transcriptionnels du récepteur nucléaire ERRalpha impliqués dans la progression tumorale

Pierre VILELA - 1^{ère} année de thèse 2018

Affiches

Abstract 074

Développement et validation pré-clinique d'un peptide thérapeutique dans le cancer mammaire

Tesnim AL KHALIFA - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 075

BMP1B and JAK2/STAT3 inhibition targets BMP4-niche mediated leukemic stem cells that persist during CML remission

Kawtar ARIZKANE - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 076

Caractérisation du rôle des propriétés mécaniques de la niche hématopoïétique dans la mise en place des mécanismes de résistance dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes

Léa BARRAL - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 077

Development of a Myogenin knock-in mouse line for live imaging

Maria BENAVENTE DIAZ - 4^e année de thèse 2019

Abstract 078

Cartographie des mécanismes de résistance à la mort cellulaire dans les neuroblastomes : vers l'identification de nouveaux mécanismes tumorigéniques

Joseph BISACCIA - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 079

Interférence des oncoprotéines de HPV avec l'interactome humain

Anna BONHOURS - 1^{ère} année de thèse 2016

Abstract 080

Biomarqueurs d'inflammation et risque de cancer du sein dans la cohorte européenne EPIC

Manon CAIRAT - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 081

Rôle de LOXL2, une enzyme d'échafaudage de la matrice extracellulaire, dans la plasticité phénotypique des mélanomes

Alexandrine CARMINATI - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 082

Rôle d'une déméthylase d'histone dans la régulation de la production de piRNAs par des séquences spécifiques

Karine CASIER - 4^e année de thèse 2019

Abstract 083

METAML - Étude systémique *in vivo* du dialogue métabolique entre le microenvironnement et les cellules résistantes à la cytarabine dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes

Guillaume COGNET - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 084

Contrôle de l'activité lymphocytaire par les granules de stress. Nouvelles cibles pour l'immunothérapie ?

Nicolas CURDY - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 085

Cycline A, un lien entre prolifération et polarité cellulaire, deux processus dérégulés dans les cellules cancéreuses

Pénélope DARNAT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 086

Development of innovative nanocomposite hydrogels for the treatment of Glioblastoma Multiforme

Amel DJOUDI - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 087

BRCAness comme biomarqueur circulant

Alexandre EECKHOUTTE - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 088

Rôle de la dissémination précoce dans le cancer colorectal

Zeinab HOMAYED - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 089

L'activation du récepteur purinergique P2RX7 contrôle la croissance des tumeurs pulmonaires

Serena JANHO DIT HREICH – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 090

Regulation and limitations of the DNA replication checkpoint in the control of entry into mitosis

Vicente LEBREC – 4^e année de thèse 2019

Abstract 091

Développement d'anticorps pH-dépendants avec un meilleur profil de sécurité pour l'immunothérapie du cancer

Tristan MANGEAT – 4^e année de thèse 2020

Abstract 092

Syndrome de Lynch (Prédisposition Héritaire aux Cancers MSI) : Étude des Conséquences Génomiques et Fonctionnelles de la Déficience MMR au Stade Pré-Tumoral (Crypte intestinale MMR-déficiente)

Hugo MONTÉMONT – 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 093

Caractérisation des réseaux moléculaires et voies biologiques associés à la réponse et à la résistance acquise aux thérapies de différenciation dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutation IDH : intégration de données moléculaires à haut débit longitudinales issues de deux essais cliniques.

Nicolas POULAIN – 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 094

EMT-transcription factor ZEB1 down-regulates the POL θ -mediated end-joining pathway

Mélanie PRODHOMME – 4^e année de thèse 2019

Abstract 095

Argonaute catalytic activity is required for maternal mRNA clearance in embryos

Piergiuseppe QUARATO – 4^e année de thèse 2019

Abstract 096

Contrôle traductionnel de la fonction endothéliale lymphatique par des ribosomes spécialisés

Emilie ROUSSEL – 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 097

Interaction entre la voie FANC et la senataxin dans la réplication, la transcription et la réponse aux dommages de l'ADN

Maha SAID – 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 098

Caractérisation des « usines de traduction » de la β -caténine et implication dans le cancer

Soha SALLOUM – 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 099

Rôle de Perlécane, protéine de la membrane basale, dans la signalisation inter-organe liée aux BMPs

Prune SMOLEN – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 100

Ciblage des fonctions non-canoniques de la télomérase dans les cancers

Nicolas SOUBEIRAN – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 101

Mechanistic study of ZEB1 and ZEB2 antagonistic roles in melanoma

Yaqi TANG – 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 102

Immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie des tumeurs cérébrales pédiatriques

Pauline THOMAS – 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 103

Intérêt de l'inhibiteur d'HDAC belinostat, en monothérapie ou associé à des inhibiteurs de Bcl-xL ou de Mcl-1, pour le traitement des cancers de l'ovaire

Cécilia THOMINE – Allocation régionale (Cd 76) 2019

Abstract 104

Déficiencia de la proteína fosfatasa Wip1 au sein du système hématopoïétique : effets sur la tumorigenèse

Burban UYANIK - 4^e année de thèse 2019

Abstract 105

The role of ZNRF3 and TP53 inactivation in adrenocortical tumorigenesis

James WILMOUTH - 1^{ère} année de thèse 2018

Ma thèse en trois minutes

Abstract 106

Impact fonctionnel des mutations TCF12 dans les cellules d'origine des gliomes et dans la gliomagenèse

Sofia ARCHONTIDI - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 107

Modèle d'étude de la dissémination précoce du cancer colorectal

Guillaume BELTHIER - 4^e année de thèse 2019

Abstract 108

Utilisation d'antiagrégants plaquettaires et risque de cancer du sein dans une cohorte prospective de femmes ménopausées

Manon CAIRAT - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 109

DAXX contribue à l'organisation de l'hétérochromatine et protège l'intégrité génomique des cellules pluripotentes

Antoine CANAT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 110

Prédicteurs neuromusculaire, psychologique et comportemental de la fatigue liée au cancer chez des patientes atteintes de cancer du sein

Martin CHARTOGNE - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 111

The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy

Marie CHOLLAT-NAMY - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 112

La Mambaquarétine, une toxine de venin de mamba vert, nouvel antagoniste du récepteur V2 pour le diagnostic et le traitement potentiel du cancer rénal

Amélia CHORFA - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 113

E-cadhérine : Nouvel acteur du remodelage matriciel lors de la carcinogénèse pancréatique

Aurélien DOBRIC - 4^e année de thèse 2019

Abstract 114

Malignité des tumeurs mutées sur le gène SDHB : Rôle de l'homéostasie du fer et du stress oxydant

Judith GONCALVES - 4^e année de thèse 2019

Abstract 115

Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse

Jades HEBRAS - 4^e année de thèse 2019

Abstract 116

Quelles sont les connaissances et les expériences que les professionnels en oncologie ont auprès des jeunes aidants ?

Pauline JUSTIN - 1^{ère} année de thèse 2019

Abstract 117

Foxp3 regulatory T cells activate tumor-produced TGF-beta: a key mechanism to prevent T cell anti-tumor immune response

Alexandra LAINE - 4^e année de thèse 2018

Abstract 118

Identification of a Novel Subset of Neutrophils in scRNAseq Data from Lung Cancer Patient's Peripheral Blood

Pacôme LECOT - 4^e année de thèse 2019

Abstract 119

LynchRisk : Un modèle mathématique mendélien pour le calcul du risque individuel et familial de syndrome de Lynch et l'aide à la classification des variants

Alexandra LEFEBVRE - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 120

Lumière sur les cellules tumorales

Hussein MEHIDINE - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 121

Les cellules X : Un nouvel espoir dans la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Anne-Beatrice NOTARANTONIO - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 122

Identification des voies de signalisation dépendantes de PKA dans la migration et la dissémination métastatique des cellules du cancer du sein

Mathilde PROPONNET - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 123

Nouvel effet du sécrétome de cellules sénescentes sur des cellules tumorales : la transdifférentiation neuroendocrine

Clotilde RAYNARD - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 124

Comment évaluer la parole après traitement de cancer de la cavité buccale et de l'oropharynx ?

Marie REBOURG - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 125

Development of a novel anti-cancer strategy for Adrenocortical Carcinoma by nanovectorisation of microRNAs via Lipidots®

Soha REDA EL SAYED - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 126

Rôle de Perlecan, protéine de la membrane basale, dans le signalisation inter-organe liée aux BMPs

Prune SMOLEN - 1^{ère} année de thèse 2018

Abstract 127

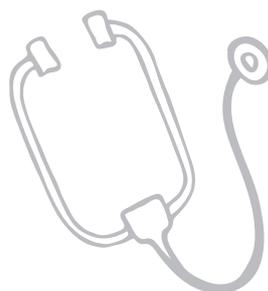
Origines de la létalité cellulaire consécutive à une dérégulation de la recombinaison homologe dans les cellules humaines

Mélissa THOMAS - 1^{ère} année de thèse 2017

Abstract 128

Immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie des tumeurs cérébrales pédiatriques

Pauline THOMAS - 1^{ère} année de thèse 2019



Présentations orales

Abstract 001

Ciblage des fonctions transcriptionnelles de NLRP3 pour promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale Th17 *in situ* – Intérêts thérapeutiques en cancérologie

Théo ACCOGLI – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : François Ghiringhelli

INSERM U1231, Centre de Recherche «Lipides, Nutrition, Cancer», DIJON

Le système immunitaire est capable de reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses, mais par pression de sélection la tumeur peut progressivement échapper à cette surveillance. Les traitements visant à rétablir la réponse immunitaire anti-tumorale sont très efficaces chez certains patients, mais malheureusement sans effets durables pour la majorité. S'il on connaît l'importance des Lymphocytes T cytotoxiques dans cette réponse, celle des CD4+ (LT CD4+) n'a été abordée que récemment. Des études récentes confirment sa nécessité, tant dans l'immunité anti-tumorale spontanée qu'en réponse aux immunothérapies. Ce projet se focalise sur les Th17, un sous-type de CD4+ possédant une relative plasticité. Deux sous-populations coexistent, la première, nommée Th17/Treg (Th17r), serait pro-tumorale et la seconde, nommée Th17/Th1 (Th17i) serait anti-tumorale. En parallèle, notre équipe étudie la protéine NLRP3, et a démontré qu'associée à IRF4 elle participe à la différenciation Th2. Cette étude a révélé qu'NLRP3 impacte la différenciation Th17 et des données préliminaires ont suggérées qu'elle était impliquée dans l'orientation de la polarisation entre Th17i ou Th17r. Ce projet vise à étayer notre compréhension de la biologie des Th17 en étudiant NLRP3, et évaluer leur impact sur le microenvironnement tumoral. Le but est à terme de déterminer si NLRP3 peut être une cible thérapeutique des traitements contre le cancer, notamment pour améliorer les immunothérapies.

Des modèles de souris KO NLRP3 total (N3^{-/-}) ou restreint aux CD4+ (CD4^{cre}N3^{-/-}) et des lignées tumorales murines nous ont permis d'évaluer l'impact du KO sur la croissance tumorale et le rôle des LT CD4+

et des Th17 en particulier. Et des cultures de Th17 *in vitro* nous ont permis d'étudier les différences génétiques, fonctionnelles et métaboliques en l'absence d'NLRP3.

Nous montrons dans ce projet qu'en l'absence d'NLRP3 dans les LT CD4+, la croissance tumorale de plusieurs lignées cancéreuses est réduite, et que si les Th17r WT ont des propriétés pro-tumorales, les Th17r N3^{-/-} sont quant à eux anti-tumorales. Ceci semble dû à une augmentation des fonctions pro-inflammatoires des Th17r en l'absence d'NLRP3, entraînant une modification du microenvironnement tumoral délétère pour la croissance tumorale. En outre, les Th17r N3^{-/-} sont plus apparentés à des Th17i qu'à des Th17r, et l'interaction entre NLRP3 et IRF4 dans les Th17 est caractéristique du sous-type régulateur.

Ces résultats nous permettent d'affirmer qu'NLRP3 joue effectivement un rôle dans le switch Th17i / Th17r en faveur de ces derniers. Ce phénomène semble lié aux fonctions transcriptionnelles du complexe NLRP3-IRF4, et l'inhiber permet aux Th17 d'acquiescer des fonctions anti-tumorales. Ceci nous permet de mieux comprendre la biologie des Th17 et d'envisager à terme de proposer un traitement permettant d'inhiber les fonctions transcriptionnelles d'NLRP3 dans les LT CD4+ afin d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale.

Abstract 002

Étude d'un nouveau gène de prédisposition aux cancers du rein familiaux impliqué dans l'autophagie

Florine ADOLPHE – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Stéphane RICHARD

Laboratoire de Génétique Oncologique EPHE, Gustave Roussy, VILLEJUIF

Florine Adolphe^{1,2}, Sophie Ferlicot^{2,3,4}, Virginie Verkarre^{4,5}, Sophie Couvé^{1,2}, Flore Renaud^{1,2}, Pauline Garnier^{1,2}, Betty Gardie^{1,6}, Stéphane Richard^{1,2,4} et Sophie Gad^{1,2}.

1- EPHE, PSL, Paris ; 2- INSERM U1186, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif ; 3- Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre ; 4- Réseau National de Référence pour Cancers Rares de l'Adulte PREDIR labellisé par l'INCa, Hôpital de Bicêtre,

AP-HP, et Service d'Urologie, Le Kremlin-Bicêtre ; 5- Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris ; 6- L'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Nantes.

Avec 15.300 nouveaux cas diagnostiqués et 5.500 décès chaque année, le cancer du rein à cellules rénales (CCR) est le sixième cancer le plus fréquent chez l'adulte en France. Environ 30% des patients présentent des métastases au diagnostic. Les types histologiques majoritaires

sont les carcinomes rénaux à cellules claires (75%), les carcinomes papillaires de type 1 et 2 (10-15%) et les carcinomes chromophobes (5%). Plusieurs facteurs de risques prédisposent aux CCR : tabac, obésité, certaines expositions professionnelles, hypertension artérielle et prédisposition génétique. Les prédispositions sont estimées à 6-8% de l'ensemble des CCR mais leur étude est d'un intérêt capital tant au plan clinique que fondamental.

Les formes familiales de cancers rénaux se transmettent selon le mode autosomique dominant. Il existe une douzaine de gènes de prédisposition aux CCR, parmi lesquels *VHL* (responsable de la maladie de von Hippel-Lindau), *FLCN* (syndrome de Birt-Hogg-Dubé), *FH* (léiomyomatose héréditaire) et *MET* (carcinome papillaire de type 1 héréditaire). Globalement, les protéines codées par ces quatre gènes majeurs interviennent dans la voie de réponse à l'hypoxie via le facteur de transcription HIF, jouant un rôle central dans la carcinogenèse par son implication dans de nombreux processus cellulaires, et la voie de prolifération mTOR.

Nous nous sommes intéressés à une famille atypique, comprenant 3 cas atteints de tumeurs du rein de types histologiques différents : un carcinome à cellules claires, un carcinome papillaire de type oncocytaire et un angiomyolipome. Cette famille ne présentant pas de mutation constitutionnelle dans les gènes de prédisposition connus aux CCR, nous avons recherché le gène en cause par un séquençage

de l'exome. Nous avons identifié une mutation de type décalage du cadre de lecture (entraînant un codon stop prématuré) dans le gène *NBR1* (*Neighbor of BRCA1 gene 1*). Il s'agit d'un récepteur cargo de l'autophagie permettant l'attachement de protéines et organelles endommagées aux autophagosomes pour qu'elles y soient dégradées. Il a été montré que *NBR1* est nécessaire au maintien de l'homéostasie et des fonctions biologiques cellulaires, notamment via son implication dans la pexophagie. La dérégulation de l'autophagie est impliquée dans de multiples maladies, et particulièrement dans les CCR avec l'activation des voies HIF et mTOR, régulateurs majeurs de l'autophagie.

Nous avons initié l'étude de l'activité de *NBR1* sauvage et mutée sur la prolifération cellulaire dans des lignées rénales. Nos résultats suggèrent que la protéine mutée induit une augmentation de la prolifération dans certaines lignées par rapport à la protéine sauvage. De plus, d'autres expériences semblent montrer que *NBR1* mutée altère le processus autophagique, ceci étant probablement dû à la séquestration de ses partenaires et de ses cibles dans la cellule. Notre hypothèse serait que la protéine *NBR1* mutée, qui est tronquée, agirait comme un dominant-négatif.

Nous espérons confirmer l'identification de *NBR1* comme nouveau gène de prédisposition aux CCR. Notre étude permettra aussi de caractériser les liens entre autophagie et cancérogenèse rénale.

Abstract 003

Impact fonctionnel des mutations *TCF12* dans les cellules d'origine des gliomes et dans la gliomagenèse

Sofia ARCHONTIDI – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Emmanuelle HUILLARD

Inserm U1127 - CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle, PARIS

S. Archontidi^{1,2}, C. Marie¹, C. Gimonet¹, C. Parras¹, M. Sanson^{1,3}, E. Huillard¹

1. Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Sorbonne Université, Inserm, CNRS, UMR S 1127), Paris, France ; 2. Faculté de Médecine - Université Paris Sud XI, Kremlin-Bicêtre, France ; 3. AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurologie 2-Mazarin, Paris, France

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives malignes les plus fréquentes chez l'adulte. L'origine et la croissance tumorale de ces tumeurs sont attribuées aux cellules avec des caractéristiques de progéniteurs neuraux ou de précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs). De nombreuses altérations génétiques ont été découvertes dans les gliomes; cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur développement sont moins caractérisés. Outre les altérations fréquemment trouvées, des études récentes ont identifié des mutations inactivatrices du gène *TCF12* dans des gliomes, associées à des tumeurs plus agressives. *TCF12*, codant pour un facteur de transcription de la famille bHLH, est exprimé de manière aberrante dans plusieurs cancers et peut jouer des rôles d'oncogène ou de gène suppresseur de tumeurs.

Le but de ce projet est de déterminer les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de *TCF12* sur les cellules d'origine potentielles des gliomes, ainsi que sur la croissance tumorale. Nous avons étudié

l'expression de la protéine *TCF12* dans le lignage oligodendrocytaire dans le cerveau de souris à des âges différents et nous avons observé une expression élevée corrélée avec une différenciation oligodendrocytaire. Pour caractériser les conséquences de l'inactivation de *TCF12*, nous avons développé un modèle murin permettant d'inactiver *TCF12* dans les OPCs de façon temporelle (*PDGFraCreERT; Tcf12fl; RosaYFP*). Dans ce modèle, nous avons observé un défaut de prolifération des OPCs lorsque *TCF12* est inactivé dans le cerveau postnatal et adulte. Afin d'identifier les voies moléculaires et gènes cibles de *TCF12* dans les progéniteurs neuraux et les OPCs, nous avons initié la caractérisation des sites de liaison de *TCF12* sur le génome (ChIPseq) et des études transcriptomiques (RNAseq). Enfin, afin d'évaluer le rôle de *TCF12* dans la gliomagenèse, nous procédons à l'inactivation de *TCF12* dans deux modèles murins de gliomes.

L'ensemble de ces travaux permettra de comprendre l'implication de *TCF12* dans le développement glial et la gliomagenèse.

Références

Labreche, K. et al. *TCF12* is mutated in anaplastic oligodendroglioma. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms8207

Abstract 004

Rôle des histones désacétylases dans la réponse aux thérapies dans les cancers gastriques

Amandine BADIE – 1^{ère} année de thèse 2018

Amandine BADIE, Christian GAIDON et Georg MELLITZER

Introduction. Le cancer gastrique (CG) est un problème de santé publique. Il représente la troisième cause de mortalité liée au cancer dans le monde. La stratégie thérapeutique actuelle est la chirurgie associée à la chimiothérapie à base des dérivés de platine (oxaliplatine, cisplatine) cependant, le développement de nombreux mécanismes de résistance entraîne une efficacité réduite de cette dernière. Ainsi, le développement de nouvelles thérapies est nécessaire. Dans le cadre du CG, une première immunothérapie ciblant un point de contrôle immunitaire a été approuvée en septembre 2017 par la FDA (le pembrolizumab, un anticorps anti-PD-1) néanmoins moins de 18% des patients sont répondeurs. Une solution pourrait consister à augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales par l'induction d'une mort cellulaire immunogène (MCI). Dans ce contexte, les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) présentent un intérêt puisqu'ils augmentent, dans certains types de cancers, l'expression du ligand de points de contrôle PD-L1 et entraînent l'exposition à la membrane de la calréticuline, premier signal impliqué dans la MCI.

Objectif. Nous souhaitons déterminer si les HDAC et leurs inhibiteurs peuvent améliorer l'efficacité des traitements actuels (chimiothérapie, immunothérapie) en régulant les points de contrôle immunitaire et en induisant la MCI dans le CG.

Matériel et Méthode. Deux lignées cellulaires issues de cancer gastrique, les cellules AGS présentant une forme sauvage de P53 et les cellules NUGC-3 présentant un P53 mutant, sont traitées avec l'oxaliplatine et le SAHA (vorinostat), un HDACi, administrés seul ou en combinaison. D'une part, différents points de contrôle immunitaire sont analysés par RT-qPCR et western blot, d'autre part, l'induction de DAMP, première étape de la MCI, est étudiée dans un premier temps par immunofluorescence.

Résultats. De manière générale, l'oxaliplatine et le SAHA, administrés seuls ou en combinaison, augmentent l'expression de trois ligands de points de contrôle immunitaire dont PD-L1. De plus, le traitement combiné oxaliplatine/SAHA induit davantage l'expression de PD-L1 que lors des traitements individuels. Par ailleurs, il semble que P53 soit impliqué dans l'expression des ligands des points de contrôle étudiés. Concernant l'étude des DAMP, l'oxaliplatine et le SAHA semblent induire l'exposition à la membrane de la calréticuline et d'HSP90 et ce de manière plus importante lors du traitement combiné.

Conclusion. Ces résultats suggèrent que l'oxaliplatine et le SAHA modulent différemment l'expression de plusieurs ligands de points de contrôle immunitaire ainsi que l'émission de certains DAMP.

Abstract 005

L'immunothérapie adjuvante ciblant le ganglioside GD2 O-acétylé permet de contourner la résistance à la chimiothérapie induite par les cellules souches de glioblastome

Meriem BAHRI – 1^{ère} année de thèse 2016

Directeur de thèse : Stéphane BIRKLE

CRCINA, INSERM, Université Angers, Université de Nantes, NANTES

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *International Journal of Cancer*.

Contexte et objectifs. Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale maligne primaire la plus fréquente chez l'adulte et la survie à 5 ans est inférieure à 10%. Le traitement actuel est composé d'une résection chirurgicale maximale, d'une radiothérapie et chimiothérapie concomitante, suivie d'une chimiothérapie adjuvante. L'agent chimiothérapeutique Temodal (témozolomide, TMZ) est actuellement

utilisé dans le cadre de ce traitement en première intention. Malgré ce traitement multimodal, la survie globale ne dépasse pas 15 mois, avec un taux élevé de récurrence de la tumeur. Cette récurrence est en grande partie due aux cellules souches de glioblastome (CSG), responsables de la résistance au TMZ. Par conséquent, il existe un besoin clair et urgent d'une thérapie initiale plus efficace. Nous avons identifié un dérivé O-acétylé du ganglioside GD2, à savoir le GD2 O-acétylé (GD2OAc), comme nouvel antigène cible pour l'immunothérapie du GBM par des anticorps monoclonaux (AcM).

Les mécanismes par lesquels l'AcM anti-GD20Ac 8B6 induit la mort des cellules tumorales de GBM sont médiés par une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et une cytotoxicité dépendante du complément. Nous avons cherché à développer une nouvelle approche thérapeutique pour surmonter la résistance au TMZ des CSG en utilisant l'AcM 8B6 spécifique du ganglioside GD20Ac.

Méthodes. Nous avons utilisé plusieurs modèles de culture primaires de glioblastome, y compris des modèles composés de CSG, caractérisés par une sensibilité différente aux TMZ. Nous avons d'abord testé les cultures primaires pour l'expression du GD20Ac. Nous avons ensuite évalué l'effet sur la mort cellulaire des cellules de GBM et la capacité de renouvellement des CSG, *in vitro* et *in vivo*, en présence du TMZ seul ou en association avec l'AcM 8B6.

Résultats. Nous montrons premièrement que les CSG expriment le marqueur gangliosidique tumoral GD20Ac, et ce indépendamment de leur statut de résistance au TMZ. *In vitro*, la thérapie combinée inhibe de manière synergique la viabilité des cellules de GBM et des CSG dans tous les modèles cellulaires testés. La combinaison de l'AcM 8B6

au TMZ augmente considérablement la mort des cellules tumorales et compromet les capacités d'auto-renouvellement des CSG. Cette combinaison AcM 8B6+TMZ est également plus efficace *in vivo* que le TMZ seul. En outre, la combinaison AcM 8B6+TMZ empêche l'extension du pool de CSG résistantes au TMZ au sein des tumeurs.

Conclusion. Nos résultats montrent pour la première fois que l'AcM 8B6 cible les cellules de GBM ainsi que les CSG de manière à contrôler la résistance au TMZ induite par ces dernières. Ces données fournissent une nouvelle approche thérapeutique et pertinente qui pourrait améliorer la prise en charge standard actuelle des patients atteints de GBM.

Abstract 006

CD163 and IL-4R α expressing TAMs as potential therapeutic targets in melanoma

Elodie BAUDOIN – 4^e année de thèse 2019

Elodie BAUDOIN, ^{1,2}Anders ETZERODT, ¹Nathalie AUPHAN-ANEZIN*, ¹Toby LAWRENCE*

¹Centre d'Immunologie de Marseille - Luminy (CIML) - Aix-Marseille University, INSERM U1104, CNRS UMR7280, Parc scientifique et technologique de Luminy-163, avenue de Luminy - Case 906 - 13288 Marseille cedex 09 - France

²Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark

*corresponding authors:

auphan@ciml.univ-mrs.fr; lawrence@ciml.univ-mrs.fr

Tumour-associated macrophages (TAM) play important roles in malignant progression and evasion of anti-tumour immunity. However, TAM are phenotypically heterogeneous and the question remains

on how specific TAM subsets contribute to tumour progression. Interestingly, the abundance of one TAM subset, expressing CD163 has been correlated to a poor prognosis in several human cancers. In a BRAF-driven mouse melanoma model, we have shown that CD163+ TAMs express transcripts related to immune suppression including *il10* and *il4ra*. We also showed that the IL-4R α signalling pathway is significantly activated in TAMs as compared to steady state macrophages. Importantly, we demonstrated that both CD163 and IL-4R α expressing TAMs exert a tumour-promoting role for melanoma: as such, specific depletion of CD163+ TAMs reprograms tumour-infiltrating monocytes and reinvigorate tumour-specific CD8 T-cells. We are now investigating how IL-4R α signalling modulates TAM heterogeneity and functions in this melanoma mouse model.

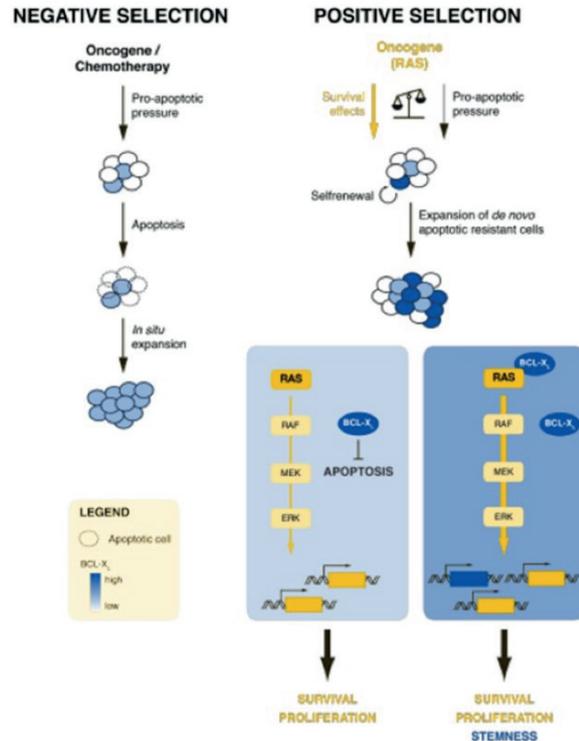


Abstract 007

Modulation de l'activité de l'oncogène KRAS par BCLxL : aspects mécanistiques et implications thérapeutiques

Nina-Maya BELAID – 1^{ère} année de thèse 2018
INSERM UMR 1232 - CRCINA Nantes

L'échappement à la mort des cellules cancéreuses soumises à une chimiothérapie est permis par leur capacité d'adaptation via la régulation de l'expression des protéines telles que celles appartenant à la famille BCL-2. Parmi elles, les anti-apoptotiques tels que BCL-xL, sont fréquemment retrouvés surexprimés dans les cellules cancéreuses résiduelles ou les cellules cancéreuses dites agressives, influençant ainsi la résistance aux traitements en modulant certains processus cellulaires en faveur de la survie. Ainsi, hormis son rôle largement décrit dans l'apoptose, de récents travaux ont identifié un rôle non canonique de BCL-xL, qui, collaborant avec un autre oncogène impliqué dans de nombreux cancers, l'oncogène KRAS, participe à l'apparition de cellules présentant des caractéristiques « souches ». Ces cellules ont la particularité de s'auto-renouveler et d'initier de nouvelles tumeurs. Elles participent donc activement aux phénomènes de rechute après traitement. Mes travaux de recherche portent sur la caractérisation de la mécanistique moléculaire de cette collaboration étroite dans le but de développer un inhibiteur efficace contre la transformation de cellules cancéreuses résiduelles en cellules souches cancéreuses particulièrement aptes à former des métastases et à entraîner l'échec de la thérapie.



Abstract 008

Identification d'un nouveau marqueur de CTCs : CD44v6

Guillaume BELTHIER – 4^e année de thèse 2019

Guillaume Belthier¹, Fanny Grillet¹, Christophe Duperray², Julie Vendrell³, Ilona Krol⁴, Sophie Bravo⁵, Jean-Christophe Boyer⁵, Olivia Villeronce¹, Jihane Vitre-Boubaker¹, Diana Heaugwane¹, Jean-Marc Pascussi¹, Françoise Macari-Fine¹, Emilie Mamessier-Birnbaum⁶, François Bertucci⁶, Matthieu Merlot⁷, Thibault Mazard⁷, Fabienne Portales⁸, Jérôme Solasso³, Marc Ychou⁷, Nicola Aceto⁴, Emmanuelle Samalin⁷, Frédéric Hollande⁸ and Julie Pannequin^{1*}

¹ IGF, UMR5203 CNRS, U1191 INSERM et UM, Montpellier, France

² Plateforme de cytométrie, IRBM, Montpellier Rio Imaging, Montpellier, France.

³ Laboratoire de biologie des tumeurs solides, CHU de Montpellier, UM, France.

⁴ Département de bio-médecine, laboratoire des métastases, Université de Bâle et CHU de Bâle, Bâle, Suisse.

⁵ Laboratoire de Biochimie, CHU Carêmeau, Nîmes, France

⁶ Département Oncologie prédictive, laboratoire des cellules tumorales circulantes et métastases, Centre de Recherche contre le Cancer de Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France

⁷ Département Oncologie, ICM-Val d'Aurelle Institut cancer de Montpellier, Montpellier, France

⁸ Département des pathologies clinique, Centre de recherche contre le cancer, Université De Melbourne, Melbourne, Australie.

Contexte et objectifs. Les cellules tumorales circulantes (CTCs) sont des outils diagnostiques et pronostiques prometteurs. Pour plusieurs cancers, dont le cancer colorectal (CRC), le nombre de CTC était associé à la survie globale. Cependant, les méthodes de comptage doivent être optimisées et l'identification de marqueurs spécifiques des CTCs devient un besoin urgent. Au cours d'une étude précédente,

nous avons établi pour la première fois plusieurs lignées de CTCs à partir de sang de patients avec un cancer colorectal métastatique et nous avons montré que le marqueur membranaire CD44v6 était spécifiquement et très fortement exprimé par les CTCs.

L'objectif de ce travail a été de démontrer que le marqueur CD44v6 pouvait être un nouvel outil non seulement pour compter mais aussi pour isoler des CTCs dans le sang de patients.

Méthodes. Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre le marqueur CD44v6 afin de détecter et/ou isoler des CTCs selon deux approches différentes : des colonnes magnétiques de séparation cellulaire ou de la cytométrie en flux. Les tests préliminaires ont été réalisés à partir de sang de patients sains provenant de l'EFS puis nous avons testé nos deux approches sur du sang de patients avec un cancer colorectal. Enfin, nous avons quantifié l'expression de notre marqueur sur des lignées établies de CTCs mammaires avant d'explorer également la présence de CTCs exprimant CD44v6 dans d'autres types de cancer.

Résultats. Nos optimisations sur du sang de donneurs sains nous ont permis de détecter et d'isoler des CTC à partir de sang de patients avec un CRC avec les deux approches. Des analyses moléculaires des CTC triées ont permis de confirmer leurs origines colorectales et tumorales. De plus, la très grande majorité des CTC mammaires établies expriment CD44v6 et cette expression est retrouvée dans les CTC d'autres cancers tels que l'œsophage ou le sein.

Conclusion. Ces travaux permettent d'identifier CD44v6 comme un marqueur spécifique des CTCs isolées à parti du sang de patients avec un cancer du côlon mais aussi d'autres cancers. A terme, il pourrait s'avérer être un marqueur de CTC pan-cancer.



Abstract 009

Rôle du variant *de novo* dans CABIN1 et de la mutation somatique dans KRAS chez un patient avec un déficit immunitaire et un syndrome lymphoprolifératif

Marta BENAVIDES-NIETO – 1^{ère} année de thèse 2018

Marta Benavides-Nieto^{1,2}, Jean-François Emile^{3,4}, Guillaume Morelle^{2,5}, Frédérique Delion⁶, Martin Castelle⁵, Charlotte Boussard^{2,5}, Agathe Escudier⁵, Thomas Blauwblomme^{2,7}, Thierry Molina^{2,8}, Julie Bruneau^{2,8}, Jean-Pierre de Villartay^{1,2}, Stéphane Blanche^{2,5}, Despina Moshous^{1,2,5}

1- Laboratoire « Dynamique du génome et du système immunitaire », INSERM UMR1163, Institut Imagine, Paris ; 2- Université Sorbonne Paris Cité (USPC) - Paris Descartes, Paris. 3- Service de Pathologie, Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Boulogne-Billancourt ; 4- EA4340, Biomarqueurs en Cancérologie et Onco-Hématologie, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Boulogne-Billancourt ; 5- Unité d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie pédiatriques (UIHR), Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris ; 6- Service de Pédiatrie, Hôpital Universitaire de Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe ; 7- Service de Neurochirurgie Pédiatrique, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris ; 8- Service de Pathologie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris.

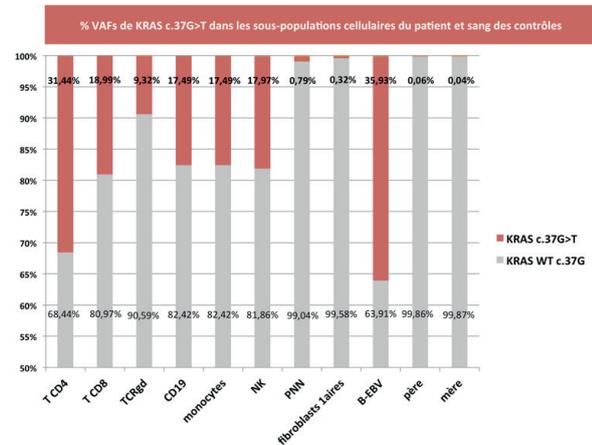
Contexte. Un garçon s'est présenté à l'âge de 3 mois un tableau avec neutropénie, anémie, thrombopénie, lymphopénie T avec diminution du pourcentage de lymphocytes T naïfs et hypogammaglobulinémie. Le séquençage de l'exome n'a mis en évidence aucune mutation dans un gène associé aux immunodéficiences primaires, mais a révélé la présence d'un variant hétérozygote *de novo* (c.6441G>C, p.E2147D) dans le gène codant pour la protéine de liaison à la calcineurine 1 (CABIN1). Ce variant, jamais décrit auparavant, est prédit comme délétère (CADD score 28, Polyphen 0.994, SIFT 0.02). CABIN1 est un régulateur négatif pour la signalisation de la calcineurine impliqué dans la lymphoprolifération T, mais aussi un régulateur négatif direct du suppresseur de tumeur p53 ce qui pourrait induire une instabilité génomique.

À 12 mois, le patient a développé une macrocéphalie accompagnée d'un épanchement cérébral et d'une atrophie cérébrale, un syndrome lymphoprolifératif, une hypergammaglobulinémie. Une clonalité des lymphocytes T a été retrouvée dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse (MO). La biopsie d'un ganglion lymphatique cervical a montré des caractéristiques histologiques du syndrome de Rosai-Dorfman. Une mutation somatique dans KRAS (c.37G>T p.Gly13Cys) a été détectée dans des ganglions et le sang total avec une fréquence allélique (VAF) de 10-30% et 14%, respectivement. Cette mutation est déjà décrite pour ce syndrome ainsi que dans des cancers humains, des maladies lymphoprolifératives associées à RAS (RALD) et de syndrome de Noonan. KRAS est un oncogène qui code pour une protéine traductrice de GTPase impliquée dans la régulation de la division cellulaire.

Méthodes. Dans un premier temps, le séquençage haut débit (NGS) a permis de quantifier le VAF de KRAS c.37G>T dans les différentes populations cellulaires hématopoïétiques et permettra de détecter d'éventuels autres variants de KRAS identifié précédemment dans

différents syndromes lymphoprolifératifs et cancers. Pour étudier le phénotype cellulaire induit par ces mutations, des tests de sensibilité à différents agents génotoxiques ont été réalisés sur les fibroblastes et les PBMCs du patient pour mettre en évidence une possible instabilité génomique.

Résultats. La mutation c.37G>T KRAS a été retrouvée dans toutes les types cellulaires testés à des fréquences variables mais absente de l'ADN génomique des cellules sanguines des parents. La lignée immortalisée B-EBV ainsi que les populations T CD4, T CD8 et NK présentent les VAFs les plus élevées suggérant un avantage sélectif du variant dans ces lignées.



Les fibroblastes SV40 du patient, portant le variant *de novo* dans CABIN1, montrent une sensibilité modérée à la Phleomycine mais pas à la Mitomycine C. L'induction de cassure double brins par irradiation dans les PBMCs du patient n'a pas révélé d'augmentation de l'instabilité génomique après quantification des foci 53BP1, mais ce pourrait être du à la faible fréquence de la mutation dans ces cellules diluant l'effet de ce variant.

Discussion. L'association de la mutation KRAS et du variant CABIN1, participant à la même voie de carcinogenèse, pourrait contribuer au phénotype lymphoprolifératif et au développement du syndrome de Rosai Dorfman du patient. Le rôle précis de ces facteurs dans l'immunité, stabilité du génome et le cancer du génome reste à être élucidé.

Abstract 010

Cibler les molécules inhibitrices de la signalisation intracellulaire «CISH» dans les cellules Natural Killer

Pierre-Louis BERNARD – 1^{ère} année de thèse 2019

Bernard, P.L. (auteur de la présentation)¹, Goubard, A.², Josselin, E.², Castellano, R.², Vivier, E.³, Guittard, G.1 and Nunès J.A1

1. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Equipe Immunité et Cancer, Institut Paoli-Calmettes, Inserm, CNRS, Aix Marseille Université, Marseille, France. 2 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Plateforme d'essais précliniques TrGET, Institut Paoli-Calmettes, Inserm, CNRS, Aix Marseille Université, Marseille, France. 3 Innate Pharma, 117 Avenue de Luminy, 13009 Marseille, France.

Contexte & objectif. L'immunothérapie vise à mobiliser les défenses immunitaires du patient contre ses cellules malignes et représente un espoir sans précédent dans le traitement des cancers. Ces nouveaux traitements ciblent en majorité les cellules du système immunitaire dites cytotoxiques : les lymphocytes T CD8+, les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules NK. Il est primordial de comprendre comment fonctionnent ces lymphocytes pour pouvoir potentialiser leurs fonctions anti-tumorales.

Notre équipe s'intéresse à la protéine intracellulaire inhibitrice CISH (Cytokine-Inducible SH2-containing protein). Un chercheur de l'équipe a montré que l'absence de CISH favorise les fonctions antitumorales des lymphocytes T CD8+ (Palmer*, Guittard*, et al. JEM 2015). Cette étude a permis la mise en place d'un essai clinique de phase I/II (NCT03538613) où le gène CISH est ciblé par CRISPR-Cas9 dans des lymphocytes infiltrés au niveau de la tumeur (TILs) de patients avec un cancer gastro-intestinal

Il faut étendre cette preuve de concept à d'autres cellules cytotoxiques (cellules NK), en analysant le rôle des molécules intracellulaires inhibitrices de signalisation pour optimiser les fonctions anti-tumorales de ces lymphocytes. Notre projet vise à :

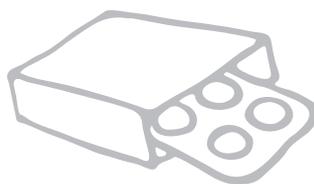
- i) Potentialiser la réponse anti-tumorale des cellules NK en ciblant Cish
- ii) Définir la place de CISH dans les voies de signalisation des cellules cytotoxiques (T/NK)

Méthodes. Pour répondre à ces questions, nous avons généré des souris Cish KO NK spécifique (CISH KO^{NK}). Le KO a été validé au niveau transcriptomique et protéique. Nous avons étudié le phénotype et l'homéostasie des cellules NK par cytométrie en flux et réalisé des tests fonctionnels in vitro (proliférations, expression cytokiniques). Les souris Cish KO^{NK} ont été utilisées pour évaluer les réponses NK dans différents modèles de cancer (Mélanome ; B16F10 et cancer de sein ; E0771).

Pour analyser avec précision le fonctionnement de Cish dans les voies de signalisation des lymphocytes cytotoxiques, le laboratoire s'est doté d'un modèle de souris KI pour le gène *Cish* permettant l'étiquetage OST (*One-STRIP-tag*) (plateforme Cipe, Marseille, Dir. Bernard Malissen). Cette étiquette facilite l'isolation de Cish et des protéines avec lesquelles elle interagit et permettra de mener des études en spectrométrie de masse.

Résultats & Discussion. La maturation et l'homéostasie des cellules NK est normale dans ce modèle. Les NK CISH KO possèdent un profil plus activé sous stimulations cytokiniques (IL-15), mais également sous stimulations des récepteurs activateurs, essentiels dans la reconnaissance d'une cellule tumorale. L'absence de CISH dans les NK limite, d'ailleurs, l'apparition de métastases dans un contexte de mélanome (B16F10) ou de carcinome mammaire triple négatif E0771 (GFP-luc). Suite à des greffes orthotopiques de cellules E0771 dans les glandes mammaires des souris normales ou CISH KO NK, nous montrons que l'absence de Cish au niveau des cellules NK engendre une baisse de la croissance tumorale primaire et de l'essaimage métastatique. Une augmentation de l'infiltration des cellules NK en absence de CISH est observée. Divers mécanismes sont explorés pour comprendre ces observations.

En parallèle nous avons validé l'expression de la protéine Cish-OST dans les cellules immunes de cette lignée. L'objectif est maintenant d'identifier les partenaires de CISH dans les voies de signalisation des lymphocytes cytotoxiques. A l'avenir, nos investigations seront doublées dans des modèles humains Cish-OST et CISH KO.



Abstract 011

Caractérisation et quantification cellulaire de la délivrance des vésicules extracellulaires dans les cellules receveuses

Émeline BONSERGENT – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Grégory LAVIEU

Inserm U932, Institut Curie, PARIS

BONSERGENT Émeline^{ab}, GRISARD Eleonora^a, BUCHRIESER Julian^c, SCHWARTZ Olivier^c, THÉRY Clotilde^a, LAVIEU Grégory^a

^a Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris, France

^b Université de Paris, Paris, France

^c Institut Pasteur, CNRS-UMR3569, Department of Virology, Paris, France

Les vésicules extracellulaires (EVs) sont des vecteurs de communication intercellulaire sécrétés par toutes les cellules. Les EVs permettent l'échange de biomolécules (protéines, acide nucléiques ou lipides) entre cellules donneuses et receveuses, ce qui leur confère un rôle dans des phénomènes physiologiques ou pathologiques variés, notamment les cancers. Ces vésicules pourraient donc être utilisées comme vecteurs thérapeutiques anti-tumoraux.

Pour atteindre cette utilisation thérapeutique, il est nécessaire de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la prise en charge des EVs par les cellules receveuses. Beaucoup reste à définir à ce sujet : le lieu de la libération finale du contenu vésiculaire dans la cellule receveuse, l'efficacité de ce processus et les molécules impliquées.

Nous avons récemment développé un test *in vitro*¹ qui suggère que la libération du contenu vésiculaire s'effectue par l'intermédiaire de compartiments endosomaux, une voie aussi utilisée par certains virus pour leur réplication. Nous voulons valider ces résultats avec un modèle cellulaire et quantifier précisément ces mécanismes au sein de cellules vivantes.

Nous avons généré un test cellulaire, pour tout d'abord identifier les points d'entrée et de libération du contenu vésiculaire dans les cellules receveuses, puis pour quantifier l'efficacité de cette prise en charge.

Nous avons produit des cellules qui sécrètent des EVs contenant la protéine Hsp70 (marqueur générique des EVs) fusionnée avec soit une luciférase, dont l'activité est détectable en luminométrie, soit la GFP (*Green Fluorescent Protein*), détectable en microscopie. Après isolation par ultracentrifugation, les EVs sont incubées avec des cellules receveuses et leur devenir est suivi soit par luminométrie, soit par fluorescence. Le fractionnement des cellules receveuses permet de séparer leurs fractions membranaires et cytosoliques. L'activité luciférase mesurée dans cette dernière permet de quantifier la fraction de contenu vésiculaire libérée dans le cytosol des cellules receveuses.

L'imagerie confocale a montré qu'une partie des EVs est internalisée dans des compartiments endosomaux et peut parvenir aux lysosomes. La prise en charge d'EVs contenant de la luciférase révèle une efficacité de 1% d'EVs associées aux cellules receveuses en 1h, dont 30% du contenu est retrouvé dans leur cytosol. Cette libération cytosolique nécessite l'acidification des endosomes et est inhibée lors de l'expression d'inhibiteur d'entrée virale (protéines IFITM), qui bloquent la fusion membranaire.

Nos résultats démontrent que la libération du contenu d'EVs dans le cytosol des cellules receveuses se produit par l'acidification de compartiments endosomaux et pourrait dépendre d'un événement de fusion membranaire.

1 : Bonsergent, E. and Lavieu, G. (2019), Content release of extracellular vesicles in a cell-free extract. *FEBS Lett*, 593: 1983-1992. doi:10.1002/1873-3468.13472

Abstract 012

La leucémie aigüe myéloïde murine altère la réponse des cellules Natural Killer à l'interleukine-15

Berna BOU TAYEH – 4^e année de thèse 2019

B. Bou Tayeh¹, V. Laletin¹, J. Fares¹, R. Leblanc^{1,9}, Herault², D. Olive¹, J. Nunes¹, M. Aurrand-Lions¹, C. Fauriat¹.

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille University, UM 105, Marseille, France

² CNRS UMR 7292, LNOx Team, François Rabelais University, Tours, France

Contexte et objectifs : La leucémie aigüe myéloïde (LAM) est une pathologie qui demeure mortelle malgré le progrès dans son traitement. Ceci est dû à l'échappement des cellules leucémiques à la chimiothérapie, mais aussi à la défense immunitaire. Parmi les stratégies d'échappement à l'immunité, plusieurs études, incluant nos travaux précédents au laboratoire, ont montré des altérations

phénotypiques et fonctionnelles des cellules immunitaires Natural Killer (NK) affectant ainsi le pronostic des patients. Bien que l'observation de ces altérations soit faite chez les patients atteints de LAM, l'étude des mécanismes mis en jeu par la leucémie pour échapper aux cellules NK nécessite d'avoir recours à des modèles murins. Dans notre étude, nous avons utilisé deux modèles murins de LAM afin de comprendre ces mécanismes.

Méthodes : Le premier modèle consiste en une injection de cellules leucémiques murines FLB1 dans des souris C57Bl/6J, ce qui donne lieu à une pathologie mimant les principales caractéristiques de la LAM humaine. Le deuxième modèle est induit génétiquement par une surexpression de la translocation MLL-AF9, également décrite dans certaines LAM humaines. Suite à la progression leucémique, les cellules NK ont été isolées, dans certaines expériences stimulées par des cytokines et/ou par des cellules cibles, et analysées par cytométrie en flux.

Résultats : Premièrement, nous avons validé la pertinence de nos modèles d'étude. Suite à la progression leucémique chez la souris, nous avons montré que les cellules NK présentent des défauts de maturation et fonctionnelles similaires à ceux décrits chez les patients. Afin de mieux comprendre les mécanismes de ces altérations,

nous avons étudié la voie de signalisation de l'Interleukine 15 (IL-15), régulateur important de la maturation et l'activité métabolique et cytotoxique des cellules NK. Ainsi, nous avons montré que les cellules NK des souris leucémiques répondent moins bien à une stimulation par l'IL-15 *in vitro*. De plus, ces cellules sous-expriment les récepteurs à l'IL-15 présentés à leur surface. Ensuite, nous avons activé les cellules NK *in vivo* et montré qu'elles présentent une activité métabolique réduite. Enfin, nous avons examiné la capacité de l'IL-15/IL-15R α , complexe formé par la cytokine IL-15 associée à la chaîne α de son récepteur, à restaurer la signalisation IL-15 dans les cellules NK des souris leucémiques. Bien que ce complexe soit capable d'activer plus fortement les cellules NK comparé à l'IL-15 seule, les cellules NK des souris leucémiques maintiennent un niveau de réponse inférieur à celui des souris contrôles.

Discussion : Nos données suggèrent que la progression leucémique chez la souris induit une réduction de leur réponse à l'IL-15, ce qui se traduit par une réduction de leurs capacités métaboliques et fonctionnelles. La confirmation de ces nouvelles données chez les patients atteints de LAM est en cours au laboratoire. Notre étude suggère que la réponse à l'IL-15 est réduite dans la LAM, ce qui peut limiter l'efficacité des stratégies utilisant l'IL-15 pour le traitement de cette pathologie.

Abstract 013

Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs d'HSP110

Vincent CABAUD GIBOUIN – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Carmen GARRIDO

Inserm UMR1231, Centre de Recherche «Lipides, Nutrition, Cancer», DIJON

Introduction. Lors de la transformation maligne, les cellules tumorales acquièrent une dépendance biologique aux protéines de stress dont les protéines de choc thermique (HSPs). Les HSPs sont des protéines chaperonnes hautement conservées qui contrôlent un large éventail de fonctions cellulaires. HSP110, une HSP de hauts poids moléculaires dotés de propriétés anti-agrégative, joue un rôle majeur dans la prolifération des cellules cancéreuses. L'identification et la validation d'inhibiteurs d'HSP110 constitue un objectif prioritaire de mon équipe. Grâce à une stratégie de criblage d'une chimiothèque du CERMN, trois molécules ont été mises en évidence. Mon objectif est de valider l'activité, l'efficacité et la spécificité anti-tumorale de ces molécules inhibitrices d'HSP110 dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé (ABC-DLBCL).

Méthode. J'ai testé l'effet des trois inhibiteurs sur la croissance cellulaire *in vitro* et sur l'expression des molécules anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL. Afin d'étudier leurs mécanismes d'action, j'ai étudié leurs effets sur la voie NF- κ B et sur la voie du BCR, deux voies qui contrôlent la croissance dans ce lymphome. Ces voies dépendent en partie de la protéine MyD88 et j'ai donc mis en place des expériences de co-IP afin d'explorer l'effet de ces inhibiteurs sur l'interaction HSP110-MyD88. Enfin, afin de tester l'efficacité *in vivo* des inhibiteurs d'HSP110, j'ai mis au point une expérience de xélogreffe en sous-cutané de cellules de lymphome chez des souris NSG. Deux doses d'inhibiteurs ont été injectées tous les 3 jours après détection de la tumeur.

Résultats. J'ai pu montrer que les inhibiteurs bloquent l'interaction d'HSP110 avec MyD88 ainsi entraîne une baisse de la croissance et de la survie cellulaire. J'ai aussi observé une baisse de l'expression de BCL-2 et BCL-XL qui jouent un rôle essentiel dans la survie de ces cellules. J'ai pu montrer que les inhibiteurs réduisent l'activation de la voie NF- κ B et de l'oncogène MyD88^{L265P} mais également de phospho-BTK et phospho-PLC γ 2 impliquées dans la voie du BCR. Chez les souris NSG, j'ai observé un ralentissement important et significatif du développement tumoral de façon dose dépendante sans toxicité pharmacologique.

Discussion. Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs perturbent les mécanismes de survie essentiels des cellules menant ainsi à la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il reste à découvrir à quel niveau HSP110 interagit dans la voie du BCR. Ces inhibiteurs d'HSP110 seront combinés avec un inhibiteur commercial de BTK (ibrutinib) lors d'expériences de survie sur les lignées de lymphome sensibles ou résistantes à l'ibrutinib. Les inhibiteurs d'HSP110 seuls ou en combinaison avec l'ibrutinib seront injectés *in vivo* et la croissance tumorale ainsi que la survie des animaux seront suivies. Après sacrifice, l'expression de protéines de signalisation sera déterminée. Ces expériences seront répétées sur un modèle murin d'ABC-DLBCL.

Abstract 014

Fonction et régulation de l'ADN polymérase spécialisée eta dans la stabilité des régions intrinsèquement difficiles à répliquer

Alice CAHN – 4^e année de thèse 2019Directeur de thèse : Patricia KANNOUCHE
CNRS UMR 8200, Gustave Roussy, VILLEJUIF

CONTEXT AND OBJECTIVES. Complete and accurate DNA replication is crucial to transfer correct genetic information to the daughter cells. Various obstacles can interfere with the progression of the replication machinery, threatening genome integrity. Specialized error-prone translesion DNA polymerases (TLS pol) assist the replicative pol to replicate across DNA lesions. The aim of my PhD project is to determine the dynamics and regulation of the TLS pol η recruitment to replication forks and to characterize its contribution to DNA replication in normal growth conditions. Pol η was best characterized for its ability to accurately bypass UV-induced DNA lesions and is mutated in the skin cancer-prone *Xeroderma Pigmentosum* variant syndrome (XPV). Despite its error-proneness on undamaged DNA, pol η was shown to promote the stability of the common fragile sites (CFSs) and associates with the replisome during unchallenged replication. However, the kind of replication barriers it acts on and its footprint on the genome are currently unclear. This project should thus provide new insights on the function of TLS pol, and will help to better understand the origins of somatic mutations, which fuel tumorigenesis and ageing.

METHODS. Using XPV fibroblasts complemented with pol η , I studied the accumulation of pol η throughout the S-phase, and its proximity to replisome components. We then performed a genome-wide analysis of the replication timing in order to assess the impact of pol η deficiency on the replication timing. Finally, Proximity ligation assays (PLA) allowed us to examine the proximity between the replication and transcription machineries.

RESULTS. First, using immunofluorescence, I show that pol η accumulates in a subset of replication foci all along the S-phase and mainly in mid S-phase. Interestingly, pol η proximity with replisome is enriched in early and mid S-phase. Moreover, I establish that pol η SUMOylation and its regulator Rad18 are critical for its association to

nascent DNA throughout S-phase. Genome-wide analysis of temporal DNA replication program led us to identify 196 regions spanning 9.2% of the genome, for which replication timing varies in XPV cells compared to their complemented counterpart. Interestingly, perturbations can be observed at loci replicating throughout S-phase, but are enriched in regions containing large transcribed genes (>400 kb). Finally, we observe that the proximity between the replisome and the RNA polymerase II is increased in absence of pol η . Moreover, pol η accumulation in a subset of replication foci is transcription dependent, as it decreases upon transcription inhibition.

DISCUSSION. We show that pol η is present at replication forks throughout the S-phase in a SUMO-dependent manner. Given its larger catalytic site and its ability to replicate DNA secondary structures in vitro, we suggest that pol η role is not limited to the late-replicating CFSs, but it can help bypassing barriers arising all along S-phase.

Although replication and S-phase transcription are compartmentalized in eukaryotic cells, which limits chances that the two machineries encounter, transcription/replication conflicts (TRC) are potent threats for genome stability, particularly for long genes because they need time to be transcribed. We observed a modification in the replication timing in absence of pol η in regions containing large transcribed genes, as pol η accumulation is transcription dependent we suggest that pol η could be involved in resolving or preventing TRCs. The increased proximity between the replication and transcription machineries in absence of pol η further support this hypothesis. However, the mechanisms underlying its recruitment to TRCs still remain to be determined. Examining the contribution of pol η to the replication of large transcribed genes-containing regions will shed new light on pol η function. It is moreover particularly relevant to the understanding of the determinants of chromosome fragility.

Abstract 015

DAXX contribue à l'organisation de l'hétérochromatine et protège l'intégrité génomique des cellules pluripotentes

Antoine CANAT – 4^e année de thèse 2019Directeur de thèse : Emmanuelle FABRE
CNRS UMR7212, Inserm U944, Institut de Recherche St Louis, PARIS

Antoine Canat¹, Adeline Veillet¹, Yasmine Khalil¹, Emmanuelle Fabre¹ and Pierre Thérizols¹.

¹ Université de Paris, Laboratoire Génomes, Biologie Cellulaire et Thérapeutiques, CNRS UMR7212, INSERM U944, Institut de Recherche St Louis, F- 75010 Paris

L'hétérochromatine correspond aux régions transcriptionnellement éteintes du génome, et corrèle avec différentes modifications épigénétiques comme H3K9me2/3, HP1 α et la méthylation de l'ADN. Dans le noyau, les domaines de l'hétérochromatine ségrégent en

compartiments particuliers comme les chromocentres, contenant les centromères et péricentromères, ou les domaines associés à la lamina, localisés à la périphérie. Une perte de la répression de l'hétérochromatine peut mener à des pathologies, et des perturbations de la méthylation de l'ADN sont souvent observées dans de nombreux cancers ou dans le syndrome ICF (Immunodéficiency, instability Centromérique, anomalies Faciales). La formation des compartiments d'hétérochromatine se fait au cours du développement embryonnaire, en particulier au cours de la phase hypométhylée. Le variant d'histone H3.3 joue un double rôle, en régulant à la fois l'euchromatine, où il est déposé par HIRA, et l'hétérochromatine, où il est déposé par le complexe DAXX/ATRX. Ce complexe DAXX/ATRX change de localisation lors d'une perte de la méthylation de l'ADN dans les cellules pluripotentes, où il est alors recruté aux régions répétées télomériques. Cependant, son rôle à ces localisations reste obscur. De plus, les cellules pluripotentes ont la capacité de maintenir leurs compartiments d'hétérochromatine même en l'absence de méthylation. Dans cette étude, nous étudions le rôle de DAXX dans le maintien de l'hétérochromatine, particulièrement en conditions hypométhylées.

Nous cultivons les cellules souches embryonnaires (CSE) murines dans un milieu 2i dans lequel les cellules atteignent le niveau basal de pluripotence, qui induit une perte physiologique du niveau de méthylation de l'ADN. Nous avons généré des CSE déficientes pour

le gène Daxx grâce à la technologie CRISPR/Cas9. En utilisant une combinaison de techniques moléculaires et de microscopie, nous avons mesuré différentes marques de l'hétérochromatine et l'état transcriptionnel de ces cellules. Nous avons disséqué plus loin le rôle de DAXX en modifiant l'épigénome grâce aux technologies CRISPR/Cas9 et TALE.

Nous avons identifié la protéine DAXX comme un facteur essentiel pour la survie au niveau basal de pluripotence. Alors qu'en CSE, DAXX forme de petits foyers colocalisant avec les corps nucléaires PML, nous observons que durant une perte de méthylation de l'ADN, DAXX est fortement recruté aux régions péricentromériques. Ces foyers sont entourés par une coquille géante de protéines PML. Au niveau basal de pluripotence, les CSE accumulent des dommages à l'ADN, et en l'absence de DAXX, cette accumulation est encore augmentée. Nous observons que l'induction de dommages à l'ADN, même dans un milieu permettant la méthylation de l'ADN mène au recrutement de DAXX aux régions péricentromériques. Nous montrons également qu'en l'absence de DAXX, l'organisation globale de l'hétérochromatine est affectée. Cette perturbation mène à l'augmentation transcriptionnelle des gènes présents dans l'hétérochromatine et habituellement réprimés.

Notre étude a permis de découvrir un nouveau facteur impliqué dans l'organisation de l'hétérochromatine des CSE, la chaperonne DAXX, qui est essentielle pour la survie cellulaire au niveau basal de pluripotence.

Abstract 016

Gp96, a complement C3 chaperone, plays a critical role in alternative M2 macrophages

Killian CHAUMONNOT – 4^e année de thèse 2019

Chaumonnot K^{1,2}, Masson S^{1,2,4}, Sikner H^{1,2}, Bouchard A⁴, Baverel V^{1,2}, Collin B^{2,4,5}, Garrido C^{1,4} and Kohli E^{1,2,3}

1- UMR INSERM/uB/AGROSUP 1231, Equipe 3 HSP-Pathies, labellisée Ligue Nationale contre le Cancer et Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon, France

2- UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, Dijon, France

3- CHU, Dijon, France

4- Centre anti-cancéreux Georges-François Leclerc, Dijon, France

5- UMR uB/CNRS 6302, Institut de Chimie Moléculaire, Dijon, France

Contexte. La maladie du greffon contre l'hôte ou GvH est une complication majeure de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques utilisée pour traiter les hémopathies malignes. Elle fait suite à l'activation des lymphocytes T du donneur, présents dans le greffon, par les antigènes et les cellules dendritiques et les macrophages du receveur. Les traitements pour lutter contre la GvH sont essentiellement des immunosuppresseurs à l'origine de problèmes infectieux ou de rechutes tumorales. Des études ont montré que le système du complément et le stress du réticulum endoplasmique (RE) jouent un rôle important dans la physiopathologie de la GvH. Ils sont par ailleurs impliqués dans de nombreux autres processus pathologiques et dans la modulation des réponses immunitaires. Notre équipe a montré que la protéine de stress Gp96, une chaperonne importante du RE, est surexprimée et interagit avec le composant C3 du complément dans le sérum de patients GvH. Nos travaux ont pour but d'étudier l'impact de l'interaction entre Gp96 et C3 dans le contexte du stress du RE sur des macrophages de type M1 (pro-inflammatoires) et M2 (anti-inflammatoires), afin de mieux comprendre leur implication dans la GvH.

Méthode. Un modèle murin de GvH a été utilisé pour étudier le stress du réticulum au niveau intestinal. Nous avons par ailleurs utilisé comme modèle d'étude principal des macrophages dérivés de monocytes humains de donneur sains. Les macrophages ont été cultivés avec du GM-CSF ou du M-CSF pendant 6 jours, puis activés avec de l'IFN γ + LPS ou de l'IL-4 pour générer les macrophages M1 et M2, respectivement. Ils ont ensuite été traités avec des inducteurs du stress du RE (Thapsigargine et Tunicamycine) et dans certains cas avec un inhibiteur chimique de Gp96 (PU-WS13).

Résultats. Nous avons montré que les marqueurs du stress du RE, Gp96, BiP et la calréticuline, sont surexprimés dans l'intestin des souris développant une GvH. Nous avons pu mettre en évidence que le stress du RE fait évoluer le phénotype anti-inflammatoire des macrophages M2 (IL-4), sécrétteurs de TGF- β , vers un profil davantage pro-inflammatoire avec la sécrétion d'IFN γ , d'IL-6, et de TNF- α et ceci de manière dépendante de Gp96. De plus Gp96 interagit avec le complément C3 dans les macrophages, et cette interaction est modulée par le stress du RE. Nous avons également montré que le fragment inactivé de C3, iC3b, est présent à la surface des macrophages M2 et diminue en condition de stress du RE ou d'inhibition de Gp96.

Conclusion. Nos résultats mettent en évidence un rôle de l'interaction Gp96-C3 dans la polarisation des macrophages. Lors de la GvH, le stress du RE pourrait entraîner un changement de phénotype des macrophages anti-inflammatoires vers un profil pro-inflammatoire et entretenir l'inflammation au niveau de l'intestin. Finalement, ces travaux ouvrent une nouvelle piste de modulation de l'activité du complément via l'inhibition ou la surexpression de Gp96.

Abstract 017

La Mambaquarétine, une toxine de venin de mamba vert, nouvel antagoniste du récepteur V2 pour le diagnostic et le traitement potentiel du cancer rénal

Amélia CHORFA – 1^{ère} année de thèse 2018

Amélia Chorfa¹, Maïthé Corbani¹, Nicolas Gilles², Bernard Mouillac¹ et Christiane Mendre¹

1- Institut de Génomique Fonctionnelle, Université Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

2- Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, Commissariat à l'Energie Atomique, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France

Contexte et Objectifs : Le cancer du rein représente environ 3% de l'ensemble des cancers. Malgré les traitements actuels, le taux de survie après 5 ans chez les patients atteints d'un cancer rénal à un stade avancé est de seulement 8%. Le développement de nouvelles approches est donc nécessaire pour identifier de nouvelles cibles impliquées.

Le récepteur V2 de la vasopressine est exprimé au niveau du rein et son activation par la vasopressine induit l'effet antidiurétique par la production d'AMPc. Etant surexprimé dans les tumeurs rénales, ce récepteur pourrait être une cible thérapeutique intéressante. De plus, ses antagonistes spécifiques sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* chez la souris (1,2). Malheureusement, les antagonistes du récepteur V2 sur le marché actuel sont hépatotoxiques, c'est le cas du Tolvaptan. Il est donc nécessaire de développer d'autres outils thérapeutiques pour cette cible.

La Mambaquarétine (MQ) est une toxine peptidique issue du venin de mamba vert caractérisée dans notre laboratoire en tant qu'antagoniste sélectif du récepteur V2. Cette molécule est capable d'inhiber la formation de kystes rénaux dans un modèle *in vivo* de polykystose rénale chez la souris *pcy* (3).

Nos objectifs sont donc d'étudier l'effet de ce nouvel antagoniste V2, sur sa capacité à constituer un bon outil diagnostique d'identification

du récepteur sur des cellules cancéreuses rénales humaines et d'élargir l'indication de ses propriétés antagonistes en tant que potentiel outil thérapeutique dans le traitement du cancer rénal.

Méthodes : Avec différentes lignées cellulaires humaines de cancer rénal : ACHN, A498 et Caki-2, nous avons analysé l'expression du récepteur V2 dans ces lignées par marquage immunofluorescent avec la MQ fluorescente. Sur ces cellules, nous avons ensuite étudié l'effet inhibiteur de la MQ sur la signalisation AMPc induite par la vasopressine par un test AMPc en TR-FRET (Cisbio) et évaluer son effet sur la prolifération cellulaire avec le kit MTT (Roche).

Résultats : Nos expériences de marquage avec la MQ fluorescente montrent que le récepteur V2 est exprimé dans les lignées rénales cancéreuses. La MQ est également capable d'inhiber la production d'AMPc induite par la vasopressine dans les cellules cancéreuses rénales, et de diminuer de manière significative leur prolifération.

Discussion : Le récepteur V2 est une cible pertinente pour laquelle la MQ constitue un excellent outil de marquage spécifique du récepteur V2 et un potentiel outil thérapeutique pour le cancer du rein.

Des expériences de marquage sur tissu tumoral et sur l'animal entier ainsi que des essais thérapeutiques *in vivo* sur des modèles de xénogreffes, nous permettraient de valider que la MQ pourrait constituer un candidat très pertinent dans le traitement du cancer rénal.

1. Bolignano et al, Urologic. Oncology, 2009, 642-7

2. Sinha et al, Oncogene, 2019, 1059-0

3. Ciolek et al, PNAS, 2017, 7154-9

Abstract 018

Boron neutron capture therapy assisted by boron-enriched polysaccharide nanogels

Simon CONINX – 1^{ère} année de thèse 2018

S. Coninx^{1*}, V. Cosenza¹, G. Kalot², C. Goze³, L. Sancey², R. Auzély-Velty¹

1. Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble, France

2. Institute for Advanced Biosciences, Université Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble, France

3. Institut de Chimie Moléculaire, Université de Bourgogne, CNRS, Dijon, France *E-mail: simon.coninx@cermav.cnrs.fr

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is an innovative cancer treatment therapy derived from radiotherapy using low energy neutrons to create a fission reaction with a boron isotope: ¹⁰B. This reaction produces an alpha particle, a lithium ion and γ -radiation, causing selective damage to cancer cells (diameter of distraction: 15 μ m [1,2]). Currently, this treatment modality raises interest due to its accurate targeted action. Indeed, only ¹⁰B-containing cells will be destroyed during the irradiation time. Today, 2 boron-rich compounds

are being used in clinical BNCT trials: sodium borocaptate (BSH) and L-boronophenylalanine (BPA). However, these compounds do not demonstrate selective accumulation in tumor. Therefore, researches to find new compounds or carriers for these molecules are currently in progress. To overcome this issue, various strategies can be considered such as incorporation of boron into nanocarriers or by grafting boron to other molecules. Polysaccharides such as hyaluronic acid or heparosan self-assembled into nanogels seem to be interesting carrier candidates due to their biocompatibility, their biodegradability and especially their ability to accumulate in tumor[3,4]. The objective of this project is to encapsulate boron clusters in these polysaccharide nanosystems

to develop boron-rich nanocarriers for BNCT. BODIPY (fluorescent boron-containing molecule) was also encapsulated to monitor the biodistribution of the polysaccharide nanocarriers after their in vivo administration. Subsequently, preliminary BNCT experiments have been recently conducted with a neutron beam on U87 cells as well as on tumorous eggs.

[1] R. F. Barth et al, *Clinical Cancer Research* 2005, 11, 3987-4002. [2] B. Farhood, et al. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 2018, 23, 462-473. [3] M. Rippe, et al. *Biomater. Sci.* 2019, 7, 2850-2860. [4] F. P. Garcia, et al. *Biomater. Sci.* 2018, 6, 1754-1763.

Abstract 019

L'autophagie, une cible thérapeutique potentielle dans les Néoplasies Myéloprolifératives JAK2V617F

Charly COURDY – 1^{ère} année de thèse 2018

Charly Courdy⁽¹⁾, Isabelle De Araujo⁽¹⁾, Stéphane Manenti⁽¹⁾,
Véronique De Mas^(1,2) & Carine Joffre⁽¹⁾

(1) Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT),
Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer ; (2) Institut Universitaire
du Cancer Toulouse – Oncopole (IUCT-O)

Contexte/Objectifs : Les Néoplasies Myéloprolifératives (NMP) représentent un groupe d'hémopathies malignes chroniques caractérisées par une expansion clonale excessive de cellules de la lignée myéloïde non bloquées en différenciation. L'identification de la mutation JAK2V617F dans ces pathologies a conduit au développement d'une thérapie ciblée, le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/JAK2 (1). Cependant, l'efficacité limitée de cette molécule chez les patients rend nécessaire l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'autophagie, un processus catabolique largement étudié en cancérologie et identifié comme participant à la résistance aux traitements dans plusieurs cancers (2,3). Cependant, dans les NMP JAK2V617F, le rôle de l'autophagie reste peu documenté. L'objectif de ma thèse est donc d'étudier le rôle et la régulation de l'autophagie dans les NMP JAK2V617F, et de déterminer si celle-ci peut représenter une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de ces cancers.

Méthodes : Les expériences ont été réalisées dans les lignées cellulaires humaines (HEL et SET2), mais également dans des cellules primaires de patients portant la mutation JAK2V617F. Afin de déterminer l'impact du ruxolitinib sur l'autophagie, les cellules ont été traitées avec le ruxolitinib en combinaison avec des inhibiteurs d'autophagie, le SAR405 et la chloroquine. Les effets de ces traitements sur l'autophagie ont été analysés par western blot et immunofluorescence en étudiant notamment l'expression de la protéine LC3 un marqueur des autophagosomes, ainsi que sur la prolifération, l'apoptose et les capacités clonogéniques des cellules. Pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation en aval de JAK2 et analysé les effets de ces inhibiteurs sur l'autophagie.

Résultats : Nos résultats indiquent qu'en réponse au ruxolitinib, une autophagie cytoprotectrice est induite dans des lignées cellulaires JAK2V617F. En effet, l'inhibition de l'autophagie, en combinaison avec le ruxolitinib, potentialise les effets cytotoxiques du traitement et réduit significativement les propriétés clonogéniques des cellules primaires JAK2V617F.

De plus, au niveau moléculaire nous montrons que l'induction d'autophagie par le ruxolitinib serait due à une répression du complexe mTORC1 concomitante à une augmentation de l'activité phosphatase de la Protéine Phosphatase 2A (PP2A).

Discussion : Nos résultats indiquent qu'inhiber l'autophagie représenterait une approche thérapeutique d'intérêt pour augmenter l'efficacité du ruxolitinib chez les patients atteints de NMP. Afin de tester la relevance fonctionnelle de cette hypothèse, nous évaluons actuellement l'impact de la chloroquine un inhibiteur de l'autophagie, en combinaison avec le ruxolitinib, sur la progression de la maladie in vivo dans un modèle murin de NMP JAK2V617F *knock-in*.

Référence :

- (1) Vainchenker, W., Leroy, E., Gilles, L., Marty, C., Plo, I., and Constantinescu, S.N. (2018). JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Research* 7, 82.
- (2) Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 34, 856-880.
- (3) Joffre, C., Djavaheri-Mergny, M., Pattingre, S., and Giuriato, S. (2017). L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *médecine/sciences* 33, 328-334.

Abstract 020

MDR1 expression identifies a TH1.17 effector population resistant to chemotherapy treatments that could play a pivotal role in anti-cancer immunity

Anthony DI ROIO – 1^{ère} année de thèse 2017
Inserm U1052 – CNRS: UMR 5286 – CRCL – Lyon

A. Di Roio, M. Bossennec, C. Rodriguez, N. Gourdin, C. Caux, C. Ménétrier-Caux* (* last-authorship)

The Multi-Drug Resistance transporter 1 (MDR1) is an ABC transporter excluding xenobiotics and anti-cancer drugs from cells. Widely studied on tumor cells, MDR1 is involved in chemo-resistance because it limits, in tumor cells, intracellular drug accumulation such as Paclitaxel used in treatment of breast cancer (BC). In healthy donors (HD) T cells, MDR1 is largely expressed on CD8 T cells whereas on CD4 T cells, its expression delineates an effector population (Teff) displaying a Th1.17 (CXCR3+/CCR6+) profile and expressing the ectonucleotidase CD73. We demonstrate that MDR1 is functional on Teff and characterizes a polyfunctional subset co-producing IL-17A and IFN- γ as well IL-22 and TNF- α . *In vitro* treatments with increasing doses of Paclitaxel in presence of a TCR signal show that MDR1+ Teff from HD blood resist

to chemotherapy and proliferate more than their MDR1^{neg} counterpart, resulting in an enrichment in Th1.17 subset (phenotypically and functionally). In addition, analyses of BC patients' blood and tumor untreated or treated in neo-adjuvant setting with Paclitaxel reveal an increased proportion and polyfunctionality of MDR1+ Teff in treated patients. Of interest, CD73 expression is increased on Th1.17 from patients unresponsive to neoadjuvant treatment. Altogether, these data indicate the existence of a MDR1+ Th1.17 population which resists to chemotherapy and represents a potent actor in anti-cancer immunity. However, due to their expression of the ectonucleotidase CD73 that generates immunosuppressive adenosine from extracellular AMP, the antitumor function of MDR1+ Teff could be abolished in tumor microenvironment. Thereby, this work will argue for combining chemotherapies substrate of MDR1 with CD73 inhibitors.

Abstract 021

Le complexe Polycomb PRC2 : Étude intégrative de sa dynamique de recrutement et de la régulation de son activité

Seynabou DIOP – 1^{ère} année de thèse 2018
Directeur de thèse : Raphaël MARGUERON
Inserm U934, Institut Curie, PARIS

The Polycomb group of proteins is required for the proper orchestration of gene expression due to its role in maintaining transcriptional silencing. It is composed of several chromatin modifying complexes, including Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), which deposits H3K27me2/3. Here, we report the identification of a cofactor of PRC2, EZHIP (EZH1/2 Inhibitory Protein), expressed predominantly in the gonads. EZHIP limits the enzymatic activity of PRC2 and lessens the interaction between the core complex and its accessory subunits, but does not

interfere with PRC2 recruitment to chromatin. Deletion of Ezhip in mice leads to a global increase in H3K27me2/3 deposition both during spermatogenesis and at late stages of oocyte maturation. This does not affect the initial number of follicles but is associated with a reduction of follicles in aging. Our results suggest that mature oocytes Ezhip-/- might not be fully functional and indicate that fertility is strongly impaired in Ezhip-/- females. Altogether, our study uncovers EZHIP as a regulator of chromatin landscape in gametes.

Abstract 022

E-cadhérine : Nouvel acteur du remodelage matriciel lors de la carcinogénèse pancréatique

Aurélié DOBRIC – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Frédéric ANDRÉ

Inserm U1068, Centre de Recherche en Cancérologie, MARSEILLE

Dobric.A¹, Germain.S¹, Bonier.R¹, Silvy.F¹, Soubeyran.P¹, Iovanna.J¹, Rigot.V¹, André.F¹

¹- Équipe « Cancer du pancréas ». Aix-Marseille Université, CNRS, INSERM, Institut paoli-Calmettes, CRCM, Faculté des sciences de Luminy, 163 avenue de Luminy, 13009 Marseille, France.

L'adénocarcinome pancréatique ductal (ADKP) est l'un des cancers les plus mortels suite à un diagnostic tardif ainsi qu'une chimio- et radio-résistance. La complexité de ce cancer est augmentée par une forte invasion tissulaire ainsi que par une dissémination métastatique précoce le classant en tête position des cancers les plus agressifs.

Des altérations d'expression des molécules d'adhérence telles que les cadhérines sont reportées dans le cas de l'ADKP. En revanche, nous ne savons pas comment ces changements peuvent contribuer à la progression tumorale. Nos précédents travaux démontrent l'implication différentielle de la E- et de la P-cadhérine dans l'invasion des cellules tumorales pancréatiques. Dans cette étude, nos travaux visent à comprendre la fonction de la E-cadhérine dans le remodelage matriciel.

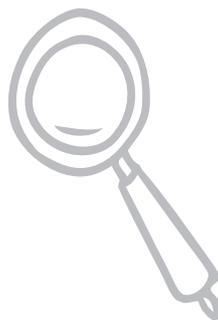
Comme pour d'autres tumeurs solides, il peut être observé dans les ADKPs des structures situées au front de migration, appelées invadopodes. Ces derniers sont des structures membranaires qui permettent lorsqu'elles sont matures, la sécrétion de différentes protéases à l'origine de la dégradation de la matrice extracellulaire environnante.

De façon à étudier la fonction de la E-cadhérine dans le remodelage de la matrice extracellulaire, nous avons sélectionné la lignée tumorale BxPC-3 qui exprime la E-cadhérine (BxPC-3 shCTRL) que nous avons déplétées par shRNA (BxPC-3 shEcad).

En réalisant un test d'invadopodes, nous avons démontré un rôle fonctionnel de la E-cadhérine dans la formation de ces structures. En effet, les cellules déplétées en E-cadhérine forment moins d'invadopodes que la condition contrôlée. Ces résultats ont pu être confirmés en utilisant un inhibiteur fonctionnel de la E-cadhérine.

Par imagerie confocale, nous avons pu identifier de façon surprenante, la localisation d'un pool de E-cadhérine au niveau de la protrusion actinique qui structure l'invadopode. Le co-marquage de la E-cadhérine avec les différents marqueurs des invadopodes (Cortactine, Tks5, MT1-MMP) confirment ces observations. De plus, cette localisation de E-cadhérine a pu être validée par Western Blot après purification de la fraction des invadopodes. Ces données montrent ainsi une localisation de la E-cadhérine inconnue jusqu'à présent et suggèrent une interaction physique et/ou fonctionnelle de la E-cadhérine avec les marqueurs des invadopodes. Des tests de co-précipitation et de proximity ligation assay (PLA), nous ont permis d'identifier une interaction physique entre la E-cadhérine et la MT1-MMP au sein des invadopodes.

Nos études révèlent ainsi une fonction inconnue de la E-cadhérine le développement tumoral. Dans les cellules tumorales pancréatiques, cette dernière intervient dans la formation des invadopodes et pourrait servir à évaluer les propriétés invasives des cellules tumorales de patients.



Abstract 023

Étude de la régulation des activités de la télomérase

Lou DURET – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Marina SHKRELI

Inserm U1081 – CNRS UMR 7284, IRCAN, NICE

La télomérase est une ribonucléoprotéine qui joue deux rôles indépendants et critiques dans les cellules cancéreuses. En tant que transcriptase inverse qui synthétise les répétitions télomériques localisées à l'extrémité des chromosomes, la télomérase assure le maintien de la longueur et de la stabilité des télomères. Cette activité, dite canonique, permet de prévenir les conséquences néfastes liées à un dysfonctionnement des télomères tel que la sénescence, l'apoptose et l'instabilité chromosomique, et confère un potentiel de prolifération illimité aux cellules. Afin d'ajouter les séquences télomériques aux extrémités des chromosomes, la télomérase nécessite TERT, sa sous-unité protéique portant l'activité de reverse transcriptase, et TERC, son composant ARN qui sert de matrice pour la synthèse des séquences télomériques.

En plus de son rôle bien établi dans la synthèse des télomères, plusieurs études montrent que la sous-unité protéique TERT de la télomérase présente d'autres activités dites noncanoniques.

Ces concepts émergent d'études dans lesquelles TERT a été exprimée ou inhibée dans un contexte où les réserves télomériques sont suffisantes. Ces approches ont révélé des rôles pour TERT, indépendants du maintien des télomères, qui favorisent les cancers épithéliaux et qui bloquent l'apoptose. Aussi, nous avons montré que l'épithélium rénal est particulièrement sensible à cette activité non-canonique de TERT. En effet, la surexpression conditionnelle d'un mutant de TERT (TERTci, catalytically inactive), incapable de rallonger les télomères, dans le rein de souris adultes provoque la reprogrammation de l'épithélium rénal en cellules dédifférenciées et prolifératives montrant les caractéristiques de cellules cancéreuses.

Malgré l'importance des activités de la télomérase dans les cellules cancéreuses notamment, il reste beaucoup à comprendre sur la régulation de TERT. En particulier, peu de données sont disponibles sur la dynamique de phosphorylation de TERT et son impact biologique.

L'objectif de projet de thèse est de déterminer si et comment une protéine phosphatase que nous nommons pX régule les activités de la télomérase. En effet, pX est exprimée dans les mêmes compartiments que TERT dans l'organisme adulte, et elle est également surexprimée dans de nombreux cancers humains. Afin de déterminer si pX interfère avec l'activité noncanonique de TERT, j'ai utilisé une approche *in vivo* me permettant de définir l'impact de l'inactivation de pX lors de la surexpression de TERTci. J'ai également utilisé une approche *in vitro* me permettant de déterminer si pX module l'élongation des télomères. Mes résultats suggèrent que pX joue un rôle pivot dans la régulation de l'équilibre entre les fonctions canoniques et non-canoniques de la télomérase : pX apparaît être nécessaire au déploiement des fonctions non-canoniques de TERT, et son activité de phosphatase réfrène l'élongation des télomères. Je développe actuellement des approches visant à comprendre comment pX interfère avec les fonctions de la télomérase. En particulier, je vais définir si TERT interagit avec pX, et si pX module le profil de phosphorylation de TERT. Ces expériences me permettront de déterminer si TERT représente une cible directe de pX.

Ce travail permettra de mettre en évidence de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques anti-cancers ciblant les activités de la télomérase.

Abstract 024

Multidirectional MRT markedly exceeds the therapeutic index of broad beams for intracerebral rat 9L gliosarcoma

LAURA ELING – 1^{ère} année de thèse 2017

L. Eling¹, A. Bouchet¹, A. Ocádiz¹, J.F. Adam¹, H. Elleaume¹, M. Krisch², J.A. Laissue³, J. Balosso⁴ and R. Serduc¹

1- Synchrotron Radiation for Biomedicine, INSERM STROBE UA7, 71 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

2- European Synchrotron Radiation Facility, 71, Avenue des Martyrs, Grenoble, France

3- University of Bern, 3000 Bern, Switzerland

4- CRLCC François Baclesse, 14000 Caen, France

Context and objectives. Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common primary brain malignancies (45.2%), with the poorest prognosis. Surprisingly, radiotherapeutic protocols for GBM management have not evolved for years while new approaches are urgently required. For 2 decades, Microbeam Radiation Therapy (MRT) has been developed at the European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, France. The

physical characteristics (low energy, quasi-parallel beam, ultra-high dose rate) of synchrotron-generated X-rays allow the spatial fractionation of the incident beam into microbeams (e.g. 50µm wide, spaced 400µm apart). The dose deposited in the path of these microbeams (peak dose) can be as high as hundreds of Gy while the dose diffusing in-between the microbeams (valley dose) consists of only 1-5% of the peak dose. MRT has shown to be remarkably well tolerated by normal brain tissue whereas immature tumor vessels are preferentially damaged leading to tumor asphyxia and necrosis. MRT has revealed to significantly improve tumor control in rats compared to conventional RT, with MRT valley doses similar to those of "conventional broad beams (BB)".

In this study, we aimed at optimizing irradiation parameters, assuming that a numerical increase in incident MRT arrays, using the same cumulated valley dose, might significantly improve tumor control

because of accumulation of peak doses in the target, while the reduction of each dose delivered per incident array might entail less normal tissue damage.

Methods. Normal or 9LGS bearing rats were irradiated through either multiple MRT ports (up to five) or 2 ports of synchrotron BB X-rays. A 10Gy valley dose, due to scattered radiation from the adjacent high dose microbeams (up to 726Gy, 50 μ m wide, 400 μ m spaced apart) was administered. Animal behavior and MRI parameters of healthy rats were studied during one year and effects on tumor growth were evaluated on 9LGS-bearing rats (MST, tumor volume, histological analysis).

Results. In this study, we evaluated the effects of MRT delivered through increasing number of irradiation ports on normal or 9LGS-bearing rats compared to orthogonally administered synchrotron BB to shed light on dose equivalence and possible prescription modalities. Compared with BB irradiations, MRT damaged tissues in the beam-crossing area but modified normal rat behavior to a small extent only, while

unidirectionally irradiated brain regions, outside the target, appeared intact. A 10Gy valley dose (726Gy peak dose), delivered by one MRT port, improved tumor control and MST of 9L-glioma bearing rats, compared with 10Gy BB. The more ports being added, the greater were the effects on tumor growth and survival. At identical cumulated valley dose, each supplementary MRT port extended MST of 9L glioma bearing rats, resulting in an exponential correlation between the number of MRT ports and MST ($r^2=0.9925$). Multiport MRT reached unexpected biologic equivalent doses (x2.5), an effect which is not achievable with any other radiotherapy method by basic ballistic effect.

Conclusion. The results confirmed that the adjunction of MRT ports non-linearly improves tumor control with an unexpectedly high biological equivalent dose. The remarkable normal tissue sparing and the outstanding therapeutic index make multiport MRT a promising innovative method that deserves to be transferred in clinical environment, particularly for dose escalation schedules and local radiation-boost delivery protocols.

Abstract 025

Étude moléculaire et fonctionnelle du récepteur à activité Tyrosine Kynase PTK7 et ciblage dans le cancer colorectal

Laetitia GANIER – 1^{ère} année de thèse 2017

Auteurs : Laetitia Ganier⁽¹⁾, Alexia Lopresti⁽¹⁾, Olivier Cabaud⁽¹⁾, Pascal Finetti⁽¹⁾, Claire Acquaviva⁽¹⁾, Stéphane Betzi⁽¹⁾, Carine Derviaux⁽¹⁾, Christophe Muller⁽¹⁾, Philippe Roche⁽¹⁾, Emilie Mamessier⁽¹⁾, Daniel Birnbaum⁽¹⁾, Xavier Morelli⁽¹⁾, Jean-Paul Borg⁽¹⁾

(1) Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Inserm, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France, Université Aix-Marseille, Marseille, France

Deuxième cause de décès par cancer en France, le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique. La découverte de nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques via une meilleure caractérisation des acteurs moléculaires du CCR est donc cruciale (1). Le récepteur à tyrosine kinase PTK7 intervient dans la régulation des voies de signalisation WNT/polarité cellulaire planaire (PCP) et WNT/ β -caténine, deux voies impliquées dans la mise en place et le maintien de la polarité cellulaire et fondamentales pour le développement embryonnaire des vertébrés et invertébrés (2,3). PTK7 est surexprimé dans les CCR, un événement associé à la survenue de métastases, à une réduction de la survie des patients non métastatiques ainsi qu'à une augmentation des résistances aux chimiothérapies (4,5). PTK7 induit également un phénotype cellulaire pro-migratoire *in vitro* mais les mécanismes impliqués restent encore mal compris.

Grâce à l'étude d'une collection de tumeurs primaires, cellules tumorales circulantes (CTC) et métastases de patients CCR, nous avons montré une surexpression de PTK7 (ARNm) dans les tumeurs primaires et métastatiques et confirmé PTK7 comme un marqueur indépendant de mauvais pronostic. Cependant, la caractérisation des CTC a mis en évidence une absence d'expression de PTK7 à leur surface. Cette observation a été retrouvée dans un modèle souris récapitulant le processus de progression tumorale et l'utilisation d'un modèle *in vitro* de microfluidique permettant de mimer la circulation sanguine a montré une perte d'expression de PTK7 à la surface de cellules HCT116. D'autre part, la perte d'expression de PTK7 par siRNA dans les cellules HCT116 induit une augmentation du nombre de cellules retrouvées vivantes en suspension. L'identification par l'équipe des complexes moléculaires

associés ou à proximité de PTK7 dans les cellules HCT116 a permis de constater la présence de certaines intégrines. Deux de ces intégrines sont majoritairement impactées par la perte du récepteur : intégrine $\alpha 6$ dont l'expression augmente et intégrine αV dont l'expression diminue. La perte de PTK7 entraîne également une augmentation de la phosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase), acteur majeur de l'adhésion cellulaire dont la phosphorylation est associée à la survie des cellules cancéreuses et à la résistance à l'anoïkis. A la suite de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la perte de PTK7 favoriserait une perte d'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et induirait une résistance à l'anoïkis ce qui en fait une cible de choix au développement de nouvelles thérapies ciblées. Pour cela, nous proposons donc une stratégie alternative aux anticorps monoclonaux basée sur la découverte de composés chimiques inhibiteurs de l'interaction PTK7 : β -caténine grâce à la mise en place d'un test NanoBRETTM. Les composés inhibiteurs identifiés seront optimisés par chimie médicinale puis testés dans le contexte de la voie Wnt/ β -caténine.

Références

1. Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(4):235-46.
2. Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 1 juill 2004;430(6995):93-8.
3. Puppo F, Thomé V, Lhoumeau A-C, Cibois M, Gangar A, Lembo F, et al. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/ β -catenin canonical signalling. *EMBO Rep*. janv 2011;12(1):43-9.
4. Lhoumeau A-C, Martinez S, Boher J-M, Monges G, Castellano R, Goubard A, et al. Overexpression of the Promigratory and Prometastatic PTK7 Receptor Is Associated with an Adverse Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0123768.
5. Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, et al. Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. *PLoS ONE*. 16 nov 2010;5(11):e14018.

Abstract 026

Identification et optimisation d'agents anticancéreux par une approche de « Fragment-based drug discovery » : application au complexe protéique syntenin/syndecan

Manon GARCIA – 1^{ère} année de thèse 2017

Manon Garcia, Laurent Hoffer, Raphael Leblanc, Mikael Feracci, Antonio Egea, Rudra Kashyap, Carine Derviaux, Philippe Roche, Xavier Morelli, Pascale Zimmermann and Karine Barral
Aix-Marseille Université, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM UMR7258, Marseille, France

La découverte de médicaments est un processus intrinsèquement inefficace, en particulier en oncologie. Il est donc devenu urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer des approches permettant de proposer et de caractériser une nouvelle génération de médicaments anticancéreux. Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (PPI) représentent une alternative et un réservoir de grand intérêt¹. Nos objectifs sont d'identifier et d'optimiser des inhibiteurs ciblant des interactions protéine-protéine validées en oncologie. Le complexe syntenin/syndecan a été définie comme une de ces cibles PPI. La syntenin est une protéine intracellulaire impliquée dans la signalisation cellulaire². L'un de ces principaux partenaires est le récepteur transmembranaire syndecan. Leur interaction joue un rôle majeur dans le recyclage des endosomes vers la membrane plasmique, ainsi que dans la biogénèse et la libération des exosomes³. Des études récentes ont montré que la syntenin est surexprimée dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses^{4,5} (sein, poumon, estomac, colon...) et joue un rôle important dans la propagation des tumeurs métastatiques⁶. Ainsi, nous avons appliqué une stratégie novatrice de « Fragment-based drug discovery » qui a permis l'identification rapide d'inhibiteurs du complexe protéique syntenin/syndecan.

Un criblage primaire d'une chimiothèque de fragments réalisé par HTRF contre le complexe syntenin/syndecan a permis d'identifier un fragment « Hit » nommé **C58** qui inhibe spécifiquement l'interaction du complexe protéique. Cette interaction a été validée par des méthodes biophysique de (SPR) et de cristallographie à rayon-X. La résolution de la structure cristallographique 3D du complexe **C58**/syntenin a permis de lancer un programme d'optimisation par « structure-based drug design » grâce aux informations obtenus sur le site et le mode de fixation de **C58**. Dans notre communication, nous revenons sur les étapes du processus d'optimisation par « fragment growing » qui nous ont permis de synthétiser la molécule **F13**, un inhibiteur sélectif de l'interaction syntenin/syndecan, qui réduit la migration et la formation de colonie de cellules MCF7 (cancer du sein). **F13** altère également la formation et la prolifération de mammosphères ainsi la production d'exosomes syntenin-dépendants en lignée cellulaire MCF7.

Références

- 1- X. Morelli ; R. Bourgeas ; P. Roche. Current Opinion in Chemical Biology, 2011, **15**, 475-481.
- 2- J.M. Beekman ; P.J. Coffey. Journal of cell Science. 2008, **121**, 1349-1355.
- 3- V. Friand ; G. David ; P. Zimmermann. Biol. Cell. 2015, **107**, 331-341.
- 4- H. Lee and al. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011, **409**, 148-153.
- 5- Koo and al. Oncogene. 2002, **21**, 4080-4088.
- 6- Qian and al. Plos one. 2013, **8**, e60046.

Abstract 027

L'ARN non codant NEAT1 est un activateur traductionnel de l'expression des facteurs (lymph)angiogéniques lors du stress hypoxique

Anne-Claire GODET – 4^e année de thèse 2018

Directeur de thèse : Anne-Catherine PRATS

Inserm U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, TOULOUSE

Anne-Claire Godet¹, Florian David^{1*}, Emilie Roussel^{1*}, Fransky Hantelys¹, Joffrey Alves¹, Françoise Pujol¹, Isabelle Ader², Edouard Bertrand³, Carine Froment⁴, Anthony K. Henras⁵, Patrice Vitali⁵, Eric Lacazette¹, Florence Tatin¹, Barbara Garmy-Susini¹, and Anne-Catherine Prats¹
1- UMR 1048-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France. 2- UMR 1031-STROMALAB, Inserm, CNRS ERL5311, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), National Veterinary School of Toulouse (ENVT), Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France. 3- UMR5535 CNRS-IGMM, Université de Montpellier, Montpellier, France 4- UMR 5099-LBME, CBI, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France. 5- UMR5089 CNRS-IPBS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France. * Contribution égale

Contexte et objectifs. La traduction est une étape de l'expression des gènes fortement régulée. Lorsque la cellule est stressée, cela bloque la synthèse protéique globale tout en activant la traduction de certains ARNm par des mécanismes alternatifs. L'un de ces mécanismes implique des structures de l'ARNm, les IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*), qui permettent un recrutement de la machinerie de traduction indépendamment de l'extrémité 5' coiffée de l'ARNm. L'activité des IRES est régulée par des facteurs appelés ITAF (*IRES trans-acting factor*). Le stress hypoxique survient au cœur des tumeurs cancéreuses lorsque les cellules se trouvent éloignées des vaisseaux. Pour répondre rapidement à ce stress, les cellules produisent des facteurs de croissance (lymph)

angiogéniques qui stimulent la formation de vaisseaux sanguins et lymphatiques, la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Nous avons montré que les IRES d'ARNm des familles FGF (*fibroblast growth factor*) et VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sont activés lors de l'hypoxie précoce. Afin d'identifier les ITAF activateurs de ces IRES, nous sommes partis de l'observation que plusieurs ITAF identifiés précédemment sont des composants essentiels d'un corps nucléaire formé en cas de stress, le paraspeckle, dont la formation repose sur la présence d'un long ARN non codant, NEAT1. Ainsi nous avons formulé l'hypothèse que NEAT1 pourrait être un activateur de la traduction IRES-dépendante.

Méthode. Des lentivecteurs bicistroniques ont été utilisés pour étudier la traduction IRES-dépendante en hypoxie ou normoxie. L'expression de NEAT1 a été analysée par RT qPCR et imagerie FISH. L'extinction de NEAT1 a été réalisée avec des oligonucléotides antisens gapmères LNA et celle de P54nrb et PSPC1 avec des siARN. L'impact de chaque déplétion sur l'activité de l'IRES de FGF1, puis sur un ensemble d'IRES de facteurs

(lymph)angiogénique et non-(lymph)angiogéniques, a été mesurée. Le niveau de protéine endogène FGF1 a été quantifié par Western capillaire.

Résultats. Nous avons établi une corrélation entre l'induction de NEAT1 et l'activation de l'IRES du FGF1 lors de l'hypoxie. Effectivement, la déplétion de NEAT1 entraîne l'inactivation de l'IRES du FGF1, suggérant que cet ARN non codant est un ITAF. De plus elle entraîne une baisse de la protéine endogène FGF1. Nous montrons que deux autres protéines du paraspeckle, p54nrb et PSPC1, sont aussi des ITAF en hypoxie. En élargissant l'étude à un ensemble d'IRES, nous montrons que p54nrb et PSPC1 sont capables d'activer certains IRES mais pas tous, alors que l'ARN non codant NEAT1 est un ITAF activateur de tous les IRES testés.

Discussion. NEAT1 paraît donc être la clé de l'activation de la traduction IRES-dépendante lors de l'hypoxie, et le paraspeckle présente la fonction nouvelle de plateforme d'assemblage de l'IRESome. Ces résultats révèlent le grand potentiel de NEAT1 en tant que nouvelle cible thérapeutique anti-cancéreuse.

Abstract 028

Malignité des tumeurs mutées sur le gène SDHB : Rôle de l'homéostasie du fer et du stress oxydant

Judith GONCALVES – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Judith FAVIER

Inserm U970, Centre de recherche Cardiovasculaire, PARIS

Judith Goncalves¹, Aurélie Morin¹, Géraldine Gentric², Sebastian Muller³, Sophie Moog¹, Katarína Křůčková⁴, Charlotte Lussey-Lepoutre¹, Paule Bénit⁵, Raphaël Rodriguez³, Fatima Mechta-Grigoriou², Anne-Paule Gimenez-Roqueplo¹, Eric Letouzé⁶, Daniel Tennant⁴ et Judith Favier¹

1- Université de Paris, PARCC, INSERM, Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, Paris, France ; 2- Institut Curie, Inserm, Stress and Cancer Laboratory, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, PSL Research University, Paris ; 3- Chemical Biology of Cancer, CNRS UMR3666, Inserm U1143, Institut Curie, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, PSL Research University ; 4- Institute of Metabolism and Systems Research, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham. UK ; 5- INSERM, UMR 1141, Hôpital Robert Debré, Paris, France ; 6- Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, Functional Genomics of Solid Tumors

Contexte : La succinate déshydrogénase est une enzyme mitochondriale dont le déficit est responsable d'une prédisposition au développement de plusieurs types de tumeurs, dont les phéochromocytomes et les paragangliomes (PPGL), mais aussi certaines formes rares de cancers du rein et de tumeurs gastro-intestinales. La SDH est composée de 4 sous-unités codées par les gènes SDHA, B, C et D qui sont tous des gènes de prédisposition au PPGL. Pourtant, les conséquences cliniques de ces différentes mutations sont très différentes. En effet, seule une mutation sur le gène SDHB constitue un facteur de risque d'évolution métastatique et de mauvais pronostic. Les raisons de ces différences restent totalement inexplicables.

Objectif : Elucider les mécanismes expliquant les différentes présentations cliniques observées chez les patients atteints, et en particulier l'agressivité des tumeurs liées aux mutations du gène SDHB.

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé la technique du CrispR-Cas9 pour générer une lignée de cellules chromaffines murines (imCC) porteuse d'une inactivation du gène *Sdhb*. Le phénotype de ces cellules a été comparé à celui des imCC *Sdhb*^{-/-}, précédemment générées au laboratoire (Letouzé et al, Cancer Cell 2013). Nous avons effectué la caractérisation ces deux modèles cellulaires en termes de prolifération, migration et adhésion et établi leurs profils métabolique, transcriptomique, épigénétique. Dans ces cellules nous avons également étudié les niveaux cytosoliques et mitochondriaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de fer et de cuivre.

Résultats : Les cellules *Sdhb*^{-/-} présentent un phénotype beaucoup plus agressif que les cellules *Sdhb*^{-/-}, avec des propriétés adhésives et migratoires accrues, reflétant les comportements cliniques différents des tumeurs observés chez les patients porteurs de ces mutations. Les cellules *Sdhb*^{-/-} présentent également une plus forte inhibition des dioxygénases 2-OG dépendantes, ayant pour conséquence une hyperméthylation accrue et un phénotype pseudo-hypoxique. Par ailleurs, les imCC *Sdhb*^{-/-} manifestent des niveaux plus élevés de ROS, associés à un déséquilibre de l'homéostasie du fer et du cuivre cellulaire, en comparaison aux imCC *Sdhb*^{-/-}. La sous-unité SDHB est la seule sous-unité SDH portant trois clusters fer-soufre. Nous mettons en évidence ici, le rôle joué par les dérivés réactifs de l'oxygène et l'homéostasie du fer dans l'inhibition plus forte des dioxygénases et donc dans l'acquisition de propriétés métastatiques spécifiquement associées aux mutations SDHB. En outre, les cellules *Sdhb*^{-/-} montrent une sensibilité accrue à un traitement par de fortes doses d'ascorbate. Conclusion: Cette étude met en évidence, pour la première fois, un mécanisme reliant les mutations du gène SDHB au stress oxydant et à l'homéostasie du fer et du cuivre, pouvant expliquer le phénotype particulièrement agressif de ces tumeurs. Ces données suggèrent l'efficacité de l'ascorbate pharmacologique comme traitement, ciblant plus spécifiquement les voies activées dans les PPGL SDHB-dépendants.

Abstract 029

Recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie anti checkpoints en utilisant l'analyse transcriptomique en cellule unique de cellules T CD8+ mémoire "stem-cell-like"

Paul GUEGUEN - 1^{ère} année de thèse 2017

Paul GUEGUEN - PhD Student - Institut Curie, U932 - Equipe Amigorena

La présence de lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) en général, et des CD8 + TIL en particulier, représente un facteur de pronostic favorable chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC). Des études récentes chez la souris et l'homme montrent que les CD8 + TIL comprennent deux populations principales : les précurseurs de type mémoire et les cellules tardives dysfonctionnelles / épuisées. Les capacités fonctionnelles de ces populations, leurs capacités de régénération et leur réactivité à la reprogrammation par blocage des points de contrôle immunitaire ne sont cependant pas encore complètement comprises. Dans nos travaux nous avons utilisé une combinaison de séquençage d'ARN unicellulaire et de récepteur de cellules T (TCR), dans la tumeur, la juxta-tumeur et le sang, afin d'étudier l'organisation fonctionnelle des populations TIL chez les patients atteints de CBNPC précoces non traités. Les analyses de l'expression des gènes et des TCR montrent que les CD8 + TIL comprennent deux sous-populations exprimant des groupes de gènes de type mémoire, une qui est

également présente dans le sang (précurseurs circulants) et une qui est également présente dans le tissu juxta-tumoral (précurseurs résidents). Les populations TIL différenciées en phase terminale, qui sont pour la plupart absentes du sang et de la juxta-tumeur, comprennent également deux sous-types principaux, une population transitionnelle et une population différenciée en phase terminale, souvent désignées comme dysfonctionnelles / épuisées. Les tailles clonales du TCR augmentent à mesure que les TIL se différencient en phase terminale, probablement en raison d'une expansion *in situ*, car une proportion importante de ces cellules portent également des signatures de cycle cellulaire et de dommages à l'ADN. Nous proposons que deux populations de précurseurs de type mémoire non cyclantes, circulantes et résidentes dans les tissus, se différencient de manière intratumorale en cellules terminales de type effecteur, très probablement dysfonctionnelles / épuisées, et expansées clonalement. Ces résultats fournissent un modèle de travail cohérent pour l'origine des TIL, leur filiation et leur organisation fonctionnelle dans les CBNPC primaires.

Abstract 030

Effet anti-leucémique prophylactique et thérapeutique induit par le peptide dérivé d'AAC-11 RT53

Justine HABAUT - Inserm U976 - Institut de recherche St-Louis, Paris

Contexte

Malgré de nombreux progrès dans la compréhension, la caractérisation et le traitement des leucémies aiguës, seulement une minorité de patients survivent plus de 10 ans après le diagnostic. Parmi les sous-types de leucémies, le pronostic est particulièrement sombre pour les adultes atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) (De Kouchkovsky et al., 2016). C'est pourquoi il est nécessaire de proposer aux patients de nouvelles options thérapeutiques.

Une des stratégies principales dans la recherche de thérapies anti-cancéreuses est de cibler des réseaux de voies de signalisation oncogéniques requises pour la croissance et la survie des cellules tumorales. Cependant, les résistances intrinsèques ou acquises limitent souvent l'efficacité de ces thérapies ciblées (Ellis et Hicklin, 2009 ; Neel et al., 2017). En parallèle du développement de molécules anti-cancéreuses, les immunothérapies ont révolutionné la prise en charge des patients (Martin et al., 2009 ; Thallinger et al., 2018).

Nous avons développé un peptide pénétrant, dérivé de la protéine anti-apoptotique AAC-11, nommé RT53, qui possède des propriétés anti-tumorales dans différents modèles de cancers. RT53 est capable

d'éliminer les cellules cancéreuses de façon spécifique, non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo* (Rigou et al., 2011 ; Jagot- Lacoussière et al., 2016). Nous avons mis en évidence au moins deux mécanismes d'action : l'inhibition des interactions protéine-protéine d'AAC-11 et la membranolyse des cellules néoplasiques. Des résultats que nous avons obtenus dans le contexte du mélanome et du fibrosarcome indiquent que la mort cellulaire induite par le peptide RT53 est immunogène, c'est-à-dire caractérisée par le relargage de DAMPs (Damage-Associated-Molecular -Patterns), et que les cellules mourantes peuvent être utilisées en tant que vaccin prophylactique dans un modèle murin de ces pathologies (Jagot-Lacoussière et al. 2016 ; Pasquereau-Kotula, Habaut et al., 2019). De plus, l'injection intratumorale de RT53 dans des cancers établis induit une régression des tumeurs, accompagnée d'une infiltration de cellules T CD3+, et la mise en place d'une réponse inflammatoire (augmentation transitoire des niveaux de cytokines IL-1 β et IL-6, présence de ligands de chimiokines pro-inflammatoires CCL2 et CXCL10 dans les tumeurs) (Pasquereau-Kotula, Habaut et al. 2019). Ces observations suggèrent que l'effet oncolytique direct de RT53 favorise l'activation systémique du système immunitaire et la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunogène, qui entraîne l'infiltration des lymphocytes.

Dans cette nouvelle étude, nous évaluons le potentiel thérapeutique de RT53 dans le contexte des leucémies aiguës. Nous montrons que RT53 possède un effet anti-leucémique direct, non seulement *in vitro* mais aussi dans un modèle murin pré-clinique de leucémie aiguë promyélocytaire (APL). Dans ce modèle, nous montrons qu'un vaccin constitué de blasts leucémiques exposés à RT53 est capable d'empêcher efficacement le développement de la maladie, à la fois en traitement prophylactique mais aussi en traitement thérapeutique. Cet effet protecteur est long-terme, et dépendant des cellules T CD4+. Ces résultats sont très prometteurs concernant la mise au point d'une immunothérapie, basée sur les propriétés anti-leucémiques de RT53.

MÉTHODES

Peptides

Les peptides sont synthétisés par Protéogénix (Strasbourg, France) et leur pureté (>95%) vérifiée par HPLC et spectrométrie de masse. La séquence de RT53 est la suivante (séquence de la pénétratine soulignée) RQIKIWFQNRRMKWKKAKLNAEKLDKFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT

Lignées cellulaires et produits chimiques

Les cellules NB4 (achetée chez ADCC), UF-1 (fournies par Dr. Y. Ikeda, Tokyo, Japon), HUT-78 (fournies par Dr. A. Marie-Cardine, Paris, France) et B16F10 (fournies par Dr. M. Dutreix, Paris, France) ont été utilisées pour les expériences. Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-glutamine, 1mM d'Hepès et 200µg/ml d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) (Gibco). Toutes les cellules ont été maintenues à 37°C dans un milieu humidifié à 5% de CO₂. Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma.

Tests Lactate déshydrogénase, ATP et HMGB1

Le relargage de LDH (lactate déshydrogénase) et d'ATP dans le milieu de culture ont été évalués grâce aux tests Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay et Enliten ATP Assay respectivement (Promega). Le relargage de HMGB1 dans le milieu de culture a été évalué par le kit ELISA HMGB1 (IBL).

Microscopie électronique

Les échantillons ont été fixés dans 3% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate pH 7.4 pendant 1h, lavés, fixés dans un tampon phosphate 0.1M, 1% osmium tétroxyde, puis graduellement déshydratés dans 70, 90 et 100% d'éthanol. Après 10min dans un mélange 50% de propane époxy et 50% de résine époxy, les échantillons ont été inclus dans une résine époxy et polymérisés à 60°C pendant 24h. Après polymérisation, des sections ultrafines de 90nm ont été coupées avec un ultra-microtome (Reichert, ultracut, S), marqués avec de l'acétate d'uranyle et observés avec un microscope électronique à transmission (JEOL 1011). L'acquisition a été effectuée avec une caméra Gatan Orius 1000 CCD.

Test d'apoptose

Les blastes leucémiques ont été marqués avec le kit Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) et de l'iode de propidium (PI), selon les instructions du fabricant, puis analysés par cytométrie en flux avec un cytomètre en flux CytoFLEX (Beckman and Coulter). Les cellules vivantes ont été définies comme étant V-/PI+.

Test d'autophagie

La formation de corps apoptotiques a été évaluée grâce au kit Cyto-ID Autophagy Detection (EnzoLife Sciences), grâce à un marqueur fluorescent excitable à 488nm qui marque spécifiquement les compartiments autophagiques, selon le protocole du fabricant, puis analysés par cytométrie en flux avec un cytomètre en flux CytoFLEX (Beckman and Coulter). La privation en sérum (1h) a été utilisée comme contrôle positif pour le flux autophagique.

Détermination de la calréticuline exposée à la surface cellulaire

L'exposition de la calréticuline (CRT) a été évaluée par immunomarquage et cytométrie en flux. Brièvement, les blasts APL (106 cellules/ml) ont été ensemencés dans des plaques de 24 puits, dans un milieu de culture classique, puis traités pendant 6h avec 5µM de RT53. Les cellules ont été lavées avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline), collectées puis ensemencées dans des plaques 96-puits à fond rond, et incubées pendant 45min dans une solution de blocage (Blocking Solution Image-IT® Fixation/Permeabilization Kit Cat. #R37602, Thermofischer Scientific). Après un lavage, les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti-calréticuline pendant la nuit (Calreticulin (D3E6) XP® Rabbit mAb #12238, Cell Signaling). Après un lavage, les cellules ont été incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG secondary antibody Cat. #A11034, Thermofischer Scientific). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux, en excluant les cellules mortes PI+.

Déclarations éthiques

Cette étude a été réalisée en accord avec les directives pour l'expérimentation animale du comité éthique 86/609/EEC, et a été approuvée par le comité pour l'étude expérimentale sur des animaux de l'université Paris 7 (Protocol Number: 2303.01). Les animaux ont été élevés et hébergés au sein de notre plateforme d'expérimentation animale (Institut de Recherche St Louis, Paris, France), dans des cages ventilées, sous température contrôlée (22°C), dans des conditions stériles, des cycles lumière-obscurité de 12h et alimentés/abreuvés *ad libitum*.

Modèle murin pré-clinique de transplantation de cellules APL

Les blasts APL (fournis par Dr. M. Bishop et Dr. S. Kogan, UCSF, USA) sont issues de la rate de souris portant la construction humaine PML-RARA cDNA sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée myéloïde (hMRP8) dans des souris FVB/N. Pour l'amplification, les cellules (1×10⁵ or 1×10⁶) ont été resuspendues dans du PBS et transplantées par injection intraveineuse (200 µl, i.v) dans la queue de souris syngéniques réceptrices femelles (âgées de 5-6 semaines). L'établissement de la leucémie a été évalué par la diminution du nombre de plaquettes dans le sang, environ 3 semaines après la greffe. Les cellules de la rate ont été collectées, lavées, resuspendues dans du PBS et injectées (104 cells/mouse; 200 µL) dans la veine caudale de souris FVB/N mâles (âgées de 7-8 semaines) pour les expériences. Pour le traitement direct, les souris ont été traitées quotidiennement ou tous les deux jours par voie intrapéritonéale (i.p) avec une solution saline ou RT53 à 2.4mg/kg dans une solution saline, à partir de 10 ou 20 jours après la greffe, pour un total de 7 injections.

Tests de vaccination avec des blasts traités par RT53

2 × 10⁶ cellules vivantes obtenues de la rate de souris receveuses primaires ou cellules indiquées ont été lavées dans du PBS et resuspendues dans 200µl de milieu RPMI sans sérum. Les cellules ont ensuite été exposées à 30µM de RT53 pendant 3h pour l'induction de la mort cellulaire and la solution complète de cellules traitées par RT53 a été injectée par voie sous-cutanée (s.c) dans le flanc gauche de souris syngéniques FVB/N. Pour l'induction de la leucémie, les souris ont été injectées i.v avec 1 × 10⁴ blasts obtenus de souris receveuses primaires aux temps indiqués.

Déplétion de cellules T

Les souris ont été déplétées de soit les cellules T CD4+, soit les cellules T CD8+, soit les deux populations de cellules T, par deux injections par semaine (i.p) de 0.2mg d'ascites contenant un anticorps anti-CD4 ou un anticorps anti-CD8, 2 semaines après les expériences. Les injections ont ensuite été effectuées deux fois par semaine au cours de la période d'étude. Le sang a été collecté par prélèvement sous-mandibulaire. Les PBMC ont été marquées avec un mix d'anticorps anti-CD3ε-APC (MACS),

Abstract 030 (suite)

anti-CD4-PE (MACS) and anti-CD8-APC-cy7 (BD Biosciences) (2.5 µl, 30 min, 4°C). Les globules rouges ont ensuite été lysés dans un tampon ACK pendant 7min à température ambiante. L'efficacité de déplétion a été analysée par cytométrie en flux (Canto II, BD Biosciences).

RÉSULTATS

RT53 possède des propriétés anti-leucémiques directes

Afin de tester la cytotoxicité de RT53, nous avons effectué des tests de relargage de LDH sur plusieurs types de cellules LAP : humaines NB4, sensibles à l'ATRA (acide transrétinoïque) et UF-1, résistantes à l'ATRA ; blastes issus de rate murine de LAP (transgéniques *hMRP8-PML-RARA*). Nos résultats indiquent que RT53 a un effet cytotoxique dose-dépendant vis-à-vis de ces différentes cellules leucémiques, mais pas sur des blastes issus de rate de souris saine, indiquant qu'il possède une activité spécifique des cellules tumorales (figure 1a). Le relargage rapide de LDH, en plus des caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire observée en microscopie électronique (pas de condensation du noyau, rupture de la membrane, gonflement cytoplasmique), indiquent que la mort cellulaire est de type nécrotique (figure 1b). Ces données sont confirmées par des analyses en cytométrie en flux de blastes leucémiques, montrant que les cellules traitées sont rapidement Annexine V/PI double-positives (figure 1c). En concordance avec ces résultats, des inhibiteurs de caspases zVAD-fmk (figure 1d) ou de la protéine RIPK1 necrostatine-1 (figure 1e) ne modifient pas la mort cellulaire induite par le peptide, indiquant qu'il ne s'agit ni d'une apoptose, ni d'une nécroptose. A l'inverse, IM-54, un inhibiteur de nécrose induite par le stress oxydatif prévient la cytotoxicité de RT53 (figure 1f). Pour finir, le peptide ne semble pas induire la formation de compartiments autophagiques (figure 1g), et l'ajout d'un inhibiteur d'autophagie 3- méthyladénine n'affecte pas son effet cytotoxique (figure 1h). Tous ces résultats suggèrent que RT53 induit une nécrose des cellules tumorales.

Nous avons ensuite testé le potentiel anti-leucémique de RT53 dans un modèle murin pré-clinique de LAP. Dans ce modèle de souris syngénique, basé sur l'injection intraveineuse de blastes transgéniques *hMRP8-PML-RARA*, les souris meurent au bout d'environ 30 jours d'hémorragie interne. Nos résultats indiquent que le traitement quotidien par RT53 à 2.4mg/kg pendant 7 jours à partir de 10 jours après la greffe, augmente significativement la survie des souris, supérieure à celle des souris traitées par l'ATRA (figure 1i). Une amélioration de la survie est observée même lorsque les souris sont traitées un jour sur deux (figure 1j) ou lorsque les souris commencent à être traitées lorsque la leucémie est déjà bien établie, 20 jours après la greffe (figure 1j).

Un vaccin basé sur des blastes APL traités par RT53 induit une protection long-terme, dépendant des cellules T CD4+

Nous avons ensuite regardé si RT53 était capable d'induire le relargage de DAMPs, caractéristique d'une mort cellulaire immunogène (exposition de la calréticuline CRT, relargage d'ATP et de HMGB1). Les résultats indiquent que c'est effectivement le cas (figure 2a).

Puis, nous avons développé un modèle murin de vaccination anti-leucémique, basé sur le modèle pré-clinique LAP, immunocompétent. Dans ce modèle, des blastes syngéniques sont traités *in vitro* avec le peptide, puis injectés en sous-cutané, 10 jours avant l'induction de la maladie. De manière intéressante, 7 souris sur 8 ne développent pas la maladie (figure 2b), indiquant une protection prophylactique du vaccin. Pour démontrer la spécificité du vaccin, nous avons testé d'autres types cellulaires : des cellules humaines leucémiques ou non (NB4, HUT78) ou murines cancéreuses (B16F10) ou non cancéreuses (blastes de souris saines). Aucune de ces cellules ne protègent les souris contre le développement de la LAP, indiquant que le vaccin est tumeur-spécifique (figure 3a). Afin de voir si la protection est long-terme, nous avons

ensuite rechallenge les souris survivantes de l'expérience 2a avec des blastes leucémiques. De façon remarquable, plusieurs mois plus tard (107 ou 226 jours), les souris sont toujours protégées, indiquant un effet long-terme du vaccin (figure 3b).

Nous avons ensuite réitéré ces expériences, cette fois-ci en déplaçant les souris de leurs cellules T CD4+, CD8+ ou des deux populations de cellules T. Nos résultats indiquent que les cellules T CD4+ sont indispensables à la protection induite par le vaccin, tandis que les cellules T CD8+ jouent un petit rôle, moins déterminant (figure 4).

Pour finir, nous avons voulu savoir si le vaccin fonctionnait également en traitement thérapeutique, 3 ou 10 jours après induction de la maladie. Nos résultats indiquent que même dans ces conditions expérimentales, les souris sont protégées contre le développement de la leucémie (figure 5).

DISCUSSION

Il est connu que certains peptides oncolytiques, comme le peptide LTX-315 peuvent induire une nécrose des cellules tumorales, qui présentent toutes les caractéristiques d'une mort cellulaire immunogène.

Ces cellules peuvent être utilisées en tant que vaccin dans des modèles de souris pré-cliniques immunocompétents (Camilio et al. 2014; Camilio, Rekdal, et Sveinbjörnsson 2014; Yamazaki et al. 2016; H. Zhou et al. 2016). Ces données nous ont encouragé à étudier les propriétés immunologiques de RT53 dans le contexte de cancers solides (Jagot-Lacoussière et al., 2016 ; Pasquereau-Kotula, Habault et al., 2019) puis des LAP, grâce à un modèle pré-clinique de greffe syngénique immunocompétent.

Nous démontrons ici que RT53 tue les cellules leucémiques par membranalysse, et que les cellules mourantes présentent toutes les marques d'une mort cellulaire immunogène : exposition de la CRT, relargage d'ATP, de LDH et de HMGB1 des cellules leucémiques traitées.

Nous montrons également qu'il est possible de protéger les souris contre l'induction de la maladie, grâce à un vaccin consistant en une injection unique de blastes murins leucémiques exposés au peptide *in vitro* et présentant les caractéristiques d'une mort cellulaire immunogène. Ce vaccin (patent N° PCT/EP2019/19435) protège les souris contre le développement de la maladie, que ce soit en traitement prophylactique ou en traitement thérapeutique. La protection générée est très spécifique, puisque seules les cellules LAP murines protègent contre l'induction de la maladie. Elle est également long-terme puisque les souris sont protégées contre plusieurs challenges de cellules tumorales.

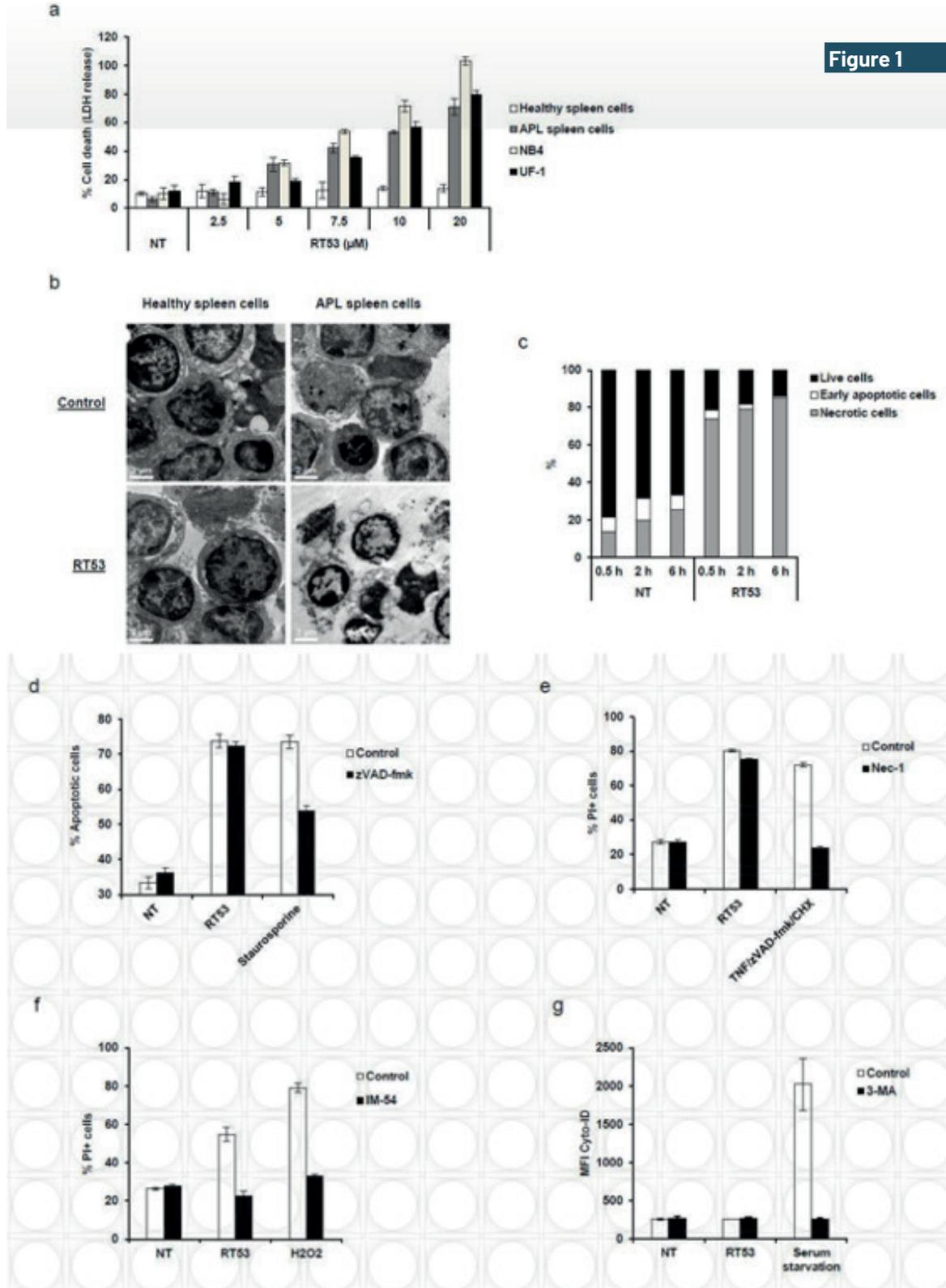
D'après nos expériences, cette protection dépend majoritairement de la présence de lymphocytes T CD4+, car les souris déplétées ne sont quasiment plus protégées. Cela peut s'expliquer par le rôle crucial des cellules T CD4+ dans la mise en place de la mémoire immunitaire (Luckheeram et al. 2012), et suggère que le vaccin induit une réponse innée, impliquant des macrophages et des cellules NK qui peuvent être activées par les cellules T CD4+. Une activité cytotoxique des cellules T CD4+ est également envisageable (Quezada et al. 2010; J. Fu et al. 2013; Sharma et al. 2013). Nos résultats indiquent que les cellules T CD8+ jouent également un rôle dans la réponse immunitaire induite, puisque la déplétion des deux populations (CD4+ et CD8+) provoque une perte totale de la protection. Il serait maintenant intéressant d'étudier plus en détails les populations de cellules T impliquées dans la réponse immunitaire générée, les autres populations de cellules immunitaires, ainsi que la réponse inflammatoire globale induite (cytokines, chimiokines).

Il est à noter qu'une nécrose accidentelle de cellules tumorales par congélation-décongélation ou ébullition n'est pas capable d'induire une réponse immunitaire efficace *in vivo* (Casares et al. 2005 ; Kroemer et al. 2013 ; Vacchelli et al. 2014 ; Obeid et al. 2007 ; Apetoh et al. 2007). Cela suggère que nos résultats, comme ceux obtenus pour le peptide LTX-315, ne sont pas simplement la conséquence du relargage des composés intracellulaires dans le milieu, mais bien celle d'un mécanisme beaucoup plus régulé.

Pour conclure, bien que les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la réponse immunitaire induite par le peptide restent à élucider, l'ensemble de ces résultats est extrêmement encourageant, pour la mise au point d'une future immunothérapie, et ont fait l'objet d'une publication scientifique (**Prophylactic and therapeutic antileukemic effects induced by the AAC-11-derived peptide RT53**, Habault et al., *Oncoimmunology*, *in press*).

Cette approche possède l'avantage qu'il n'y a pas besoin de connaître l'antigène tumoral reconnu par les cellules T pour que le système

fonctionne. De plus, les blasts leucémiques peuvent être facilement obtenus à partir du sang ou de la moëlle osseuses de patients au moment du diagnostic, générant des quantités de matériel suffisantes pour un usage clinique. Étant donné que la protection induite par le vaccin est efficace même en utilisation thérapeutique, cette stratégie pourrait être réellement applicable chez les patients, notamment pour prévenir le risque de rechutes.



Abstract 030 (suite)

Figure 1 (suite)

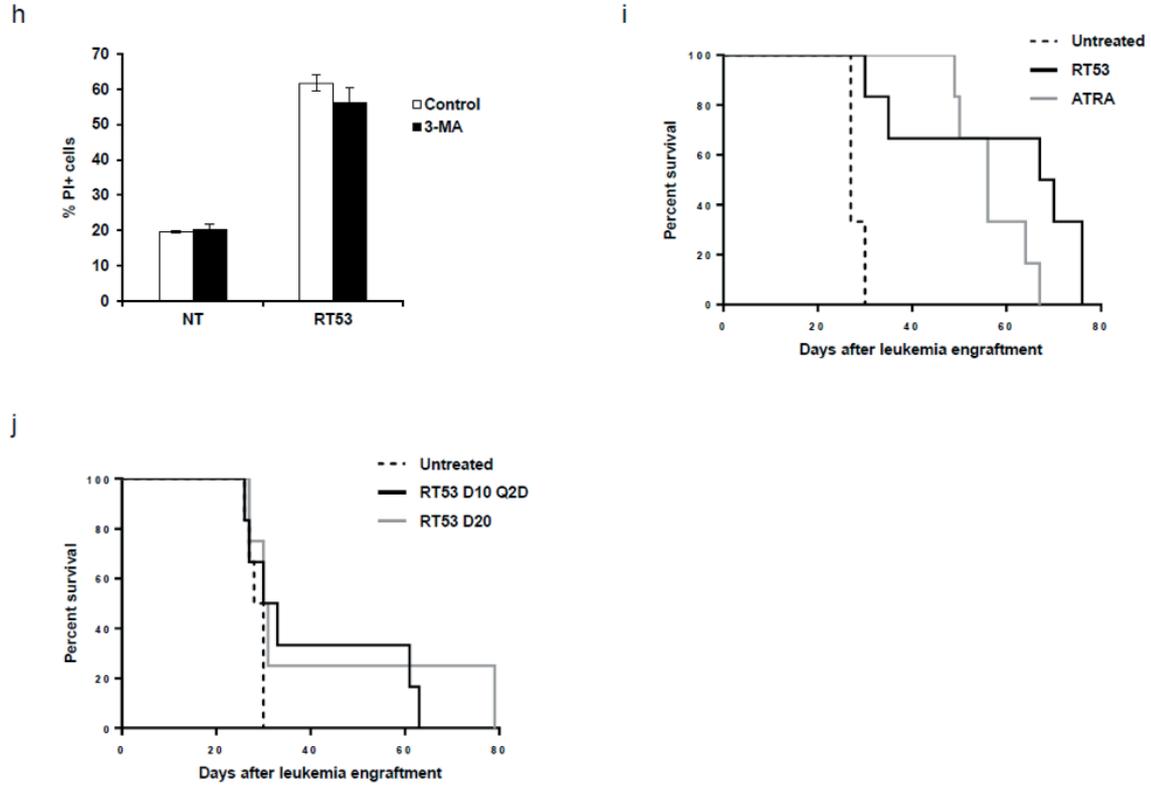


Figure 2

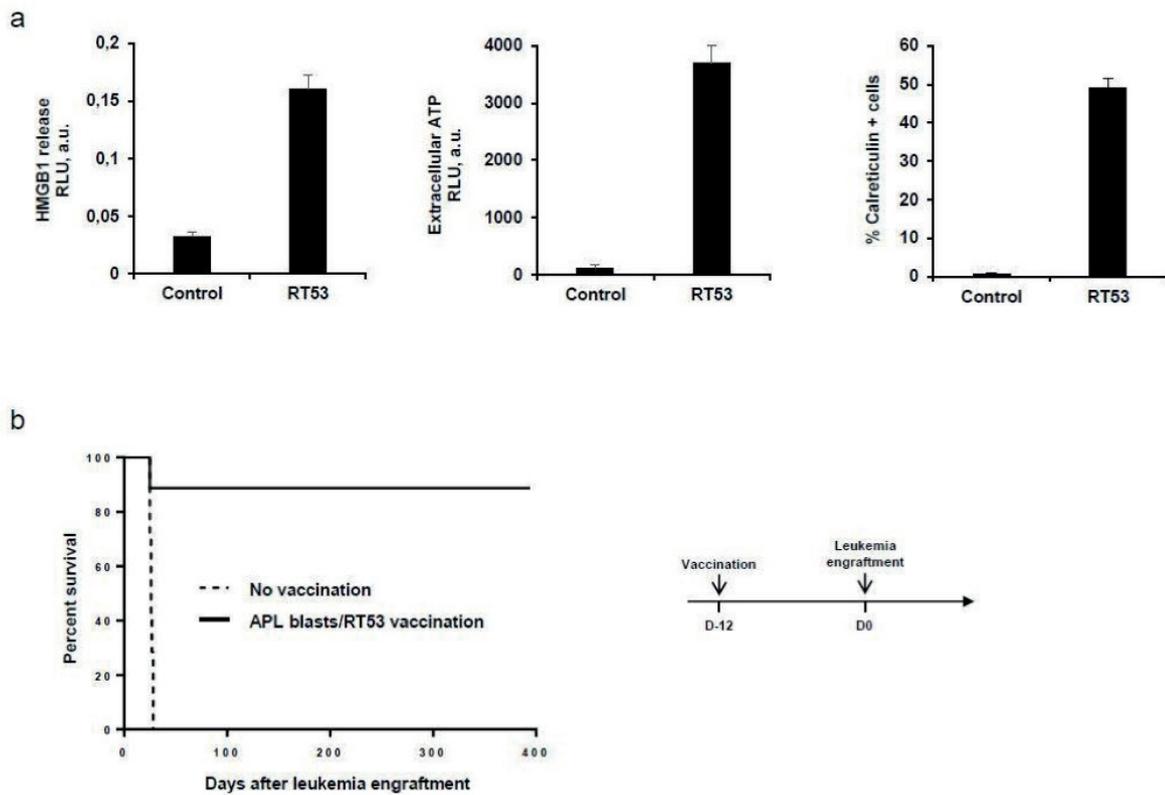


Figure 3

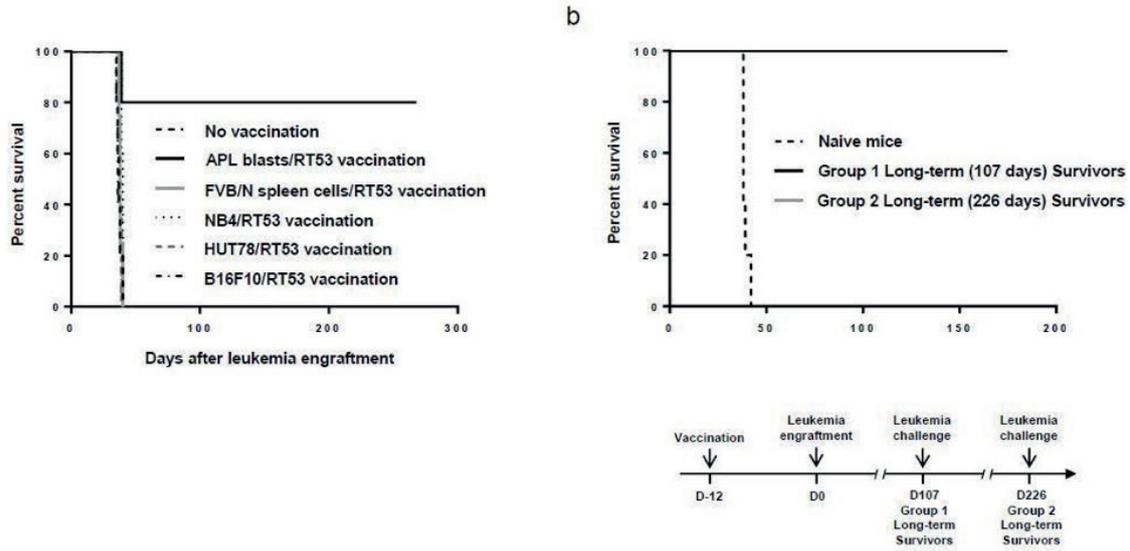


Figure 4

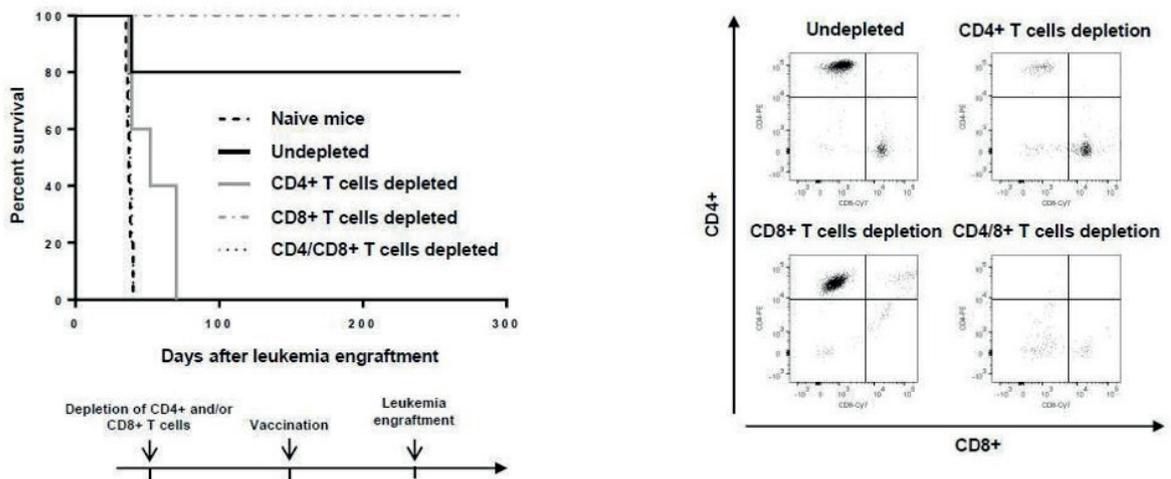
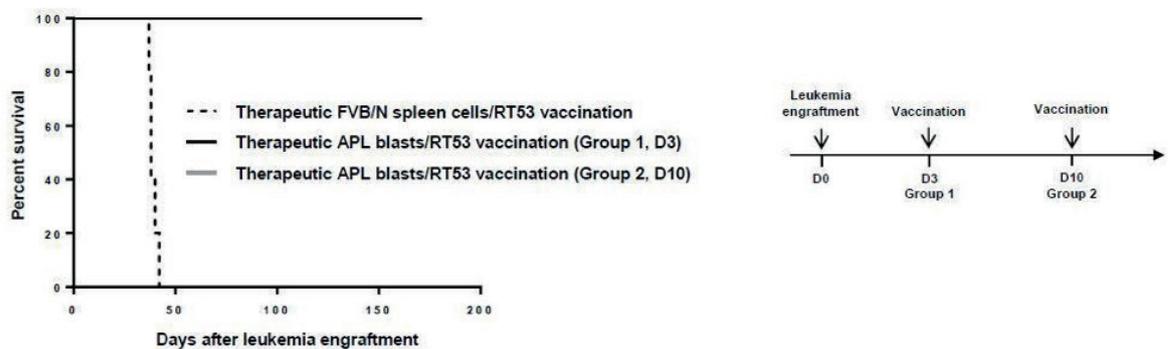


Figure 5



Abstract 031

Le rôle de PARP3 dans le cancer de la prostate

Daisy HARWOOD – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Françoise DANTZER

UMR7242, Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS), STRASBOURG

Contexte et objectifs. La poly(ADP-ribosylation) est une modification post-traductionnelle des protéines catalysée par les enzymes nommées Poly(ADP-Ribose) Polymérase (PARPs), une famille de 17 membres. Les objectifs actuels du laboratoire visent à décortiquer les fonctions biologiques du 3^{ème} membre de la famille, PARP3. Les données de la littérature décrivent un rôle important de cette protéine dans la réponse cellulaire aux cassures double-brins, dans la progression mitotique et dans la régulation transcriptionnelle chez le poisson zèbre. Plusieurs données récentes obtenues dans l'équipe révèlent un rôle essentiel de PARP3 dans la progression et l'agressivité tumorale dans le cancer du sein, en activant la voie de signalisation oncogénique mTORC2/Akt ou en favorisant l'EMT induite par TGF- β . Ce projet se construit sur ces dernières observations et vise à les valider dans un nouveau modèle au sein du laboratoire, le cancer de la prostate.

Méthodes. Nous cherchons à décortiquer le rôle de PARP3 dans ce cancer et à identifier les spécificités cellulaires et moléculaires mis en jeu pour ensuite explorer le bénéfice thérapeutique du ciblage de PARP3 dans le traitement du cancer de la prostate. Pour répondre à ces questions, nous disposons de 3 modèles cellulaires de cancer de la prostate (PC-3, DU-145, LNCaP). Nous avons d'abord confirmé l'expression de PARP3 dans les différents modèles cellulaires par Western Blot puis généré un premier modèle

(PC-3) déficient en PARP3 (knock-out) grâce à la technologie Crispr/Cas9. Le 2^e modèle KO (DU-145) est actuellement en cours. En parallèle, une déplétion de PARP3 grâce à la transfection de siRNA est effectuée dans les différents modèles en comparant aux cellules non traitées ou traitées avec un siRNA contrôle.

Résultats. Les premiers résultats montrent que l'absence de PARP3 induit un changement morphologique, les cellules sont plus fines et allongées. L'étude de la prolifération et de mortalité ne révèle pas de différence significative à des temps courts (4 jours). Les études de clonogénicité mettent en évidence une tendance des cellules au sein d'une colonie à se disperser en absence de PARP3. L'étude de l'expression de différents marqueurs de l'EMT indique une très forte diminution de l'expression de certains marqueurs épithéliaux (E-Cadhérine), et une augmentation de marqueurs mésenchymateux (Vimentine, TG2).

Discussion. Des études de migration ainsi que d'invasion seront prochainement réalisées pour évaluer la motilité et l'agressivité induite par l'absence de PARP3 dans ces cellules. Un projet d'évaluation de la capacité métastatique est également prévu par l'injection des cellules dans la veine caudale d'une souris immunodéprimée, puis d'évaluer les sites métastatiques, le nombre et le volume des tumeurs.

Abstract 032

Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse

Jades HEBRAS – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Jérôme CAVAILLÉ

CNRS UMR 5099, Bat IBCG, TOULOUSE

Parmi les ARN non-codants, les petits ARN nucléolaire à boîte C/D ou SNORDs exercent leurs fonctions régulatrices via des appariements avec les ARN ribosomiques (ARNr), afin de guider la synthèse de méthylations en 2'-O-ribose sur des nucléotides spécifiques. Notre compréhension des bases moléculaires régissant la dynamique des profils de méthylation de l'ARNr en fonction des conditions de croissance cellulaires voire dans des tissus cancéreux reste peu documentée. L'essentiel des données acquises à ce jour concerne des lignées cellulaires cultivées in vitro (HeLa, HTC116).

Dans l'article Hebras J. et al. de 2019 dans RNA Biology nous avons étudié la dynamique du profil de méthylation des ARNr dans les tissus de souris (adultes vs développement), travail réalisé en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. H. Nielsen à Copenhague, équipe qui a développé des approches pionnières (RiboMeth-seq) pour cartographier, à grande échelle, les méthylations en 2'-O-riboses sur les ARNr.

Nous avons profilé les méthylations de l'ARNr dans des ribosomes issus de tissus de souris adultes vs leurs équivalents lors du développement au stade E16.5. Les ARNr au cours du développement apparaissent globalement moins méthylés que ceux des tissus adultes. Ces observations suggèrent que les ribosomes des cellules en prolifération possèdent un profil de méthylation qui les distingue de ceux présents dans des cellules différenciées et quiescentes. Il y a cependant un contre-exemple: la position G4593 de la grande sous-unité ribosomique dont le niveau de méthylation diminue au cours du développement. Fait remarquable, l'expression de SNORD78, prédit pour guidée Gm4593, diminue au cours du développement et corrèle donc avec le niveau de la méthylation à G4593. Le gène de SNORD78 réside dans un intron de GAS5, un long ARNnc qui héberge huit autres SNORDs. Curieusement, l'expression de GAS5, mais aussi celle des autres SNORDs, restent relativement stable durant le développement. Cela implique un mécanisme spécifique, vraisemblablement post-transcriptionnel, qui

empêche la méthylation à la position G4593 via la baisse sélective d'expression SNORD78 dans les tissus adultes. Enfin, j'ai étudié la fonction potentielle de Gm4593 dans une lignée cellulaire humaine (HEK293) KO pour SNORD78 (CRISPR/Cas9). L'absence de cette méthylation n'altère pas la survie, l'apoptose ou le cycle cellulaire et des expériences avec des gènes rapporteurs montrent que l'absence de cette méthylation n'entraîne que des effets mineurs sur la fidélité du ribosome.

Ce travail montre que le profil des 2'-O méthylations des ARNr au cours du développement diffère de celui observé dans les tissus adultes. Ce travail soutient la notion de ribosomes spécialisés stipulant que le

ribosome est hétérogène sur le plan structural et fonctionnel. Enfin, on révèle une relation inattendue entre expression de GAS5 et production des SNORDs. L'expression de GAS5 est souvent dérégulée dans les cancers où il influence la mort et la prolifération cellulaire. Ce travail invite donc à examiner attentivement la méthylation guidée par SNORD78 dans les tissus cancéreux, et ce, indépendamment de l'expression de son gène-hôte.

Abstract 033

Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin

Aurélia JOLY – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Raphaël ROUSSET

Institut Sophia Agrobiotech - Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE - SOPHIA ANTIPOLIS

L'intestin de la drosophile est constitué d'un épithélium monostratifié qui se compose de deux types de cellules différenciées (entérocytes, cellules entéroendocrines) qui proviennent de cellules souches de l'intestin (ISC). Ces ISC permettent une régénération quotidienne, mais également après des agressions (bactéries, antibiotiques etc...), faisant de l'intestin de la drosophile un excellent modèle pour étudier la physiologie des cellules souches et les processus de régénération. Face aux incitations à réduire l'utilisation des pesticides chimiques au profit des bioinsecticides, celle de produits à base de spores de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt) représente 70% des ventes de bioinsecticides utilisés par des professionnels et des particuliers. Les insectes ravageurs de cultures ingérant ces spores de Bt meurent en quelques jours de septicémie suite à la formation de pores dans l'épithélium de l'intestin. Alors que l'ingestion de Bt n'engendre pas de toxicité aiguë chez les organismes non-cibles, les effets sur le long terme sont inconnus. Il est par contre connu que la présence de bactéries allochtones dans l'intestin active des voies de signalisation cellulaire déclenchant une réponse immunitaire. Ce contexte inflammatoire transitoire, bénéfique, permet une lutte efficace et un retour à l'homéostasie du tissu. Cependant, dans certains cas, une inflammation chronique de l'épithélium se développe, prédisposant à l'apparition de pathologies encore plus graves telles les cancers intestinaux. Il est ainsi légitime de se demander si la présence répétée de Bt dans l'intestin via les aliments cultivés avec ce type de bioinsecticides pourrait engendrer un contexte inflammatoire persistant, provoquant l'apparition de tumeurs, voire de cancers.

Dans mon travail de thèse, j'utilise la drosophile, modèle reconnu pour la conservation des mécanismes d'homéostasie intestinale et pour l'étude de maladies humaines, pour étudier les effets chroniques de l'ingestion des bioinsecticides Bt commerciaux. Les résultats obtenus sur drosophiles adultes montrent que l'ingestion chronique de spores Bt (utilisées à une dose réglementaire d'épandage) entraîne une mortalité précoce. Au niveau cellulaire, nous avons observé une désorganisation de l'épithélium et une altération des jonctions entre les cellules, correspondant à un vieillissement prématuré de l'intestin. De plus, des drosophiles présentant un intestin déjà inflammatoire (mutations dans la voie TNF/JNK) présentent une mortalité encore plus précoce, ce qui indique qu'un contexte sensibilisé aggrave d'autant plus les effets de Bt. Je veux maintenant étendre cette étude à des individus fragiles (jeunes ou âgés) et à des individus susceptibles, ou développant déjà, des tumeurs de l'intestin (mutations dans la voie Wnt/Wg). La physiologie de l'intestin et les processus moléculaires et cellulaires étant conservés, les résultats que j'obtiendrai faciliteront la mise en place d'études similaires sur des modèles vertébrés telle que la souris. A terme, mes travaux, s'ils révèlent une nocivité, conduiront à une évaluation objective des risques d'ingestion chroniques d'aliments biologiques traités avec des faibles doses de bioinsecticides Bt. Par la suite, certaines précautions d'utilisations et de consommations de ces produits pourront être mises en place, notamment pour des individus atteints de pathologies inflammatoires chroniques ou prédisposés à développer des tumeurs de l'intestin.

Abstract 034

Implication des bisphénols dans la tumorigénèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ER α 36 et BMP2

Nora JUNG – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Véronique MAGUER-SATTA
Inserm U1052, Centre Léon Bérard, LYON

Nora Jung¹, Irene Barguilla², Boris Guyot¹, Muriel Le Romancer³ and Véronique Maguer-Satta¹
1- Inserm U1052, CRCL, "BMP, tumoral niche & resistance", Lyon, France
2- Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain
3- Inserm U1052, CRCL, "Steroid signaling and breast tumor", Lyon, France

Les cellules souches sont entre autres régulées par leur microenvironnement qui peut participer à leur transformation lorsqu'il est perturbé. Le laboratoire a montré que BMP2 (B2) peut induire la transformation de cellules souches du sein et qu'il est anormalement produit par le microenvironnement de tumeurs mammaires. Une des origines de cette surproduction est l'exposition à des polluants environnementaux oestrogéno-mimétiques comme le BPA, également impliqué dans le développement de cancer du sein via son effet sur le récepteur à l'oestrogène alpha ER66. Depuis 2015, le BPA est remplacé dans l'industrie par des analogues (BPS, BPF, ...) ayant une faible affinité pour ER66, mais d'autres isoformes existent, comme ER36 dont l'activation par BPS ou BPF a été suggérée. Des données suggèrent aussi l'existence d'une interaction entre les signalisations ER36 et B2.

Ces données nous ont conduit à postuler un rôle des bisphénols via une coopération entre la signalisation B2 et celle d'ER36 dans les étapes de transformation de l'épithélium mammaire. Mon projet de thèse est 1)

étudier les effets fonctionnels des bisphénols seuls ou en combinaison avec B2 sur des progéniteurs mammaires humains et 2) identifier les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction entre les voies de signalisation ER36 et B2.

Pour cela, nous avons suivi l'effet d'une exposition chronique au B2, à l'E2, au BPA, au BPS et au BPF seuls ou en combinaison, sur l'activité et la transformation des cellules souches dans un modèle de progéniteur bipotentiel épithélial mammaire humain ER66-/ER46-/ER36+. Nous avons ainsi trouvé une augmentation du compartiment souche après une exposition chronique au BPS et au BPF, en présence de B2. Par la suite, nous avons identifié les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction entre les voies ER36 et B2 et nous avons montré l'existence d'une interaction physique entre ER36 et deux acteurs de la voie B2 : BMPRII et SMAD1.

L'étude de cette coopération permettra une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors du développement du cancer du sein. Cette étude est très prometteuse considérant le rôle déjà montré dans les cancers du sein d'une part du microenvironnement en général et de B2 en particulier et d'autre part de l'E2. Au-delà de son importance fondamentale, cette étude peut générer des résultats importants à la fois pour la prévention et le traitement des cancers du sein, mais aussi alimenter la réflexion sur la nécessité de réglementer l'utilisation de ces polluants.

Abstract 035

Complexes Thérapeutiques Nanométriques : Développement d'agents bimodaux IRM multifonctionnels ciblant le cholangiocarcinome

Memona KHAN – 1^{ère} année de thèse 2019

CNRS UMR 7244 - Univ. Paris 13 - UFR SMBH - Bobigny

Contexte et Objectifs. Le cholangiocarcinome (CCA), pathologie ciblée dans cette étude, est un véritable problème de santé publique puisqu'il est actuellement un cancer dévastateur avec un diagnostic difficile et tardif, dont l'incidence augmente partout dans le monde. De plus, l'essor de la biologie moléculaire a permis d'identifier peu de cibles thérapeutiques pertinentes pour le traitement du cholangiocarcinome. L'objectif proposé par notre recherche est de développer de nouveaux nano-médicaments visant à améliorer l'index thérapeutique des médicaments anticancéreux en modifiant leur pharmacocinétique et la distribution tissulaire. Par ailleurs, la valorisation de cette

étude, sa protection en 2018 et un article publié en 2019, démontrant l'intérêt de cette stratégie chimique, permettra d'accélérer la phase de développement biomédicale. L'idée consiste à mettre en œuvre une synthèse innovante de nanoparticules de polymères bimétalliques d'or-gadolinium, donnant naissance à des nouveaux nanomatériaux biocompatibles, de taille et morphologie extrêmement contrôlées. L'impact de ces systèmes sera évalué *in vitro* sur les cellules tumorales (KKU-213) et sphéroïdes 3D. Ces modèles *in vitro* permettront d'identifier et cibler les meilleurs édifices en terme d'efficacité de ciblage et thérapeutique pour passer à l'étape *in vivo* préclinique optimisée grâce à

des méthodes d'imagerie IRM non invasives reconnues comme méthode d'évaluation *in vivo* suivant la règle des 3R, de raffinement et réduction.

Méthodes. Dans le cadre de ce projet, des effets synergiques seront étudiés comme i) le réchauffement hyperthermique sous forme d'ablation thermique et/ou ii) l'imagerie Raman par irradiation NIR. iii) spectroscopie Raman, iv) résonance plasmonique de surface (SPR). L'imagerie par bioluminescence fournira une détection fonctionnelle des cellules cancéreuses implantées dans des modèles murins. Ces technologies évalueront l'efficacité de nouvelles sondes lors de leur synthèse afin d'optimiser leur conception, de cribler les plus efficaces, et de les valider jusqu'au stade préclinique biodynamique *in vivo*.

Résultats. La première partie de cette étude a démarré par la synthèse et caractérisation physico-chimique des nanoparticules hybrides Au-Gd sous forme de bâtonnets enrobés par des molécules de polymère

biocompatible (PEG-diacide). Les nanomatériaux hybrides ont été greffés par un agent actif anticancéreux (Doxorubicine) sous deux configurations chimiques. Les caractérisations physico-chimiques par Raman et les images obtenues par IRM ont montré une relaxivité importante de ces nanomatériaux Au-Gd. Les résultats d'hyperthermie et le test préliminaires en MTT, ont montré la synergie et l'efficacité de ces nanovecteurs bimodaux.

Discussion. Nous avons montré que les nanobâtonnets bimodaux, enrobés par un principe actif anticancéreux (DOX), agissent de façon sélective selon la configuration et présentent un double avantage, notamment pour la diagnostique et la thérapie du cholangiocarcinome.

Abstract 036

Étude du rôle du TGF-beta dans le contrôle de la réactivité des lymphocytes T contre les antigènes tumoraux

Ossama LABIAD – 1^{ère} année de thèse 2018
 Inserm U1052 - CNRS UMR5286 - CRCL Lyon

Auteurs : **Ossama Labiad**, Alexandra Lainé, Julien C Marie

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon - Département d'échappement tumoral, résistance et immunologie - INSERM, CNRS, Centre Léon Bérard, université de Lyon, Hospice civil de Lyon

L'une des particularités des cellules cancéreuses est leur faible capacité à activer le système immunitaire. Ce caractère immunogène limité contribue fortement au maintien des cellules cancéreuses et à la croissance tumorale. Un des enjeux de la recherche en oncologie de demain est donc de déterminer les facteurs responsables de la faible immunogénicité, des tumeurs pour proposer des cibles thérapeutiques efficaces. Les tumeurs solides expriment des grandes quantités de Transforming Growth Factor beta (TGF-β), une cytokine hautement immunosuppressive dont l'action est principalement ciblée sur les lymphocytes T, en limitant fortement leur action anti-tumorale. L'objectif de mes travaux de thèse est d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le TGF-β réprime l'activation des lymphocytes T CD8 contre les cellules cancéreuses.

Au moyen de cellules cancéreuses exprimant ou pas du TGF-β, nous avons confirmé *in vivo* la source principale du TGF-β dans la tumeur sont les cellules cancéreuses. Ce TGF-β va être produit sous forme inactive. Il a été montré au sein du laboratoire qu'une population de

lymphocyte T régulateur va permettre son activation et ainsi réprimer l'activité des lymphocytes T CD8. L'utilisation de souris dont uniquement les lymphocytes T CD8 sont, soit déficients pour le récepteur au TGF-β, soit expriment une forme constitutivement active de ce récepteur, j'ai pu démontrer que le signal du TGF-β augmente le seuil d'activation des lymphocytes T CD8 contre les antigènes tumoraux. Ainsi, mes travaux montrent que le signal donné par le TGF-β aux lymphocytes T réprime la signalisation de leur TCR, et donc leur capacité à répondre aux antigènes de plus faible affinité portés par les cellules cancéreuses. En conséquence, le programme d'activation cytotoxique des LT CD8 est profondément diminué au sein des tumeurs (seins, mélanome...) conduisant à une maintenance des cellules cancéreuses et à la croissance des tumeurs.

Ainsi au cours de ces 1,5 années de thèse, nous avons pu mettre en évidence que les cellules cancéreuses, en concert les lymphocytes T régulateurs, créent un environnement tumoral riche en TGF-β actif qui réprime l'activation des lymphocytes T CD8 contre les cellules cancéreuses en positionnant la signalisation du TCR dans une forme inactive, rendant la mise en place d'une réponse anti-tumorale plus difficile. La découverte de ce mécanisme clef de l'échappement des tumeurs au système immunitaire, ouvre la voie vers le ciblage spécifique de l'action du TGF-β afin de permettre une réponse immunitaire efficace contre les cellules cancéreuses.

Abstract 037

Régulateurs de l'expression de PD-L1 dans le mélanome : approche de criblage innovante pour identifier des médicaments efficaces dans le traitement du mélanome cutané

Sophie LACHAUD – 1^{ère} année de thèse 2017
Inserm U1186 – Gustave Roussy – Villejuif

Le mélanome est une tumeur qui se développe à partir de cellules épidermiques appelées mélanocytes. Bien qu'il ne représente qu'environ 1% des cancers cutanés, le mélanome est responsable de 75% des décès dus aux cancers de la peau. Ces dernières années ont vu l'émergence de nouvelles thérapies qui ont significativement améliorées la durée de vie des patients. Parmi ces nouveaux traitements, l'immunothérapie suscite énormément d'espoirs.

Ces thérapies sont des anticorps monoclonaux qui agissent en activant le système immunitaire, notamment les lymphocytes cytotoxiques (cellules T CD8) contre les cellules cancéreuses. En effet, le mélanome, qui est connu pour être très immunogène, va induire une réponse immunitaire cytotoxique s'accompagnant de la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ . L'IFN- γ va entraîner une surexpression de PD-L1 à la membrane plasmique du mélanome, qui est un ligand du récepteur PD-1 situé à la surface des lymphocytes cytotoxiques. Cette liaison va inhiber les fonctions cytotoxiques des cellules T notamment et permettre l'échappement du mélanome au système immunitaire. Les dernières immunothérapies commercialisées bloquent l'interaction entre le ligand PD-L1 et son récepteur PD-1, rétablissant ainsi la cytotoxicité des cellules T envers le mélanome. Ces traitements montrent une efficacité chez certains patients mais ils demeurent très onéreux et leur administration est contraignante. De plus, de nombreuses données cliniques semblent indiquer que les mélanomes métastases assez tôt et que les cellules immunitaires maintiennent ces métastases à un niveau microscopique non détectable, jusqu'à épuisement des lymphocytes T. Dans ce contexte,

le traitement précoce des patients avec des médicaments anti-PD-L1 après chirurgie sur des mélanomes à fort risque métastatique pourrait donc prévenir des métastases et d'une future rechute.

Notre projet vise à mieux comprendre comment les cellules cancéreuses interagissent avec les cellules immunitaires afin de proposer de nouveaux traitements en préventifs, plus accessibles et moins contraignants pour les patients. Plus précisément, nous identifions tous les gènes relevant d'un point de vue thérapeutique et régulant l'expression de PD-L1 à la membrane plasmique des mélanomes, pour ensuite les inhiber. En effet, en prévenant l'expression de PD-L1 induite par l'IFN- α , on suppose qu'il est possible de prolonger la réponse des lymphocytes T cytotoxiques et de limiter ainsi la progression tumorale à la manière des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1.

Les deux principaux axes de mon projet de recherche sont donc :

- d'identifier *in vitro*, en utilisant des lignées de cellules de mélanome humaines, les régulateurs de l'expression de PD-L1 induit par l'IFN- α à la membrane plasmique des mélanomes
- de valider *in vivo*, dans la souris en préclinique, que leur inhibition stimule la réponse immunitaire anti-tumorale

L'innovation de ce projet réside dans son approche de criblage rapide et cliniquement pertinente pour identifier en une seule fois l'ensemble des cibles médicamenteuses qui éviteraient potentiellement l'inactivation des lymphocytes T.

Abstract 038

Foxp3 regulatory T cells activate tumor-produced TGF-beta: a key mechanism to prevent T cell anti-tumor immune response

Alexandra LAINE – 4^e année de thèse 2018

Lainé A.¹, Labiad O.¹, Hernandez-Vargas H.¹, This S.², Sanlaville A.¹, Bernet V.¹, Paidassi H.², Travis M. A.³ and Marie J. C.¹
1- INSERM U1052/CNRS UMR 5286. Department of Immunity, Virology and Inflammation. Cancer Research Center of Lyon.
2- INSERM U1111/CNRS/UMR5308. Center of Infectiology Research of Lyon.
3- Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research, University of Manchester.

A large part of solid tumors express high amounts of Transforming Growth Factor beta (TGF- β), known as a potent suppressor of the immune system. However, TGF- β is secreted under its inactive form

and how TGF- β produced by the tumor is activated remains totally unknown. Here, we demonstrated that tumor-produced TGF- β is activated by the avb8 integrin (Itgb8) expressed at the surface of Foxp3 regulatory T cells (Tregs). The selective deletion of Itgb8 in Tregs impairs TGF- β signaling in tumor infiltrating T cells. Subsequently, the cytotoxic program of effector T cells is activated, leading to efficient tumor cell-apoptosis and control of the tumor burden. The relevance of our data found in mice was confirmed in the human pathology. Thus, our study reveals that Tregs and tumor cells work together to allow the suppressive effect of the TGF- β on effector T cells, which consequently impacts tumor progression.

Abstract 039

New therapeutic weapons to induce selective killing of myeloma cells

Jean-Marie LAMBERT – 4^e année de thèse 2019

Jean-Marie Lambert, Mohamad Omar Ashi, Nivine Srour and Laurent Delpy¹.

1- UMR CNRS 7276 - INSERM 1262 - Université de Limoges, CRIBL (Control of the B-cell Immune Response and Lymphoproliferations), Limoges, France.

The production of monoclonal immunoglobulins (Ig) is a hallmark of multiple myeloma (MM). Recent advances in exon skipping therapy using splice switching oligonucleotides (SSO) prompted us to examine a new antisense strategy targeting the variable (V) exon in myeloma cells (Delpy et al, patent W02017089359). Indeed, we previously observed that the production of truncated Ig light chains, encoded by alternatively spliced mRNAs lacking V exon, heightened endoplasmic reticulum (ER) stress and provoked rapid apoptosis of antibody-secreting plasma cells (Srour et al, J Exp Med 2016). We designed SSO targeting the V exon, at either the

5' or 3' splice site (ss), in Igλ- (RPMI8226) and Igκ-expressing (SK-MM-2) myeloma cells. We found that SSOs were very potent alternative splicing inducers leading to elevated production of V-domain-less truncated Ig chains. Remarkably, *in vitro* experiments and *in vivo* tumor xenografts revealed that myeloma cells were highly sensitive to specific SSO treatment, compared to irrelevant control-SSO. RNA-seq experiments further confirmed that the SSO-mediated production of truncated Ig provoked a massive myeloma cell death through an exacerbated ER stress-associated apoptosis. In addition, high throughput sequencing of Ig repertoire demonstrated that SSO treatments induced selective elimination of the targeted PC clones, while sparing the other ones. Collectively, these data provide evidence that SSO targeting the V exon of monoclonal Ig can emerge as new weapons to induce selective death of myeloma cells (Lambert et al, in preparation).

Abstract 040

Inhibition of CD147/VEGFR-2 interaction decreases malignant phenotype of melanoma models

Alexandra LANDRAS – 1^{ère} année de thèse 2017

Authors: Alexandra Landras¹, Coralie Reger De Moura^{1,2}, Aurélie Sadoux^{1,2}, Maxime Battistella^{1,5}, Bruno Villoutreix³, Juan Fernandez-Recio⁴, Céleste Lebbé^{1,6}, Samia Mourah^{1,2}

Affiliation: 1- Inserm, UMR_S976, Paris, France, Univ. Paris- Sorbonne Cité, F-75010, France ; 2- Pharmacogenomics Department, Saint-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France ; 3- Univ. de Lille - Pasteur Institute Lille - Inserm U1177 ; 4- Life Sciences Department, Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain ; 5- Pathology Department, Saint-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France ; 6- Dermatology Department, Saint-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France.

Introduction: Tumor-stroma interactions promote malignancy by modifying tumor microenvironment. CD147 a membrane glycoprotein enriched on the surface of tumor cells, is an important mediator of tumor-stroma cooperation by promoting tumor progression. CD147 overexpression is associated with poor prognosis in cancers including melanoma. CD147 has already been characterized as a new coreceptor for VEGFR-2 and is therefore a promising target for blocking tumor-related progression.

Objectives: In this study we evaluated an antagonist peptide strategy blocking the interaction between CD147 and VEGFR-2, as a potential anti-tumor approach in melanoma.

Material and methods: Computational docking analyses and mutagenesis studies led us to design small peptide targeting CD147/VEGFR-2 interaction site (CD147i). The anti-tumor effect of CD147i was

evaluated *in vitro* on several melanoma cell lines (Skmel5, Skmel28, BLM, C8161 and MeWo) using cell viability and migration, adhesion assays, and *in vivo* in Nude mice melanoma xenografted models. CD147 and VEGFR-2 interaction and VEGFR-2 dimerization were analyzed by *in situ* proximity ligation assay (PLA).

Results: *In vitro* studies showed a significant decrease in proliferation and migration of NRAS mutated melanoma cell lines (proliferation: 51%, 55% and migration: 73%, 48% for BLM and C8161 cell lines respectively) in presence of CD147i compared to control peptide. A moderate effect was observed in BRAF mutated models (proliferation: 33% for SKMEL28 cells) and no effect was retrieved in BRAF/NRAS wild-type cell lines. Importantly in mice, CD147i inhibited tumor growth in NRAS mutated melanoma xenograft tumors. These functional *in vitro* and *in vivo* effects were associated with a significant decrease of CD147/VEGFR-2 interaction as well as VEGFR-2 dimerization, confirming target achievement.

Conclusion: These data provide a proof of concept of the impact of CD147/VEGFR-2 interaction inhibition in melanoma progression and pave the way for further pharmacological studies to better characterize this innovative anti-tumor strategy.

Abstract 041

Implication du métabolisme dans la résistance de l'ostéosarcome aux inhibiteurs des protéines à bromodomains

Mélanie LAVAUD – 1^{ère} année de thèse 2018

Auteurs : Lavaud Mélanie¹, Tesfaye Robel^{1,2}, Georges Steven¹, Charrier Céline¹, Baud'huin Marc¹, Lamoureux François¹, Ory Benjamin^{1,2}
Affiliations : 1 Université de Nantes, INSERM, Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés, UMR 1238, Nantes, France ; 2 Niches et épigénétique des tumeurs, Cancéropôle Grand Ouest

Les taux de survie des patients atteints d'ostéosarcome, la plus fréquente des tumeurs malignes d'origine osseuse, n'ont pas été améliorés depuis les années 1970. Il devient donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre cette pathologie. Récemment, des inhibiteurs des protéines à bromodomains ont été développés et ont prouvé leur efficacité dans l'inhibition du développement de l'ostéosarcome. Cependant, il a été constaté qu'une résistance à ces inhibiteurs pouvait se développer. Afin de comprendre par quels mécanismes les cellules d'ostéosarcome développent une résistance à ces inhibiteurs, nous avons développé une lignée résistante au JQ1, l'une des molécules inhibitrices des protéines à bromodomaine. Pour cela, nous avons cultivé une lignée d'ostéosarcome (HOS-MNNG) avec des doses progressivement croissantes de JQ1. Nous avons ensuite validé notre modèle de cellules résistantes (HOS-MNNG JQ1R) par des tests de viabilité et de clonogénicité. Des analyses haut débit de RNA-sequencing et de TaqMan Low Density Array ont permis d'identifier les gènes et les microARNs différenciellement exprimés entre les deux types cellulaires. L'analyse de ces données, nous a

permis d'identifier une surexpression du gène *LDHA* chez les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1. De plus, le micro-ARN 34a, qui cible l'ARNm de ce gène, s'avère être sous-exprimé chez les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1. LDHA est une enzyme métabolique qui joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique des cellules. En conditions hypoxiques, LDHA permet un shift de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse anaérobie pour permettre la production d'ATP. En revanche, il est connu que les cellules cancéreuses, peuvent produire leur énergie par utilisation de la glycolyse anaérobie, même en conditions normoxiques. On parle d'effet Warburg. LDHA joue un rôle crucial dans la mise en place de ce phénomène. L'inhibition de cette enzyme permet de diminuer la viabilité des cellules cancéreuses. Cette enzyme est aussi impliquée dans les phénomènes de chimiorésistance du sarcome d'Ewing et du cancer du côlon au cetuximab et au 5-fluorouracil respectivement. Nous nous intéressons donc au rôle de LDHA dans la résistance de l'ostéosarcome vis-à-vis du JQ1. Nous avons montré que les cellules résistantes au JQ1 présentent une expression et une activité de cette enzyme plus importante que les cellules HOS-MNNG. De plus, une surexpression de LDHA, diminue la sensibilité des cellules HOS-MNNG au traitement JQ1. Enfin nous avons montré que l'inhibition de l'expression et de l'activité de LDHA diminue la résistance au JQ1 des cellules HOS JQ1R. Il semblerait donc qu'un shift métabolique favorise la résistance des cellules d'ostéosarcome vis-à-vis des inhibiteurs des protéines à bromodomains.

Abstract 042

L'activité physique spontanée en condition d'obésité favorise l'immunité anti-tumorale conduisant à un ralentissement de la croissance tumorale mammaire

Delphine LE GUENNEC – 1^{ère} année de thèse 2017

Auteurs : **Delphine Le Guennec**, Marie Goepp, Stéphanie Rougé, Marie-Chantal Farges, Jérémie Talvas, Nicolas Goncalves-Mendes, Aïcha Demidem, Florence Caldefie-Chézet, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary
Laboratoire de biochimie, biologie moléculaire et nutrition, Equipe ECREIN, Unité de Nutrition Humaine, INRA, Université Clermont Auvergne.

L'immunosénescence se caractérise par une détérioration du système immunitaire due au vieillissement, affectant à la fois la fonction et le phénotype des cellules de l'immunité innée et adaptative. L'expression et l'activité des récepteurs sont diminuées, contribuant à la perte des fonctions immunitaires telles que le chimiotactisme et la destruction cellulaire. Le système immunitaire vieillissant est caractérisé par un environnement pro-inflammatoire avec la sécrétion de cytokines telles qu'IL-1, TNF- α et l'IL-6. L'obésité favorise le développement de cancer

du sein, en particulier en post-ménopause par son activité pro-inflammatoire. A l'inverse, l'activité physique est un facteur de prévention de l'obésité, de l'immunosénescence et des cancers grâce à une réponse anti-inflammatoire accrue et une stimulation du système immunitaire. Notre but est d'évaluer l'effet de l'activité physique spontanée sur l'immunité tumorale.

Des souris C57BL/6 âgées (n=10/groupe, 33 semaines), ovariectomisées, nourries avec un régime hyper-lipidique, sont hébergées en environnement standard (ES) ou en environnement enrichi (EE). Après 4 semaines, une implantation orthotopique de cellules E0771 est réalisée afin d'explorer au sacrifice le phénotypage immunitaire au sein des organes immunitaires secondaires et de la tumeur, ainsi que les cytokines dans la tumeur, le gastrocnémien et le plasma.

L'environnement enrichi diminue les marqueurs circulants reconnus d'activité physique comme la myostatine et l'IL-6. La croissance tumorale est ralentie chez les souris en EE comparées aux souris en ES (EE = $634 \pm 388 \text{ mm}^3$, ES = $1572 \pm 678 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$). En EE, le poids du thymus n'est pas modifié malgré une baisse des CD4+CD8- et CD4-CD8+. Cependant, le poids de la rate et des ganglions inguinaux sont diminués par rapport à l'ES, sans modification des cellules immunitaires lymphoïdes de ces organes. Une corrélation positive entre la taille de la rate et le volume tumoral est observée indépendamment de l'environnement. Au sein des tumeurs, l'EE induit une baisse de la quantité des cellules lymphoïdes

avec une baisse des Th2 (0,9%), des Treg (20,1%) et des MDSCs (13,6%); et à l'inverse une quantité plus importante de Tc (14,6%) et de TAMs (22,6%). Alors qu'aucune modification des NK tumoraux n'est observée, la granzyme B est augmentée ainsi que l'expression de la perforine 1 et de la granzyme A.

Ces résultats montrent que l'activité physique spontanée en condition d'obésité ralentie la croissance tumorale en diminuant l'inflammation de bas grade, en modulant le recrutement et l'efficacité du système immunitaire au sein de la tumeur.

Abstract 043

Identification of a Novel Subset of Neutrophils in scRNAseq Data from Lung Cancer Patient's Peripheral Blood

Pacôme LECOT – 4^e année de thèse 2019

Pacôme Lecot¹, Maude Ardin¹, Sébastien Dussurgey², Hector Hernandez-Vargas¹, Lyvia Moudombil¹, Christophe Caux¹, Marie-Cécile Michallet¹

1- Department of Immunity, Virus, and Inflammation (IVI), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France

2- Anira Cytometry platform, US8/UMS 3444/SFR Gerland Biosciences, 69366 Lyon, France

Neutrophils is the most represented immune cell type in human peripheral blood. They can either promote or prevent the establishment of systemic autoimmune or infectious diseases. In cancer patients with solid tumors, peripheral blood neutrophils are more likely associated with disease progression. Low-density neutrophils (LDNs) expand in a subset of cancer patient's blood, which is linked to a poorer prognosis.

Neutrophils can also interact with platelets, to form neutrophil-platelet aggregates (NPAs) leading to activation of the pro-inflammatory functions of neutrophils. However, the characterization of NPAs in cancer remains unexplored. By using imaging flow cytometry, we could detect NPAs in lung cancer patient's peripheral blood. We found that platelet aggregation was restricted to LDNs in contrast to normal density neutrophils (NDNs). Using public scRNAseq data from lung cancer patient's peripheral blood, we could identify a subset of neutrophils expressing platelet-specific genes, relating to NPAs, among five other neutrophil subpopulations. Interestingly, downstream transcriptomic analysis of platelet gene-expressing neutrophils compared to the other neutrophil subsets revealed that NPAs displayed a higher enrichment of the oxidative phosphorylation gene signature. Taken together, our results suggest that neutrophils from NPAs are a distinct subpopulation of neutrophils that may possess a specific function in cancer, which remains to be investigated.



Abstract 044

Contrôle de la plasticité épithélium/mésenchyme : approches génomiques chez la drosophile

Alexandra MANCHENO-FERRIS – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : François PAYRE

CNRS UMR 5547, Centre de Biologie du Développement, TOULOUSE

A. Mancheno-Ferris¹⁻³, P. Lhoumaud²⁻³, S. Plaza¹⁻³, O. Cuvier²⁻³,
C. Polesello¹⁻³, F. Payre¹⁻³

1. Centre de Biologie du Développement ;
2. Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote ;
3. Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est nécessaire au développement embryonnaire, à l'homéostasie des cellules souches adultes et est bien connue pour être impliquée dans les pathologies humaines, y compris la formation de métastases. Les facteurs de transcription *OvoL1-3* sont des stabilisateurs épithéliaux essentiels, régulant la plasticité épithéliale / mésenchyme (E/M), propriété importante des cellules souches normales et cancéreuses. De plus, le profilage des tumeurs montre l'implication d'*OvoL1-3* dans l'agressivité du cancer. Malgré la richesse des informations concernant les fonctions d'*OvoL*, le mode d'action moléculaire reste à élucider. Pour répondre à cette question, notre équipe s'appuie sur les avantages de la drosophile, la mouche du vinaigre, comme modèle *in vivo*. Chez les mouches, il existe un seul gène *ovo/shavenbaby (svb)*, ce qui facilite l'analyse fonctionnelle. Des travaux antérieurs ont montré le rôle clé de *Svb* dans la morphogenèse épidermique ainsi que dans le contrôle des cellules souches adultes digestives. *Svb* est traduit en une forme longue répressive, *SvbREP*, puis clivé post-traductionnellement en une forme active plus courte, *SvbACT*, en réponse à la présence de peptides régulateurs *smORF* qui transmettent la signalisation systémique stéroïdienne.

Pour déchiffrer le comportement des deux formes, nous avons utilisé des modèles cellulaires (cellules S2) permettant l'expression inductible de *SvbACT* ou de *SvbREP* et avons entrepris le profilage génomique de leur liaison à la chromatine (ChIPseq), et l'analyse de l'expression des gènes cibles (RNAseq). De plus, en tirant parti du grand nombre de données disponibles dans les cellules S2, nous avons comparé le comportement des formes *Svb* avec plusieurs aspects du paysage chromatinien.

En intégrant et en comparant ces données, mes analyses montrent que *SvbACT* et *REP* :

- 1) Se lient aux mêmes régions génomiques, enrichies d'un motif spécifique, correspondant à des séquences régulatrices (enhancers) de développement et situées dans des domaines ouverts de la chromatine
- 2) Contrôlent de manière antagoniste l'expression d'un ensemble commun de gènes cibles
- 3) Les enhancers cibles de *Svb* connues dans l'épiderme sont dans des régions de chromatine répressive et ne sont pas activées dans notre modèle cellulaire.

Nos résultats suggèrent fortement que l'activité transcriptionnelle du *Svb* dépend de l'environnement spécifique de la chromatine. En outre, nos travaux actuels se concentrent sur la possibilité que le passage de *SvbACT/SvbREP* modifie l'organisation chromosomique.

Abstract 045

Développement d'anticorps pH-dépendants avec un meilleur profil de sécurité pour l'immunothérapie du cancer

Tristan MANGEAT – 1^{ère} année de thèse 2017Tristan Mangeat¹, Pierre Martineau¹ and Bruno Robert¹

1- IRCM-INSERM U1194, University Montpellier, Montpellier, France

Contexte et objectifs : La survie globale des patients atteints de cancers même à un stade avancé a été améliorée avec les traitements à base d'anticorps monoclonaux. Plus récemment, des anticorps couplés à des drogues cytotoxiques ou ADCs (*Antibody Drug Conjugates*) ont permis de limiter la survenue de récurrences liées notamment à l'hétérogénéité tumorale. [1]. Cependant, plusieurs études pré-cliniques et cliniques ont montré que la fixation des ADCs, et donc la libération des drogues cytotoxiques au sein du tissu sain exprimant la cible, peut conduire à des toxicités importantes [2,3]. Afin d'éviter la liaison des ADCs à la cible exprimée par le tissu sain, nous souhaitons

tirer profit de l'acidification spécifique du microenvironnement tumoral. Ce phénomène, appelé effet de *Warburg*, provient de la métabolisation préférentielle du glucose en acide lactique par les cellules tumorales. L'export du métabolite s'accompagne alors d'une acidification du milieu extracellulaire [4,5]. La stratégie consiste à développer des anticorps pH-dépendants, c'est-à-dire capable de se lier à leur cible à pH acide (pH 6-6,8) au niveau tumoral et ayant une très faible fixation ou, dans l'idéal, nulle sur la même cible présente sur le tissu sain à pH physiologique (pH 7,2-7,4).

Méthodes : Nous avons mis au point une nouvelle méthode de sélection et de criblage de fragments d'anticorps ou scFvs par *phage display* afin d'identifier des anticorps pH-dépendants dirigés contre un récepteur à activité tyrosine kinase, exprimé dans de nombreux cancers, mais

aussi présent au niveau des cellules saines du système immunitaire. L'évaluation de la fixation pH-dépendante des anticorps sur la protéine recombinante a été réalisée par ELISA et SPR. Différentes lignées cancéreuses et cellules saines immortalisées, exprimant la cible d'intérêt avec des niveaux d'expressions variables, ont servi à évaluer la liaison et l'internalisation des anticorps par cytométrie en flux et immunofluorescence.

Résultats : A l'issue de sélections en condition acide par *phage display* avec des banques de scFvs [6,7], 11 scFvs ont été sélectionnés pour leur fixation à pH acide et leur ratio de fixation pH acide/pH physiologique. La majorité des scFvs reformatés au format IgG1 humaine conservent une très bonne liaison pH-dépendante à la protéine recombinante. Les deux meilleurs anticorps présentent également une meilleure fixation à pH acide qu'à pH physiologique sur différentes lignées tumorales et une absence de fixation au récepteur exprimé par les cellules saines immortalisées à pH physiologique. Enfin, ces deux anticorps sont capables d'internaliser le récepteur.

Discussion : Il est donc maintenant envisagé d'évaluer la cytotoxicité de ces anticorps sur des lignées cancéreuses et de démontrer l'intérêt d'ADCs pH-dépendants. A l'aide d'une étude *in vivo* de biodistribution de ces anticorps, nous souhaitons également montrer leur spécificité de ciblage tumoral.

Référence

- [1] G. von Minckwitz *et al.*, *NEJM* (2019)
- [2] P. A. Ott *et al.*, *J Clin. Oncol.* (2014)
- [3] C. M. Annunziata *et al.*, *Invest New Drugs* (2013)
- [4] O. Warburg, *Sciences* (1956)
- [5] A. Anemone *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.* (2019)
- [6] P. Philibert *et al.*, *BMC Biotechnol.* (2007)
- [7] G. Robin *et al.*, *Journal of Molecular Biology* (2014)

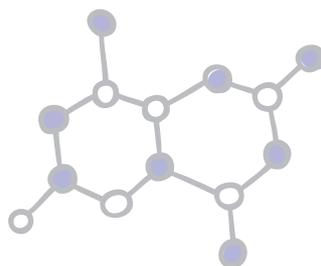
Abstract 046

Lumière sur les cellules tumorales

Hussein MEHIDINE – 1^{ère} année de thèse 2017
 CNRS UMR 8165 - IN2P3 - Orsay

Le cancer du cerveau se considère parmi les cancers les plus mortels qui attaquent les humains. Parmi les différents types des tumeurs cérébrales, le glioblastome est le plus grave en terme de malignité, et d'évolution. Sa thérapie principale consiste à la résection chirurgicale complète du volume tumoral. Le défi principal de cette intervention neurochirurgicale consiste à obtenir une identification précise des marges de la tumeur afin de réaliser une résection complète. Autour de la partie solide de la tumeur, il existe une zone d'infiltration contenant des cellules tumorales actives et qui envahissent les cellules saines, où l'incapacité à visualiser complètement les limites d'infiltration entraîne une résection non complète ce qui augmente les risques de récurrence. De même, le retrait inutile de tissu cérébral ne contenant pas de cellules cancéreuses peut entraîner des déficits neurologiques majeurs nuisant à la qualité de la vie du patient et conduit à de mauvais résultats chirurgicaux. La seule technique qui permet d'avoir un diagnostic précis sur ces zones d'infiltration est l'analyse histologique du prélèvement tumoral, mais elle s'intervient après l'opération et nécessite plusieurs jours pour obtenir les résultats. Pour adresser ce challenge, notre équipe

du laboratoire IMNC développe un nouvel outil optique qui permet d'imager, en per-opératoire, les zones tumorales à l'échelle cellulaire afin d'obtenir une information rapide et précise sur la nature tissulaire. Cet outil est un endomicroscope multimodale capable de détecter la fluorescence des différentes molécules endogènes présentes dans les cellules humaines sans aucun ajout de substances chimiques ou des marqueurs spécifiques. En plus, il est capable de détecter la génération de seconde harmonique (SHG) provenant des fibres de collagènes, indice de vascularisation dans les tissus. Mais le développement d'un tel outil nécessite en parallèle la mise en place d'une banque de données tissulaires englobant les différentes modalités d'imagerie qu'on souhaite intégrer dans notre endomicroscope. Cette banque de données aura pour objectif de caractériser et discriminer les différents types de tumeurs cérébrales à travers leurs signatures optiques spécifiques. A l'issue de cette banque de données, différentes méthodes d'analyse et de traitement de données seront développées et implémentées dans notre instrument. L'objectif étant, en se basant sur cette banque, d'être en mesure de fournir au chirurgien un diagnostic fiable en temps réel.



Abstract 047

Exploration de la plasticité de l'inactivation du chromosome X dans le système hématopoïétique, chez l'humain

Madeleine MOSCATELLI – 1^{ère} année de thèse 2017

Moscatelli M., Casanova M., Huret C., Chauvière L., Rougeulle C.
Université de Paris, Epigenetics and Cell Fate, CNRS, F-75013 Paris, France.

L'inactivation du chromosome X (ICX) est un mécanisme épigénétique mis en place durant les premiers stades du développement embryonnaire chez les mammifères. Ce mécanisme est essentiel afin de compenser un déséquilibre dans l'expression des gènes liés au chromosome X entre les mâles et les femelles. L'acteur principal de l'ICX est XIST (X inactive specific transcript), un ARN long non codant (lncRNA). XIST recouvre le chromosome X à partir duquel il est exprimé, entraînant ainsi une modification de la conformation du chromosome et l'inactivation d'une majeure partie des gènes qui le constituent. Il a été établi qu'une fois l'ICX mise en place, l'inactivation est stable dans les cellules différenciées et ne requiert plus la présence de Xist sur le chromosome X inactivé (1). Une maintenance anormale de l'ICX est souvent observée dans différents cancers tels que le cancer du sein⁽²⁾ et des ovaires⁽³⁾. Cependant, dans le système hématopoïétique une maintenance inhabituelle de l'ICX est observable⁽⁴⁻⁶⁾. En effet, dans certains types cellulaires du lignage hématopoïétique le nuage de Xist/ XIST est délocalisé, et la marque répressive H3K27me³ (normalement associé au chromosome X inactivé (Xi)) n'est plus détectable au niveau du Xi. Toutefois, la majorité des gènes présents sur le Xi restent inactivés, seuls certains gènes sont ré-exprimés⁴⁻⁶. De plus, il a également été montré que des souris femelles ayant le gène Xist délété dans leurs cellules souches hématopoïétiques (CSH) développent des cancers hématopoïétiques agressifs, indiquant que Xist est nécessaire pour prévenir du développement de ces cancers *in vivo*⁽⁷⁾. L'ensemble de ces données suggère que dans le contexte hématopoïétique, l'ICX a une plasticité inattendue. Afin de comprendre comment l'ICX est régulée dans ces contextes et grâce à une étude computationnelle,

nous avons étudié l'expression des différents régulateurs de l'ICX dans ce contexte. Étonnamment, XACT (X active coating transcript) un lncRNA qui pourrait jouer un rôle antagoniste à XIST durant le développement embryonnaire⁽⁸⁻⁹⁾, et dont l'expression est régulée par la pluripotence⁽¹⁰⁾, est spécifiquement réexprimé dans ce contexte.

En combinant une approche d'interférence transcriptionnelle et d'édition du génome, nous explorons si XACT pourrait réguler l'ICX dans ce contexte. En parallèle, en utilisant des cellules souches embryonnaires humaines n'exprimant pas XIST, nous étudions l'impact de l'absence de XIST lors de la différenciation de ces cellules en CSH. Fait intéressant, nous montrons que les CSH obtenues n'ont pas la capacité de se différencier correctement afin de donner les différents types cellulaires du système hématopoïétique. Notre étude nous permettra d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme et les acteurs de la régulation de l'ICX dans des contextes physiologiques humains, préalable obligatoire à l'identification des voies qui conduisent à l'altération de l'ICX dans le cancer chez l'humain.

- 1- Csankovszki, G. et al. Nat. Genet. 22, 323-324 (1999).
- 2- Chaligné, R. et al. Genome Res. 25, 488-503 (2015).
- 3- Pageau, G. J. et al. Nat. Rev. Cancer 7, 628-33 (2007).
- 4- Syrett, C.M. et al. PLoS Genet. 13, e1007050 (2017).
- 5- Wang, J. et al. PNAS 113(14), E2029-E2038 (2016).
- 6- Syrett, C.M. et al. Front. Immunol. 9, 3087 (2019).
- 7- Yildirim, E. et al. Cell 152, 727-742 (2013).
- 8- Vallot, C. et al. Nat. Genet. 45, 239-41 (2013).
- 9- Vallot, C. et al. Cell Stem Cell 20, 102-111 (2017).
- 10- Casanova, M., Moscatelli, M. et al. Nat. Com. 10, 5652 (2019).

Abstract 048

Changements fonctionnels de la translocase de la membrane interne mitochondriale lors de l'import des protéines à préséquence

Cyril MOULIN – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Raffaele IEVA

CNRS UMR 5100, Laboratoire Microbiologie Génétique et Moléculaire, TOULOUSE

Les mitochondries sont des organelles essentielles ayant un rôle central dans la production d'énergie, l'apoptose, le métabolisme et la signalisation cellulaire. Chez l'Homme, des dysfonctionnements mitochondriaux ont été impliqués dans différents cancers ainsi que dans certaines maladies dégénératives.

Les protéines mitochondriales sont réparties entre la matrice, la membrane interne, l'espace intermembranaire et la membrane externe des mitochondries. Une grande majorité de ces protéines sont

synthétisées dans le cytosol avec une séquence d'adressage clivable (préséquence) située à leur extrémité N-terminale (préprotéines).

La translocase TIM23 (Translocase of the Inner Membrane) est responsable de l'adressage des préprotéines dans les mitochondries. Des signaux internes déterminent la destination finale des préprotéines. Les préprotéines hydrophiles sont transportées dans la matrice à l'aide du moteur moléculaire PAM. Certaines préprotéines possèdent un segment hydrophobe arrêtant la translocation dans la matrice

et permettant leur insertion dans la membrane interne. Les mécanismes de reconnaissance des signaux de ciblage internes par TIM23 dans l'espace intermembranaire et comment cette information influence l'association de TIM23-PAM et l'insertion de protéines dans la membrane sont mal connus.

Mon projet de thèse vise à décrire comment le complexe TIM23 déchiffre les signaux internes des préprotéines. La protéine essentielle Tim50/TIM50 fonctionne comme récepteur de préséquences. Cependant,

des mutations de Tim50 suggèrent une capacité de Tim50 à reconnaître des signaux internes des préprotéines. J'étudie comment la fonction de récepteur de Tim50 est liée à l'association/dissociation de TIM23-PAM et à l'insertion de protéines dans la membrane. Je souhaite ainsi comprendre comment Tim50 permet de convertir les signaux internes des préprotéines en réarrangements moléculaires de TIM23.

Abstract 049

Expression différentielle des points de contrôle immunitaires au cours des lymphoproliférations post transplantation EBV+ et EBV-

Cecilia NAKID – 1^{ère} année de thèse 2017

Auteurs : Cecilia Nakid-Cordero¹, Sylvain Choquet², Nicolas Gauthier¹, Nadine Tarantino^{1,3}, Martin Larsen^{1,3}, Noureddine Balegroune², Véronique Morel², Nadia Arzouk⁴, Vincent Vieillard^{1,3}, Brigitte Autran¹, Véronique Leblond² et Amélie Guihot^{1,5} avec le réseau national expert K-Virogref.

1- Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; 2- Service d'Hématologie, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France ; 3- CNRS ERL8255 ; 4- Service de Néphrologie, Urologie et Transplantation Rénale, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France ; 5- Département d'Immunologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

Les lymphoproliférations post-transplantation (LPT) représentent la deuxième complication néoplasique la plus fréquente après greffe d'organe solide, souvent associée à la présence du virus oncogène Epstein Barr (EBV). Les tumeurs associées à l'EBV (EBV+) pourraient avoir des immunopathologies différentes des tumeurs non associées au virus (EBV-), en lien avec le délai post-transplantation, le degré d'immunosuppression et la stimulation du système immunitaire par les alloantigènes, les antigènes viraux et tumoraux. Cependant, l'analyse comparative des altérations immunitaires des LPT EBV+ vs EBV- n'a jamais été étudié. Au sein du réseau K-Virogref, le centre national de référence INCA des cancers viro-induits après transplantation, nous avons inclus de façon prospective 99 patients atteints de LPT, immédiatement après diagnostic du syndrome lymphoprolifératif et avant son traitement. Les patients ont été classés en groupes LPT EBV+ (n=60) et LPT EBV- (n=39). En parallèle, 20 patients transplantés contrôles (TC) ont été recrutés.

Suivant la disponibilité des échantillons biologiques (LPT EBV+ / LPT EBV- / TC), nous avons étudié par cytométrie en flux : la numération lymphocytaire CD4/CD8 et T/B/NK (n=60+39+15), le phénotype d'activation/inhibition/points de contrôle immunitaire des cellules T (n=45+36+15) et des lymphocytes NK (n=20+12+5), ainsi que les réponses T anti-EBV par un test ELISpot IFN γ (n=20+16+7) et par détection de cytokines intracellulaires (n=15+14+15).

Nos résultats ont montré qu'une lymphopénie T CD4+ inférieure à 300/mm³ était un facteur de mauvais pronostic pour les LPT EBV- (Test Logrank, P=0.0001), mais non pour les LPT EBV+. Le phénotype détaillé des cellules T CD4+ montre une surexpression de Tim-3 parmi les LPT EBV+ et LPT EBV- (vs TC, P<0.0001 et P=0.0005), mais associé à un mauvais pronostic seulement pour le groupe LPT EBV- (Test Logrank, P=0.0339).

Chez les patients LPT EBV+ (vs TC), une lymphopénie NK profonde (P<0.0001) et des fréquences élevées des cellules NK activées CD69+HLA-DR+ (P=0.0188) et en apoptose Caspase-3+ (P=0.017) étaient observées, suggérant un mécanisme de mort cellulaire induite par l'activation. Par ailleurs, toujours au cours des LPT EBV+, la réponse T anti-EBV était significativement inférieure en cytométrie multiparamétrique (vs LPT EBV- ; P=0.0413) et il existait une surexpression des marqueurs d'épuisement (PD-1/Tim-3) sur les cellules spécifiques (vs TC ; P=0.0295). Enfin, le répertoire antigénique des cellules T effectrices/ effectrices mémoire dirigées contre la protéine EBNA-3A est plus restreint chez les patients LPT EBV+ que pour les autres groupes, avec une faible reconnaissance de la portion N-terminale, alors que nos travaux précédents suggèrent que les réponses T effectrices dirigés contre cette région pourraient être protectrices contre le développement des LPT EBV+ chez les patients transplantés rénaux (Nakid-Cordero et al. PLOSone, 2019).

Pris dans leur ensemble, ces résultats contribuent à mieux comprendre l'immuno-physiopathologie des LPT, mettant en évidence une expression différentielle des points de contrôle immunitaires qui pourrait favoriser le développement ou la gravité des LPT EBV+ et EBV-. Ces données mettent en évidence de nouveaux biomarqueurs pronostiques des LPT EBV-, et pourraient guider le développement d'immunothérapies innovantes contre les LPT.

Abstract 050

Étude du rôle des récepteurs au S1P et de leurs interactions dans la migration des lymphocytes T

Antoinette NEYRA – 1^{ère} année de thèse 2017

Inserm U1111 - CIRI - Lyon

Contexte et objectifs. Le lysophospholipide sphingosine-1-phosphate (S1P) régule la sortie des lymphocytes T (LT) des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Sa forte concentration dans le sang et la lymphe permet d'attirer les LT hors des OLS, où la concentration en S1P est faible. Le S1P peut se lier à cinq récepteurs membranaires (S1PR1-5) exprimés en combinaisons variables par les différentes sous-populations de LT. On connaît actuellement assez mal le rôle du S1P dans la recirculation lymphocytaire chez l'homme, ainsi que le rôle des combinaisons des S1PR dans ce contexte. Nous souhaitons donc comprendre **comment les récepteurs au S1P et leur combinatoire régulent la migration des LT**, dans un premier temps à l'homéostasie, et dans un second temps dans un **contexte tumoral**. Une étude précédente de notre équipe a souligné l'existence d'un antagonisme entre S1PR1 et S1PR2 dans le contrôle de la sortie des LT des OLS. Il a également été montré que, si S1PR1 était essentiel à la migration des LT naïfs, les lymphocytes Natural Killer (NK) utilisaient préférentiellement S1PR5 pour sortir de la moelle osseuse et des OLS. De ce fait, notre étude se concentre sur deux axes : d'une part l'antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2, d'autre part la différence entre S1PR1 et S1PR5.

Méthodes. L'expression en ARNm des cinq S1PR a été mesurée par RT-qPCR sur neuf lignées issues de lymphomes T, B ou NK. Des tests de chimiotaxie en présence de S1P ont été réalisés sur chacune de ces lignées. La corrélation entre l'expression ARNm de chacun des S1PR et la réponse migratoire des cellules a été calculée à l'aide du logiciel R studio. Ensuite, les cellules Jurkat ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant chacune un des S1PR taggué avec un tag-FLAG en N-terminal. L'impact de la surexpression de ces récepteurs sur la migration des Jurkat

a été vérifiée par des tests de chimiotaxie. L'expression membranaire des S1PR taggués a été mesurée au cours du temps, soit en incubant les Jurkat dans un milieu sans sérum de veau fœtal (qui contient du S1P), soit dans un milieu avec 300 nM de S1P.

Résultats. Les analyses statistiques ont montré que dans nos lignées cellulaires, seul S1PR1 semble avoir un réel impact sur la capacité à migrer en présence de S1P, tandis que les quatre autres récepteurs ne semblent pas impliqués dans la migration. Cela nous a permis d'utiliser ces lignées pour étudier l'impact de l'expression des S1PR exogènes sur la migration sans tenir compte des S1PR endogènes (hormis S1PR1). De ce fait, nous avons transduit l'une de ces lignées (Jurkat) afin qu'elle exprime individuellement chacun des S1PR de façon exogène. La migration en réponse au S1P est augmentée dans les cellules Jurkat surexprimant S1PR1 ou S1PR5, et diminuée dans les Jurkat surexprimant S1PR2. L'expression membranaire de S1PR1 et S1PR2 est augmentée lorsque les Jurkat sont incubées dans un milieu sans sérum, tandis que celle de S1PR5 reste stable au cours du temps.

Discussion. Ces premiers résultats confirment l'antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2 dans la migration des LT, avec respectivement l'induction ou l'inhibition de la migration en réponse à un gradient de S1P. Nous vérifierons ces résultats à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des S1PR. L'étude de l'expression membranaire des S1PR montre que, contrairement à S1PR1, S1PR5 semble peu sensible à l'internalisation en présence de S1P. Cette différence de sensibilité pourrait expliquer l'utilisation préférentielle de S1PR5 par les NK, qui ont besoin du signal S1P pour sortir d'organes lymphoïdes dans lesquels la concentration en S1P est élevée.

Abstract 051

La double fonction PKC θ : Exploration de la relation entre la migration cellulaire et la division cellulaire

Amandine NICOLLE – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Karine BELGUISE

CNRS UMR 5088, Université Paul Sabatier, TOULOUSE

Amandine Nicolle, Valérie Cadamuro, Xiaobo Wang, Karine Belguise
LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse,
CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Il est la première cause de décès par cancer chez la femme. Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est le sous type du cancer du sein le plus agressif et invasif néanmoins il n'existe pas de thérapie ciblée. La protéine kinase C θ (PKC θ) appartient à la catégorie des nouvelles PKC, c'est une cible potentielle intéressante car elle est surexprimée dans les CSTN alors que dans les cellules normales son expression est restreinte aux cellules lymphoïdes et musculaires normales.

L'équipe a démontré pour la première fois le rôle de PKC θ dans la migration cellulaire et la tumorigénèse mammaire. La première partie de mon projet de thèse a donc consisté à caractériser l'état de sénescence induit par la perte de PKC θ et le mécanisme associé à cet état. Mes résultats ont permis d'identifier une nouvelle protéine impliquée dans le mécanisme moléculaire de l'activation de la sénescence : Gadd45 α . De manière surprenante l'expression protéique de Gadd45 α diminue fortement lors de l'inhibition de PKC θ . En effet Gadd45 α est une protéine connue pour être impliquée dans l'arrêt de la prolifération lors de dommages à l'ADN. De plus, l'inhibition de Gadd45 α entraîne un phénotype similaire à celui induit par la perte de PKC θ . Mes résultats ont également permis d'identifier la voie d'activation de la sénescence. Les deux principales voies d'activation de la sénescence sont : p53/

p21 et Rb/p16. Cependant certaines lignées étudiées sont mutées pour ces protéines. Nous avons identifié p27 comme un des effecteurs de la sénescence induite par la perte de PKC ϵ .

En plus de sa localisation cytoplasmique, PKC ϵ se localise au niveau des adhésions focales naissantes au cours de la migration des cellules (Chadelle et al, en révision). De façon surprenante, nous avons constaté que la kinase se situe également au niveau des centrosomes lors de la mitose et en interphase, permettant ainsi à PKC ϵ de faire le lien entre la migration et la division cellulaire. En accord avec la localisation de PKC ϵ , la perte de la kinase entraîne également de graves défauts liés aux centrosomes dans les cellules CSTN : l'organisation radiale des microtubules est perturbée et perd son ancrage aux centrosomes ; et la distance entre les centrioles est anormalement augmentée, indiquant un problème avec l'assemblage des centrioles.

La seconde étape de mon projet consiste :

- 1- Observer directement le rôle de PKC ϵ pendant la migration et la division cellulaire en utilisant l'imagerie des cellules vivantes pour suivre la position de la kinase endogène ou de la kinase exogène

exprimée au niveau proche de l'endogène.

- 2- Perturber la fonction et la position de PKC ϵ afin de comprendre précisément le rôle de cette kinase au cours des différentes phases du cycle cellulaire.
- 3- Comprendre le mécanisme de liaison de PKC ϵ aux centrosomes, ceci est primordial pour comprendre sa fonction au niveau des centrosomes. Nous regarderons si PKC ϵ se lie directement aux centrosomes ou si la protéine est transportée via l'extrémité moins des microtubules vers les centrosomes.

En conclusion, le succès de ce projet est important pour mieux comprendre la fonction de PKC ϵ dans la biologie du cancer. Notre objectif à court terme est de caractériser PKC ϵ en tant que coordinateur de la division et de la migration cellulaire via le contrôle de mécanismes communs, amplifiant ainsi son impact sur l'agressivité tumorale. Notre objectif à long terme est de définir PKC ϵ comme une cible thérapeutique pour ce sous-type de cancer du sein particulièrement agressif. En effet, ces cancers agressifs ne bénéficient pas d'une thérapie ciblée et sont difficiles à traiter.

Abstract 052

Rôle des vésicules extracellulaires stromales suite à un traitement au Folfirinox dans la chimiorésistance du cancer pancréatique

Jérémy NIGRI – 4^e année de thèse 2019

NIGRI Jérémy^a, Tubiana Sarah^a, Finetti Pascal^a, Gicquel Tristan^a, Barea Dolores^a, Gayet Odile^a, Hussain Zainab^a, Audebert Stephane^a, Dusetti Nelson^a, Iovanna Juan^a, Birnbaum Daniel^a, Van Obberghen-Schilling Ellen^b, Camoin Luc^a, Bertucci François^a, Tomasini Richard^a.

a- INSERM, U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli-Calmettes, CNRS, UMR7258, and Université Aix-Marseille, Marseille, France.

b- Institut de Biologie, Parc Valrose, Université Côte d'Azur, 06108, Nice, France

Contexte et Objectif. Le cancer du pancréas est projeté pour devenir le 2^e cancer le plus meurtrier en 2030 avec un taux de survie 5 ans après le diagnostic, inférieur à 10%.

Ce sombre pronostic est principalement dû à une absence de symptômes spécifiques de la maladie ce qui conduit à un diagnostic tardif. De plus, la majorité des patients reçoivent une chimiothérapie « palliative » avec une efficacité limitée qui peut s'expliquer par la composition de la tumeur. En effet, celle-ci est composée de plus de 80% de cellules stromales parmi lesquelles sont disséminées les cellules cancéreuses.

Cependant, la plupart des études voulant éliminer ces tumeurs se sont concentré sur les cellules tumorales. Malgré les récentes améliorations de la survie des patients par l'utilisation de nouvelles thérapies telles que le Folfirinox où le Nab-paclitaxel, le taux de réponse reste particulièrement faible and les effets secondaires importants. Et bien que le stroma, principalement constitué de fibroblastes associés au cancer (CAF) et de macrophages, ait été reconnue comme un acteur majeur dans la tumorigenèse, son rôle dans la résistance à la chimiothérapie reste sous-estimé. Considérant l'importance des vésicules extracellulaires (VEs) dans le dialogue cellules stromales/cancéreuses, nous avons étudié le dialogue « CAF/macrophages »/

cellules cancéreuses médié par les VEs stromales et analysé son impact sur la chimiorésistance afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs de la réponse à la chimiothérapie.

Méthodes. Les vésicules extracellulaires sont isolées par ultracentrifugation de co-cultures de CAF primaires (issus de tumeurs pancréatiques) et de macrophages dérivés de monocytes et ont été utilisés pour récapituler le microenvironnement de VEs sur un modèle de sphéroïdes de cellules cancéreuses pancréatiques.

Résultats. Nous avons trouvé que le Folfirinox stoppe la prolifération des cellules tumorales cultivées en 3D en sphéroïdes en induisant un blocage en G2 du cycle cellulaire.

En parallèle, nous avons trouvé que les vésicules dérivées du stroma en réponse au Folfirinox protègent les cellules tumorales du Folfirinox, en réduisant l'arrêt en G2 et les dommages à l'ADN. De plus, les sphéroïdes traités avec les VEs dérivés des cellules stromales présentent une modification de leur capacité de compaction. Aussi, les cellules tumorales dissociées provenant de sphéroïdes traités aux VEs stromales, reforment des sphéroïdes plus compact et plus rapidement. Grâce à des analyses en « single cell » et en spectrométrie de masse, nous avons trouvé que la chimiorésistance des sphéroïdes est associée à une modification de la composition clonale et des protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Des expériences complémentaires ont permis de confirmer que les protéines de la MEC sont le médiateur majeur de la chimiorésistance médiée par les VEs stromales.

Conclusion. Le dialogue cellules stromales / cellules tumorales médié par les VEs stromales produites suite à un traitement au Folfirinox favorise la chimiorésistance des sphéroïdes via le transfert de protéines de la ECM et les voies associées, ainsi que par la modification de la composition clonale.

Abstract 053

Les cellules X : Un nouvel espoir dans la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Anne-Beatrice NOTARANTONIO – 1^{ère} année de thèse 2017
CNRS 7365 - IMoPA - Campus Biologie Santé - Vandœuvre-lès-Nancy

A.-B. Notarantonio, C. Pochon, F.Salem, M. De Carvalho Bittencourt, H.Louis, D. Bensoussan, M.-T. Rubio, M. D'Aveni

Contexte : Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) constituent une population hétérogène de cellules aux propriétés immunosuppressives, décrites initialement dans le microenvironnement tumoral, de phénotype CD19⁻ CD3⁻ HLADR^{high} CD33⁺ CD11b⁺. Trois sous-types de cellules ont été définis phénotypiquement : les monocytiques CD14⁺ (M-MDSC), les granulocytiques CD15⁺ (G-MDSC), les immatures CD14⁻CD15⁺ (e-MDSC). Notre équipe a décrit l'existence d'une sous-population de M-MDSC dans les greffons de cellules souches périphériques (CSP) mobilisés par G-CSF exprimant CD34⁺ (D'Aveni et al. STM 2015). Cette population a des propriétés immunorégulatrices dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et sa richesse dans les greffons de CSH était corrélée à la survenue de GVH chez l'homme. Le potentiel immunorégulateur de ces cellules en font d'elles des candidates potentielles dans la prévention et le traitement de la GVH mais leur faible nombre dans les greffons requiert de mettre au point une méthode d'expansion *ex vivo* avant utilisation thérapeutique.

Méthodes : Dans l'objectif d'expandre des MDSC CD34⁺, nous avons mis au point une technique d'expansion de cellules X à partir de cellules souches périphériques de donneurs sains (CSP). Nous avons analysé les pourcentages des cellules X obtenues par cytométrie en flux. Parallèlement, à l'aide de coculture avec des lymphocytes T (LT), activés par anti-CD3 et anti-CD28 nous avons évalué, *in vitro*, les propriétés immunosuppressives des cellules X après expansion. Nous avons également étudié l'effet de ces cellules, *in vivo*, dans un modèle de xéno-GVH murin. Pour cela, à J-1, nous avons irradié des souris NOD-SCID- γ à 2 Gray, puis à J0, nous avons injecté 1 million de cellules X concomitamment à 5 millions de cellules mononuclées humaines (PBMCs), le groupe contrôle ne recevait que 5 millions de PBMCs. L'efficacité du traitement était évaluée en surveillant le poids et la survie des souris.

Résultats : Les conditions de culture ont permis de multiplier par 2.8 le pourcentage de cellules X entre J0 et J7 (10.40% \pm 3.29 à J0 vs 29.17% \pm 12.2 à J7, p<0.0001, n=17, test Wilcoxon) (Figure 1). Sur le plan fonctionnel, nous avons montré que les cellules X étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (LT) activés, *in vitro*, (92.03% \pm 4.665 LT activés seuls, versus 57.72% \pm 10.52 avec cellules X, p=0.008 n=8, test Wilcoxon) (Figure 2 et 3). *In vivo*, nous avons montré une augmentation de la survie des souris ayant reçu une association de PBMCs et de cellules X (médiane de survie 66 jours dans le groupe de souris ayant reçues des PBMCs et des cellules X (n=6) versus une médiane de survie de 46 jours dans le groupe contrôle (n=6) p=0.001 (Log-Rank test) et un maintien de leurs poids au cours du suivi. (poids moyen de 30.79 grammes chez souris ayant reçues des PBMCs et des cellules X (n=6) versus un poids moyen de 27.99 grammes dans le groupe contrôle (n=6) p=0.001 (Mann-Whitney test) (Figure 4A et 4B).

Discussion : Nous avons mis au point une technique de culture de cellules X à partir de prélèvements de CSP, aux propriétés immunosuppressives *in vitro* et *in vivo*, et qui semblent donc intéressantes dans un objectif de contrôle de la GVH. L'étude de ces cellules en single-cell ARN-seq et des

mécanismes d'action devraient nous permettre dans un avenir proche de mieux caractériser ces cellules X en vue d'un développement d'un produit de thérapie cellulaire.

Figure 1

La culture de cellules de donneur sains permet d'augmenter la proportion de Cellules X entre J0 et J7 (10.40% \pm 3.29 à J0 vs 29.17% \pm 12.2 à J7, p<0.0001, n=17)

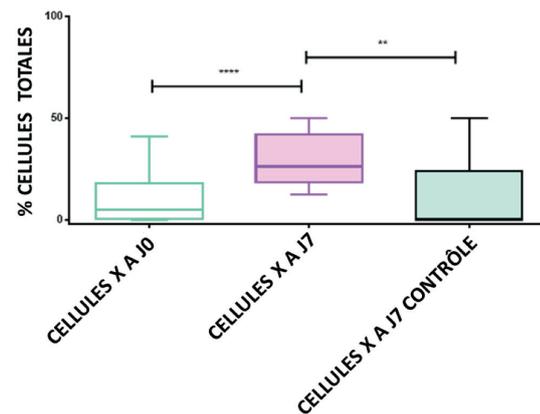


Figure 2

Représentation du pourcentage de prolifération des Lymphocytes T (LT) CD3⁺ en présence des Cellules X. La barre rouge représente la prolifération des LT CD3⁺ seuls (92.03%), la barre verte représente les LT CD3⁺ non activés (2.26%) enfin la barre bleue montre le pourcentage de prolifération des LT CD3⁺ en coculture avec des Cellules X (57.72%) La différence de prolifération entre les LT CD3⁺ seuls et la coculture des LT CD3⁺ et des Cellules X est significativement différente (p=0.008)

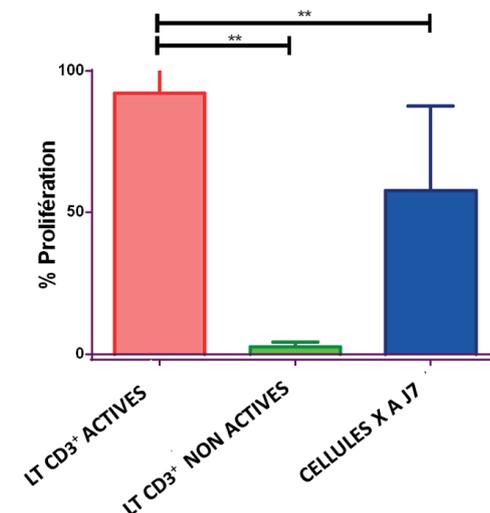


Figure 3

Prolifération à J5 des Lymphocytes T (LT) CD3+ cultivés en face des Cellules X. La courbe rouge représente la prolifération des LT CD3+ après activation par billes anti-CD3 et anti-CD28. La courbe bleue représente

l'inhibition de la prolifération des LT CD3+ par les Cellules X. La courbe verte montre l'absence de prolifération des LT CD3+ en l'absence de stimulation.

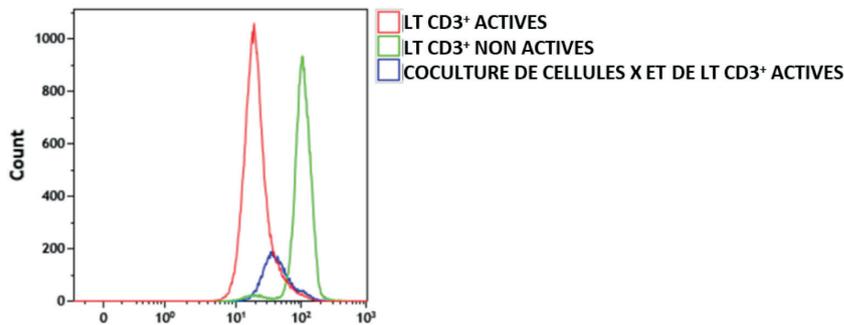
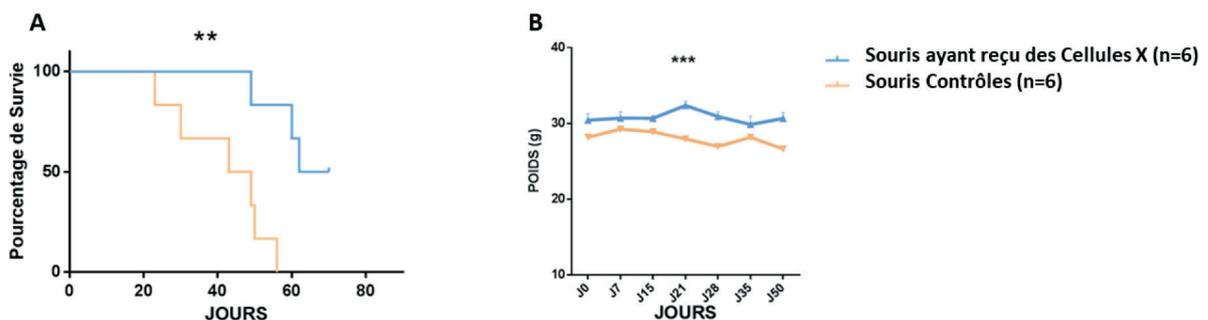


Figure 4A et 4B

Evaluation de la survie et du poids des souris Nod-Scid-Gamma (NSG) dans un modèle de xéno-GVH humain. Sur la figure 4A et 4B, la courbe bleue représente le suivi des souris ayant reçu 5 millions de cellules mononuclées humaines (PBMCs) et de 1 million de Cellules X, 24H après avoir reçu une irradiation de 2 Gray, la courbe or, correspond au groupe

contrôle et, montre le suivi des souris ayant reçu uniquement 5 millions de PBMCs après une irradiation de 2Gray. On observe une augmentation de la survie des souris injectées ($p=0.001$) et un maintien du poids chez les souris ayant reçu des Cellules X et des PBMCs versus le groupe contrôle ($p=0.001$).



Abstract 054

Fonction d'une sous-unité du complexe médiateur de transcription dans la prolifération des tissus

Adeline PAYET - 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Muriel BOUBE

CNRS UMR 5547, Centre de Biologie du Développement, TOULOUSE

Le développement d'un organisme complexe nécessite la régulation fine dans le temps et l'espace de la transcription des gènes. Une dérégulation de ce mécanisme peut conduire à de nombreuses maladies notamment les cancers. Le complexe médiateur de transcription (MED) est un acteur clé de cette régulation. Bien que ce complexe joue un rôle global dans la transcription dépendante de la Polymérase II, certaines sous-unités du MED ont des rôles plus spécifiques. Mon projet s'intéresse à un nouvel aspect de la fonction du MED via la sous-unité Med19, chez la Drosophile. Cette sous-unité se distingue par une létalité des cellules mutantes dépendante du contexte tissulaire, suggérant une fonction spécifique de Med19 dans la compétition cellulaire. Ce processus basé sur une comparaison entre deux populations cellulaires permet aux cellules « Winner » de proliférer aux dépens des cellules « Loser ». Mes données indiquent que les cellules mutantes pour Med19 sont éliminées par compétition cellulaire, mais aussi que Med19 est requis globalement pour la prolifération et la viabilité cellulaire. L'implication de Med19 dans

ces processus s'explique au moins en partie par son rôle sur la régulation de l'expression du proto-oncogène *Myc*. Afin de trouver d'autres gènes cibles de Med19, j'ai débuté une analyse globale de RNA-Seq en condition de perte de fonction Med19. Je souhaite maintenant (1) finaliser la caractérisation du rôle de Med19 dans la compétition cellulaire, et (2) procéder à l'analyse du transcriptome de Med19 et caractériser notamment les cibles primaires grâce à l'utilisation d'une protéine Med19 dégradable.

La surexpression de l'homologue humain de *Med19* (*LCMR1*) a été associée à l'émergence de nombreux cancers et son inactivation réduit la prolifération tumorale. Ce projet devrait permettre de décrypter la fonction de *Med19* dans les processus de compétition et de prolifération cellulaires mais également d'aider à développer des thérapies basées sur l'inactivation de Med19 en ayant une meilleure connaissance de son mode d'action mais aussi des effets secondaires éventuels que cela pourrait induire.

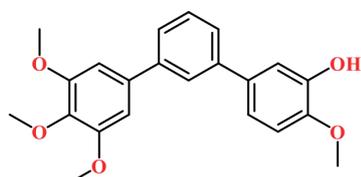
Abstract 055

Design, synthesis and biological evaluation of new CA-4 analogues series as potent anti-tubulin agents targeting colchicine binding site

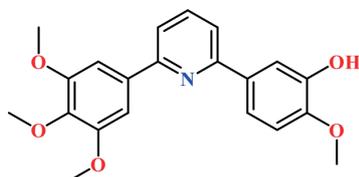
Shannon PECNARD – 1^{ère} année de thèse 2018

Shannon Pecnard, Abdallah Hamze, Olivier Provot, Mouad Alami
Université Paris-Saclay, CNRS, BioCIS, 92290, Châtenay-Malabry, France.

Literature



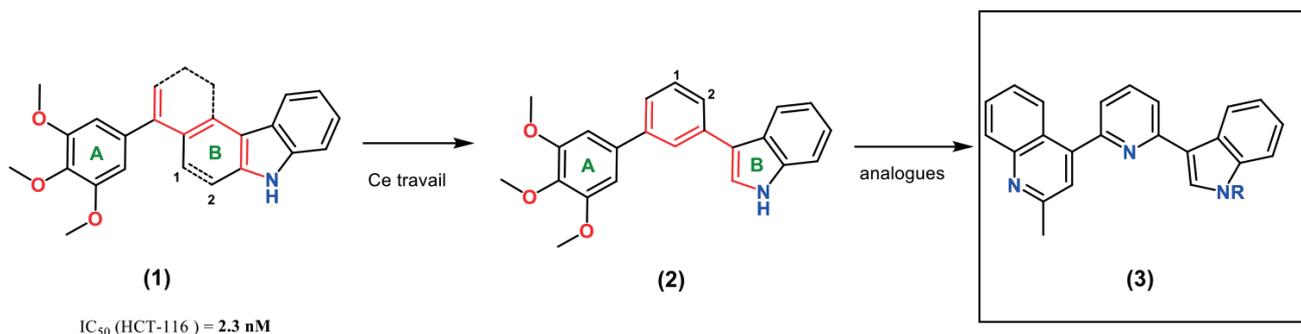
$IC_{50} > 10 \mu M$
J.Med.Chem. **2005**, *48*, 723-736



IC_{50} (MDA-MB-231) = 69 nM
J.Med.Chem. **2014**, *57*, 3369-3381

Une nouvelle série d'inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline a été synthétisée sur la base de pharmaco-modulations réalisées autour de l'isoCA4-Cbz (**1**), molécule récemment découverte au laboratoire présentant une cytotoxicité élevée sur de nombreuses lignées cancéreuses humaines.¹

Il a été démontré qu'il est possible de remplacer la double liaison éthylénique par un noyau type benzénique, et le noyau carbazole (cycle B) par un hétérocycle de type indole. Une étude de relation structure-activité, ici présentée, montre que le(s) composé(s) (**3**) combinant une quinaldine² (cycle A), un pont pyridine (linker) et un indole diversément substitué (cycle B) possède(nt) un niveau de cytotoxicité extrêmement prometteur sur plusieurs lignées cancéreuses humaines. Les études structure-cytotoxicité seront présentées et discutées.



¹ *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1902-1916.

² *Eur. J. Med. Chem.* **127** (2017) 1025-1034

Abstract 056

Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more efficient and less toxic targeting of brain tumors

Patricia PIRIS – 1^{ère} année de thèse 2018

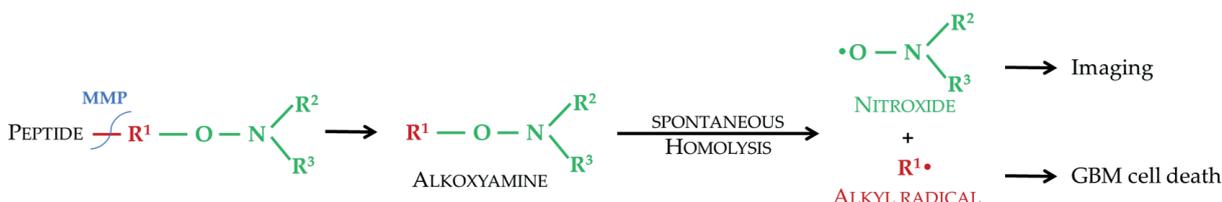
P. Piris¹, D. Buric¹, T. Yamasaki², MP. Montero¹, M. Rossi¹, N. André¹, S. Combes¹, P. Brémond¹ and M. Carré¹

1- Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, AMU UM105, IPC – Faculté de Pharmacie, Marseille, France

2- Institute of Radical Chemistry, CNRS UMR7273, Aix-Marseille Université – Faculté des Sciences, Marseille, France

Context and objectives. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common intracranial tumor observed in adults. Despite recent significant progresses in clinical management, GBMs have one of the worst prognoses for survival due to a poor response to therapeutic strategies. Such aggressive tumors present a unique challenge for drug design.

Our previous results revealed the theranostic properties of alkoxyamines (R¹-ONR₂R₃). These molecules can undergo homolysis to generate: 1) a highly toxic alkyl radical (R¹•), which induces the cell death process in GBM cells and 2) a non-toxic nitroxide (R₂R₃NO•), able to enhance MRI signals. Herein, we propose to selectively control the activation of alkoxyamines by matrix metalloproteases (MMP).



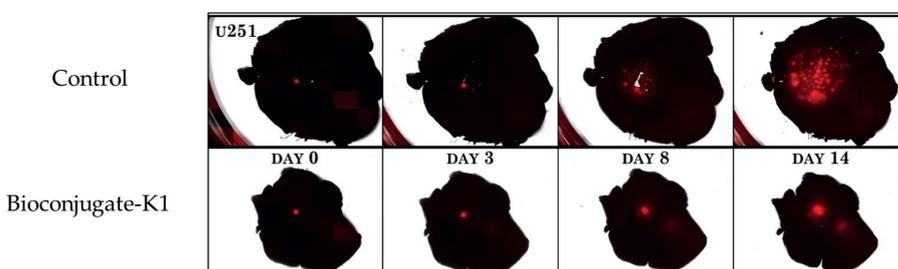
Methods. A library of 85 alkoxyamines were synthesized. Their real-time effects on cell proliferation and invasion were monitored in DsRed-expressing GBM cell lines and tumor spheroids by live cell microscopy and/or high-resolution fluorescence well scanning. Cell migration was studied using Transwell® assays. An innovative organotypic model, based on the graft of GBM spheroids in *ex vivo* mice normal brain slices, was then developed to confirm the benefits of the best alkoxyamines.

Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) investigations were performed using GastroPlus®. Cell uptake of the drug-candidates was studied over time using fluorescent-conjugated alkoxyamines. Intracellular consequences were determined by analyzing (i) the superoxide generation using the Wst-1 probe, (ii) the mitochondrial network by live fluorescence microscopy and (iii) the cell death programs by flow cytometry.

Results. The best alkoxyamine, K1, was more efficient in GBM cell lines and GBM stem cells than in other cancer cell lines (neuroblastoma, lung and breast carcinomas). K1 induced apoptosis by early generation of reactive oxygen species (ROS) and significant mitochondrial network fragmentations. K1 was then bioconjugated to a peptide selectively recognized and cleaved by MMP.

The bioconjugate successfully inhibited survival, proliferation, migration and invasion of the GBM cells. Its evaluation on organotypic model of GBM over 14 days showed that it was very promising in inhibiting GBM progression in this co-culture system. No severe side-effects to healthy tissue was observed. Moreover, PBPK modeling supported that K1 is a good candidate for further preclinical tests in brain tumors.

Discussion. We discovered K1, an alkoxyamine more efficient than the first generations we previously described (Mol.Pharm.2014, Bioorg.Med. Chem.2019), whose homolysis can be, for the first time, controlled by MMP, overexpressed in the tumoral microenvironment. K1 was also successfully investigated in medulloblastoma, the most common malignant brain tumor in children. Based on structure-activity relationships of MMP substrates, new derivatives of K1 are being synthesized to improve their MMP-mediated activation. To decipher homolysis in a complex cellular context, we are now conducting EPR investigations as well as synthesis of ROS-sensitive fluorescent alkoxyamines. Lastly, the most stable alkoxyamines are submitted to standard, *i.e.* clinically relevant, radiotherapy protocols to trigger their controlled homolysis.



Abstract 057

Identification des voies de signalisation dépendantes de PKA dans la migration et la dissémination métastatique des cellules du cancer du sein

Mathilde PROPONNET – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Corinne ALBIGES-RIZO

CNRS UMR 5309 INSERM U1209, Institut pour l'Avancée des Biosciences, GRENOBLE

Proponnet-Guerault, M., Boyault, Poignant J., Lemonnier N., C., Bouin, AP. and Albiges-Rizo, C.

Au cours de la dissémination métastatique, les cellules cancéreuses issues d'un foyer primaire, acquièrent de nouvelles capacités de migration et d'invasion via la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'équilibre mécanique cellulaire régulé par le cytosquelette d'actine et sous la coordination des contacts cellule-cellule et cellule-matrice est perturbé entraînant une perte de cohésion cellulaire et la dissémination des cellules¹. Ainsi la formation de nouvelles tumeurs dans d'autres organes repose sur la réversibilité de cette transition – la transition mésenchymo-épithéliale (MET), dans laquelle les cellules rétablissent leur contact cellule-cellule et retrouvent une cohésion épithéliale. Le rôle de la Protéine Kinase A (PKA) dans ces deux transitions est controversé. PKA a été décrite comme un régulateur favorisant la MET ou EMT dans le cancer du sein^{2,3} et son rôle de dans la régulation de la contractilité cellulaire reste incompris⁴. Afin de comprendre le rôle de PKA et les voies de signalisation associées à PKA dans la migration cellulaire, nous avons mis en place une approche de biologie de réseau. Basé sur les données de la littérature, nous avons défini un réseau d'interaction protéine-protéine entre la machinerie acto-adhésive (intégrines et cadhérines), les isoformes PKA, ainsi que les régulateurs de la contractilité cellulaire. La prédiction computationnelle des sites de phosphorylation spécifique de PKA a permis d'identifier 9 cibles potentielles dans le contrôle de la migration cellulaire⁵. La phosphorylation par PKA de 3 de ces 9 cibles a été confirmée dans le modèle cellulaire MDA-MB-231, cellules du cancer du sein triple négatif. Notre intérêt porte sur une de ces nouvelles cibles qui est un marqueur métastatique et médiateur de la résistance au

chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif⁶⁻⁸. Le mutant de phosphorylation de cette cible sera un atout déterminant pour étudier son rôle. Identifiés par une approche bio-informatique, 27 médicaments en phase 4 pourrait bloquer la progression et la migration des cellules du cancer du sein triple négatif. Il s'agira alors de tester ces médicaments ainsi que le mutant sur des tests de migration isolée et collective (en 2D), ainsi que des tests de croissance et de morphogénèse de mammosphères (en 3D).

1. De Pascalis, C. & Etienne-Manneville, S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1833-1846 (2017).
2. Pattabiraman, D. R. et al. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science* **351**, aad3680 (2016).
3. Nadella, K. S. et al. Targeted deletion of Prkar1a reveals a role for protein kinase A in mesenchymal-to-epithelial transition. *Cancer Res.* **68**, 2671-7 (2008).
4. Howe, A. K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta* **1692**, 159-74 (2004).
5. Xue, Y. et al. GPS 2.1: Enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 255-260 (2011).
6. Wang, C. et al. Gas6/Axl axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast cancer through Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Theranostics* **6**, 1205-1219 (2016).
7. Goyette, M. A. et al. The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression. *Cell Rep.* **23**, 1476-1490 (2018).
8. Antony, J. & Yun-Ju Huang, R. AXL-Driven EMT State as a Targetable Conduit in Cancer. *Cancer Res* **77**, (2017).



Abstract 058

Restauration de l'activité tumeur-suppresseur du miR-16 dans le mélanome uvéal

Anaïs QUÉMÉNER – 1^{ère} année de thèse 2017

Quéméner Anaïs¹, Bachelot Laura¹, Galibert Marie-Dominique^{1&2} & Gilot David¹.

1- Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) – UMR6290, 35000 Rennes, France.

2- CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, 35000 Rennes, France.

Le mélanome uvéal est le cancer intraoculaire le plus fréquent chez l'adulte. Malgré l'efficacité des traitements au stade primaire, 30 à 50% des patients développent des métastases entraînant une faible survie globale. Il est donc urgent de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons observé que le suppresseur de tumeur miR-16 est très fortement exprimé dans les mélanomes uvéaux. Cependant nos résultats suggèrent que miR-16 est inactif dans ces cellules comme nous l'avons précédemment démontré dans le mélanome cutané. Nous avons émis l'hypothèse que miR-16 est séquestré par un (ou plusieurs) ARN compétiteur endogène. L'objectif thérapeutique serait ici de restaurer l'activité suppresseur de tumeur de miR-16, en utilisant une stratégie

oligonucléotides Anti-Sens (ASO). En empêchant la fixation des miR-16 sur l'éponge, ces ASOs limitent la séquestration du miR-16 et restaurent l'activité anti-tumorale du microARN.

Pour identifier tous les sites de fixation du miR-16 et leurs conséquences fonctionnelles, nous avons analysé le profil d'expression génique après surexpression de miR-16 dans une lignée cellulaire de mélanome uvéal. Ces expériences ont permis de déterminer les cibles directes et indirectes du miR-16. De façon complémentaire, nous avons identifié les ARNs directement associés à miR-16 par une expérience de pull-down (miR-16 biotinylé).

Finalement, nous avons établi le panorama complet des ARNs capables de se lier à miR-16 de façon canonique entraînant une dégradation de ces ARNs, ou de façon non-canonique entraînant une stabilisation (augmentation) d'expression de ces éponges à miR-16. La caractérisation des motifs de liaison est en cours ainsi que la validation fonctionnelle des éponges et cibles. L'ensemble de ces données devrait permettre de mieux comprendre la biologie du mélanome uvéal et ainsi de proposer une nouvelle approche thérapeutique.

Abstract 059

Intestinal epithelial development and defense: functional analysis in zebrafish

Soraya RABAHI – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Pedro HERNANDEZ-CERDA

Inserm U934, Institut Curie, PARIS

Cytokines are small secreted proteins that mediate intercellular communication, which is essential for promoting the immune defense and homeostasis of the intestinal epithelial layer¹. These molecules regulate diverse cellular processes such as cell differentiation, cell death and proliferation during physiological and pathological situations such as cancer. Nevertheless, the role of cytokines and cytokine-producing cells during early development remains unclear. Our preliminary data show that, before the appearance of lymphocytes in the zebrafish intestine, embryonic intestinal epithelial cells (IECs) can activate defense mechanisms thought to be exclusive to immune cells, including interleukin-22 (IL-22) expression. This observation points towards a central and unknown role of this cytokine in developing intestines. The mammalian IL-22 represents a unique example of unidirectional signaling from immune to epithelial cells which is critical to maintain mucosal integrity². However, its dysregulation induces deleterious pathological inflammatory responses in the intestine which can lead to inflammatory bowel diseases (IBD) and colitis-associated cancer³. Using the zebrafish, we aim to better define the function of this

cytokine during physiological intestinal development and upon different intestinal inflammatory or tissue damaging conditions, focusing on the contribution of its different cell sources throughout development. Furthermore, we have found that IECs can express, in addition to *il22*, other cytokines described to be expressed only by immune cells in mammals. We hypothesize that the epithelium can compensate for the lack of immune cells during early life. To further characterize intestinal epithelial cell types participating in inflammation, we will identify the full cell diversity and defense function of the epithelial layer upon different immune challenges throughout fish development.

1. Andrews, C., McLean, M. H. & Durum, S. K. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
2. Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'Connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., Hanash, A. M. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*, 528(7583), 560–564. (2015).
3. Hernandez, P., Gronke, K., & Diefenbach, A. A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *European Journal of Immunology*, 48(1), 15–31. (2018).

Abstract 060

Nouvel effet du sécrétome de cellules sénescences sur des cellules tumorales : la transdifférentiation neuroendocrine

Clotilde RAYNARD – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : David BERNARD

Inserm U1052, Centre Léon Bérard, LYON

Clotilde RAYNARD¹, Xingjie MA¹, Anda HUNA¹, Nolwenn TESSIER², Sylvie DUCREUX², Jean-Michel FLAMAN¹, Nadine MARTIN¹, Hector HERNANDEZ-VARGAS¹, and David BERNARD¹

1- Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Université de Lyon & Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
2- CarMeN Laboratory Inserm 1060, INRA 1397, INSA, Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France.

Suite à divers stress, les cellules rentrent dans un programme appelé sénescence entraînant un arrêt du cycle cellulaire accompagné d'un sécrétome particulier associé à la sénescence, le SASP. Les cellules sénescences, en partie grâce à leur SASP, permettent de bloquer la prolifération et d'induire l'élimination par le système immunitaire de ces cellules à risque de transformation, mais l'accumulation du SASP peut exercer des effets pro-tumoraux. L'objectif de mon projet de thèse est d'étudier le rôle et l'impact du SASP sur différentes lignées cancéreuses mammaires. De façon étonnante, nous avons observé l'induction d'un phénotype neuroendocrinien (NE) dans des cellules luminales, MCF-7, après traitement au SASP. Cette différenciation NE (NED) est également

observée dans les LNCaP, cellules cancéreuses prostatiques connus pour subir cette différenciation dans certains contextes. Mes résultats démontrent que les molécules pro-inflammatoires du SASP exprimées par l'activation de NF- κ B, sont nécessaires pour induire ce phénotype et que le calcium semble y participer. Nous avons également étudié la pertinence de nos observations en utilisant la banque de données METABRIC où nous avons identifiés 2% de carcinomes mammaires NE (NBC), tous positifs pour le récepteur aux œstrogènes et de préférence p53 WT, conformément aux modèles utilisés pour les données fonctionnelles (MCF-7 et LNCaP). De manière intéressante, les patientes atteintes de NBC sont plus âgées, suggérant que l'accumulation de cellules sénescences et du SASP lors du vieillissement peut favoriser la NED. *In vivo*, nous avons observé que les glandes mammaires de souris âgées présentaient l'induction de marqueurs NE comparées à celles de jeunes souris, suggérant que vieillissement et différenciation neuroendocrine seraient liés. En conclusion, nous sommes en train de déterminer un nouvel effet du SASP, la NED, qui impacte les caractéristiques et le comportement des cancers du sein et de la prostate.

Abstract 061

Development of a novel anti-cancer strategy for Adrenocortical Carcinoma by nanovectorisation of microRNAs via Lipidots®

Soha REDA EL SAYED – 1^{ère} année de thèse 2018

Soha Reda El Sayed¹, Adrien Nougarede², Josiane Denis¹, Laurent Guyon¹, Fabrice Navarro² and Nadia Cherradi^{1*}

1- University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, IRIG, Biology of Cancer and Infection Laboratory UMR_S 1036, F-38000 Grenoble
2-University Grenoble Alpes, CEA, LETI, F-38000 Grenoble, France

Abstract Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare endocrine malignancy associated with poor prognosis and unmet clinical needs. Although high-throughput molecular profiling has improved our knowledge of ACC genetics and its driver genes (CTNNB1, ZNF3, TP53, Wnt, IGF2...), the disease pathogenesis is still unclear. Analysis of ACC microRNA (miRs) landscape revealed an aberrant microRNA expression in both tumors and patient serum. MicroRNAs are small non-coding RNAs of about twenty nucleotides that repress gene expression at the post-transcriptional level. Besides tumor-associated miR signatures, circulating miRs have emerged as promising diagnostic and prognostic biomarkers. We have demonstrated that overexpression of two miRs, miR-483-5p and miR-139-5p is involved in ACC aggressiveness. Using bioinformatics predictions and transcriptomic data, we identified and validated N-myc downstream-regulated gene family members 2 and 4 (NDRG2 and NDRG4) as targets of miR-483-5p and miR-139-5p, respectively. We further demonstrated

that both NDRG2 and NDRG4 are markedly underexpressed in ACC and predictive of patient prognosis. Based on these results, our aims are (1), to identify the oncogenic pathways activated by miR-483-5p and miR-139-5p in ACC, and (2), to evaluate both miRs as therapeutic targets for ACC. Using PCR arrays and Antibody arrays dedicated to cancer hallmarks as well as functional analyses, we established that miR-483-5p and miR-139-5p activate MAP kinase p38 and Akt/mTOR signaling pathways. Moreover, both miRs induce expression of key players in epithelial-mesenchymal transition (EMT) process and extracellular matrix remodeling. Thus, our data suggest that miR-483-5p and miR-139-5p are potential therapeutic targets to prevent ACC invasion and progression. To test this hypothesis, we want to take advantage of the lipid nanoparticles named «Lipidots®» patented by the CEA LETI to vectorize inhibitors of our candidate miRs in pre-clinical ACC models. The physico-chemical properties of Lipidots® as well as their biocompatibility and their particular tropism for the adrenal cortex suggest that they could be relevant vectors for our cancer model. We have generated miR Inhibitors-Lipidots® nanoparticles and started to investigate their effects on the aggressive phenotype of ACC cell lines. This nanoparticle-mediated delivery of miR-inhibitors or miR-mimics could be extended to other cancers featuring miR deregulations.

Abstract 062

CoSiAn - Analyse de Similarité par Combinaison utilisée afin d'améliorer la détection de similarité entre deux molécules et de faciliter la sélection de poses après amarrage moléculaire

Victor REYS – 1^{ère} année de thèse 2019

CNRS UMR 5048, Inserm U 1054, Centre de biologie structurale, Montpellier

Contexte et objectifs. Parmi les stratégies de développement d'un médicament In Silico, les techniques d'amarrage moléculaire et d'analyse de similarité des molécules chimiques sont des options de choix qui reposent sur des hypothèses différentes :

Pour l'amarrage moléculaire, la supposition est qu'une molécule s'ancrant favorablement à sa cible (complémentarité de forme et de nature chimique) pourrait être un candidat intéressant. Pour s'en servir, l'information structurale de la cible est requise.

Pour l'analyse de similarité, l'hypothèse est que deux molécules chimiques similaires devraient avoir une activité similaire sur une même cible. Cette approche requiert la connaissance de composés actifs.

Ces deux méthodes sont couramment utilisées, mais généralement de manière distincte du fait de leur prérequis. Elles sont toujours en développement actif car les résultats obtenus comportent régulièrement des limites (ou estimations peu fiables voire incorrectes).

Dans ce contexte, nous souhaitons développer une méthode intégrative, en combinant les prédictions d'amarrage moléculaire avec une analyse de similarité des ligands ancrés, afin d'enrichir la cohérence des poses amarrées.

Methodes. Dans le cadre de l'amélioration de la détection de la similarité moléculaire, 5 logiciels réputés (OpenBabel[1], ISIDA[2], LigCSRre[3], LSalign[4], SHAFTS[5]) ont été testés sur la base de données DUD-E[6] (~1 million de molécules réparties sur ~100 cibles). À des fins exploratoires, ces différents logiciels ont été combinés afin d'augmenter la précision de détection de similarité.

Parallèlement, nous utilisons un logiciel d'amarrage, PLANTS[7], le dernier né d'une longue série d'outils dans ce domaine.

En effet, par analyse et comparaison des similarités 2D et 3D des molécules et de leurs conformations liées, nous pensons enrichir le nombre de poses vraisemblables.

Résultats. CoSiAn (Analyse de Similarité par Combinaisons) est un outil, que j'ai développé, combinant les résultats de différents logiciels détecteurs de similarité, et que j'ai validé sur la base de données DUD-E. Les résultats ont montré des performances supérieures, par l'approche consensus, comparés aux résultats des logiciels pris isolément, sur la majorité des cibles.

CoSiAn a par la suite été implémenté dans un Algorithme Génétique de Sélection de Poses vraisemblables (GAPS) après un criblage virtuel par amarrage moléculaire. L'analyse de similarité entre les poses amarrées, entre elles ou avec certaines molécules de références, permet de sélectionner les poses ayant des propriétés physico-chimiques, de formes et de positions semblables.

Discussion. CoSiAn a été testé sur la base de données DUD-E qui vise à couvrir un large panel de protéines humaines. Dans le cadre de l'étude des protéine-kinases humaines, nous souhaitons développer un algorithme spécifique. Pour cela, l'algorithme sera entraîné avec des données expérimentales, ce qui devrait améliorer la qualité de la prédiction. Cette approche devrait ouvrir de nouvelles perspectives en chimogénomique notamment le profilage d'inhibiteurs de protéine-kinases pour des thérapies anticancéreuses plus efficaces.

Références :

- [1] O'Boyle et al., *Journal of Cheminformatics*, pp.3:33, 2011
- [2] Varnek et al., *Current Computer-Aided Drug Design*, Vol.4, No. 191, 2008
- [3] Quintus et al., *BMC Bioinformatics*, 11:10:245, 2009
- [4] Hu et al., *Bioinformatics* 34(13): pp.2209-2218, 2018
- [5] Xiaofeng et al., *J. Chem. Inf. Model*, 51(9), pp.2372-2385, 2011
- [6] Mysinger et al., *J. Med. Chem.*, 2012
- [7] Korb et al., *Lecture Notes in Computer Science*, 4150, pp.247-258, 2006

Abstract 063

Nouvelles voies chromatinienne de répression des éléments transposables

Emeline ROGER – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Déborah BOURC'HIS

Inserm U934, Institut Curie, PARIS

Emeline Roger, Tomasz Chelmicki, Aurélie Teissandier, Déborah Bourc'his

Les éléments transposables (ETs), des éléments génétiques mobiles, peuplent les génomes des êtres vivants. Lorsque leur activité n'est pas contrôlée, ils sont une menace pour l'intégrité du génome, pouvant modifier l'expression des gènes de l'hôte et mener à des phénotypes sévères comme la stérilité ou le développement de cancer. Les travaux menés jusqu'à présent montrent l'implication de deux nouveaux facteurs SPIN1 (*spindlin1*) et SPINDOC dans la régulation d'éléments transposables jeunes et actifs dans les cellules souches embryonnaires murines.

SPIN1 peut se lier à certaines marques d'histones (H3K4me3, H3R8me2) et a aussi été décrit comme co-activateur du facteur de transcription TCF7L, en aval de la voie Wnt. Cette dernière activité est bloquée par SPINDOC. C'est pourquoi nous nous intéressons également à l'impact de l'interaction SPIN1/SPINDOC sur les cibles génomiques de SPIN1. Enfin, la caractérisation du premier modèle murin SPINDOC KO apporte de nouvelles informations sur le rôle de cette protéine très peu étudiée.

Abstract 064

Rôle de la désensibilisation de CXCR4 dans la spécification lympho-myéloïde des progéniteurs hématopoïétiques multipotents

Vincent RONDEAU – 4^e année de thèse 2019

V. Rondeau¹, A. Bonaud¹, Z. Abou-Nader¹, C. Kappel¹, D. Haferssas¹, L. Vogg¹, D.H. McDermott², P.M. Murphy², M. Aurrand-Lions³, S.J.C. Mancini³, M. Espéli¹ et K. Balabanian¹

1- Université de Paris, Institut de Recherche Saint-Louis, EMILY, INSERM U1160, 75010, Paris, France.

2- Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Section Signalisation Moléculaire, Institut National des Maladies Allergiques et Infectieuses, NIH, Bethesda, MD, 20892

3- CRCM, Inserm U1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Univ U105 - Institut Paoli-Calmettes, 13273, Marseille, France.

Contexte et objectifs. Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) résident dans la moelle osseuse (MO) entourés par les niches endostéales et (péri)-vasculaires et sont à l'origine des cellules immunes circulantes. Les niches médullaires jouent un rôle dans la spécification et l'engagement myéloïde versus lymphoïde des CSPH. Dans la MO, le couple formé par la chimiokine CXCL12 et l'un de ses récepteurs, CXCR4, exerce un rôle clé dans la régulation de la rétention et la quiescence des CSPH. Ces processus sont dérégulés dans le Syndrome WHIM (SW), une maladie immuno-hématologique rare liée à des mutations autosomiques dominantes du gène codant CXCR4, qui altèrent la désensibilisation du récepteur et conduit à un gain de fonction en réponse à CXCL12. Cliniquement, le SW se caractérise notamment par une profonde leucopénie circulante qui affecte les lignages lymphoïde et myéloïde dont les mécanismes restent à déterminer.

Méthodes. Grâce à un modèle murin du SW élaboré selon une stratégie de knock-in et à l'accès à des prélèvements biologiques de patients

atteints du SW, nous avons testé l'hypothèse que la lymphopénie circulante associée au SW résulte de défauts hématopoïétiques dans la MO.

Résultats. Nous avons révélé un rôle-clé de la désensibilisation de CXCR4 dans la différenciation lymphoïde des CSPH et identifié les progéniteurs multipotents (MPP) comme étant le stade défectueux. La divergence entre les lignages lymphoïde et myéloïde se produit précisément au stade MPP au sein duquel existe une hétérogénéité : les MPP2/3 sont biaisés myéloïde et les MPP4 sont orientés lymphoïde. Ceci nous a incité à analyser l'impact de la désensibilisation de CXCR4 sur la diversité moléculaire et fonctionnelle du compartiment de MPP. Dans la MO des souris mutantes, nous avons observé une diminution du nombre de MPP4, tandis que ceux de MPP2/3 sont augmentés. L'analyse de prélèvements médullaires de patients atteints du SW rapporte une diminution de la fréquence des progéniteurs lymphoïdes et une augmentation de celle des progéniteurs myéloïdes. Dans le modèle murin du SW, le biais myéloïde du compartiment MPP implique des défauts intrinsèques et extrinsèques, comme l'attestent nos expériences de reconstitution croisée de l'hématopoïèse, et s'avère associé à une expansion anormale et une reprogrammation métabolique et myéloïde des MPP4 porteurs de la mutation de CXCR4, comme le rapportent nos analyses par RNAseq combinées à des études fonctionnelles appropriées.

Discussion. Nos résultats supportent un rôle majeur de la désensibilisation de CXCR4 dans le processus de lympho-hématopoïèse, notamment par la capacité de ce processus à réguler le potentiel lymphoïde qui caractérise les MPP4.

Abstract 065

Translatome-based classification of pancreatic cancer reveals a metabolic dependency of a new tumor subtype

Sauyeun SHIN – 4^e année de thèse 2019

Sauyeun SHIN¹, R Nicolle², M Ayadi², R Samain¹, C Jean¹, C Joffre¹, S Rocchi³, J Iovanna⁴, N Dusetti⁴, O Larsson⁵, C Bousquet¹, S Pyronnet¹, Y Martineau¹.

1- Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037, Toulouse, France,

2- Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris, France,

3- Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, INSERM U1065, Nice, France.

4- Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, Marseille, France,

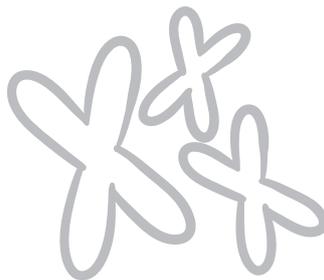
5- Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institutet, Stockholm 171 76, Sweden,

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is the 4th leading cause of cancer related-death with a 5-year survival rate not exceeding 5%. The important heterogeneity between tumors and the high abundance of the stroma hinders the analysis of the pancreatic carcinogenesis processes. Current classification of PDAC patients based on mutational landscape and genome wide transcriptomic analysis emerged 2 principal subtypes (basal-like and classical subtypes) correlating with patient

overall survival but not to a particular sensitivity to a molecule class. Several groups including ours demonstrated the presence of a high dysregulation at the protein synthesis level in PDAC cancer cells and microenvironment.

Thus, we performed translational analysis using a collection of pancreatic Patient-Derived Xenografts (PDX) to define a new subtype associated to particular mechanisms undetectable at the transcriptional level. Highly translated mRNAs have been purified from 28 pancreatic PDX using a discontinuous sucrose gradient, and RNAseq data from total or translated mRNAs has been processed to define translationally regulated mRNA in human cancer cells using ANOTA2seq. Through non-supervised bioinformatics approaches, we identified a new subtype with particular translational dysregulations of mRNAs implicated in the integrated stress response (ISR), including a high level of ATF4 translation and a global down regulation of protein synthesis.

Herein, we investigated the characteristics associated to this "ATF4 high" subtype. Our results demonstrate a particular dependency for amino acid metabolism inducing a differential response to autophagic stimuli and resistance to apoptosis.



Abstract 066

Caractérisation du rôle de la particule 5S libre dans le contrôle du cycle cellulaire

Sophie TAGNERES – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Simon LEBARON

CNRS UMR 5099, Bat IBCG, TOULOUSE

L'augmentation de la synthèse des protéines et l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire sont deux éléments majeurs dans la mise en place d'un programme tumoral. La particule 5S, constituée des protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11 associées à l'ARNr 5S, contrôle directement ces deux mécanismes cellulaires. Cette particule est présente sous deux formes dans la cellule : une forme associée aux ribosomes, favorisant la synthèse de protéines et la prolifération cellulaire, et une forme libre, préférentiellement accumulée en réponse à des stress cellulaires. Cette dernière est capable d'interagir avec le principal régulateur négatif de p53, Mdm2, ce qui a pour effet de stabiliser p53 et d'induire un arrêt du cycle cellulaire. Ainsi, l'équilibre entre ces deux formes dicte la destinée cellulaire. Cependant, encore aujourd'hui, peu d'informations concernant la forme libre de cette particule sont disponibles, notamment, sa capacité à interagir avec plusieurs partenaires est encore aujourd'hui mal comprise. Ainsi, la compréhension de l'ensemble des mécanismes par lesquels la particule 5S libre régule le cycle cellulaire représente un nouvel axe de recherche prometteur pour la mise en place de thérapies anti-cancéreuses innovantes visant à stabiliser p53 et à inhiber la prolifération cellulaire.

Le but du projet présenté ici est de réaliser la caractérisation fonctionnelle et structurale de la particule 5S libre afin de définir son rôle dans le cycle cellulaire. Ainsi, nous proposons de purifier les particules 5S libres à partir de cellules humaines puis d'analyser la composition

des complexes purifiés par spectrométrie de masse. Après validation des interactions avec des partenaires potentiels, nous évaluerons leur rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la stabilisation de p53. En parallèle, la structure des particules 5S libres sera analysée par cryo-microscopie électronique afin d'identifier les déterminants moléculaires régissant la formation et l'architecture de ces particules.

Nos premiers résultats indiquent l'enrichissement spécifique dans les particules purifiées de nouveaux potentiels partenaires dont p53 et Hexim1. La présence de p53 au sein de ces particules suggère qu'en plus de promouvoir la stabilisation de p53, les particules 5S pourraient moduler son activité. Quant à lui, Hexim1 semble être un potentiel partenaire intéressant puisque déjà connu pour être impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire en réponse au stress.

Les données issues de ce projet permettront d'identifier l'ensemble des voies activées par cette particule libre mais aussi de résoudre sa structure. Les analyses structurales réalisées permettront également d'identifier les déterminants moléculaires régissant l'architecture du complexe Mdm2/p53, cible anti-cancéreuse majeure. À travers cette caractérisation fonctionnelle et structurale de la particule 5S libre, ce projet a pour ambition d'ouvrir la voie au développement de thérapies anti-cancéreuses ciblant ce régulateur majeur du cycle cellulaire.

Abstract 067

Rôle de la barrière sang-nerf dans la neuropathie induite par l'oxaliplatine

Sonia TAÏB – 4^e année de thèse 2019

Inserm U1050 - CNRS UMR 7241 - Collège de France, Paris

Le traitement des cancers fait bien souvent intervenir l'utilisation de molécules chimio thérapeutiques. Notamment, l'oxaliplatine provoque chez presque 90% des cas des effets secondaires comme la neuropathie périphérique chimio-induite (NPCI). Les symptômes sont des douleurs neuropathiques très difficiles à soulager, une hypersensibilité au froid et au toucher. Il n'y a actuellement pas de traitement de cette neuropathie et parfois elle pousse le patient à arrêter le traitement, compromettant la cure du cancer. Mieux comprendre l'étiologie de cette pathologie liée à la chimiothérapie est donc un enjeu important. L'oxaliplatine étant administrée par voie sanguine, nous souhaitons étudier la composante vasculaire du développement de la NPCI. En effet, il n'existe aucune étude s'intéressant au rôle des vaisseaux sanguins intra-nerveux (VIN) dans le passage de cette molécule toxique du sang vers les neurones du système nerveux périphérique. Les objectifs de ce projet original sont donc :

la barrière hémato-encéphalique (BHE). Et identifier les transporteurs responsables du passage de l'oxaliplatine à travers la BNB.
2) d'étudier l'implication des vaisseaux intra-nerveux dans le développement de la NPCI.

Ce projet vise, au long terme, à proposer de nouvelles pistes thérapeutiques afin d'empêcher le développement des symptômes liés à l'utilisation de molécules chimio thérapeutiques et ainsi améliorer la qualité de vie des patients.

Afin de décrire pour la première fois la « carte d'identité » moléculaire de la BNB par étude transcriptomique, nous avons mis au point un protocole permettant de purifier les vaisseaux sanguins issus de cerveaux et des nerfs sciatiques de souris adultes. Par ailleurs, nous avons développé un modèle murin de la NPCI aigue afin d'étudier d'un point de vue moléculaire l'implication des VIN.

Le séquençage transcriptomique de la BNB et de la BHE a permis de mettre en évidence les ARNm communément exprimés par ces

1) de caractériser la composition moléculaire de la barrière sang-nerf (BNB) en la comparant à la barrière la plus imperméable du corps :

2 barrières et ceux plus spécifiques. De manière intéressante, des gènes impliqués dans des mécanismes d'angiogenèse, de migration cellulaire ou encore de régulation de l'expression génique, sont enrichis au niveau de la BNB suggérant une plasticité de ces VIN par rapport à ceux du cerveau. De plus, des transcrits codant pour des transporteurs connus de l'oxaliplatine, OCT3 et OCTN2, sont plus présents au niveau de la BNB que de la BHE, ceux qui fait de ces protéines des candidats moléculaires intéressants.

Après injections d'oxaliplatine, les souris développent une hypersensibilité mécanique et une hypersensibilité au froid, symptômes caractéristiques de la NPCI. La vascularisation intra-nerveuse des nerfs sciatiques

semble peu altérée d'un point de vue morphologique, avec une expression continue de la protéine de jonction serrée claudine 5 au niveau des cellules endothéliales. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse que l'oxaliplatine passerait la BNB via des transporteurs spécifiques.

Nous sommes actuellement en train d'effectuer une analyse transcriptomique de la BNB de ces souris injectées afin de déterminer de manière plus précise et exhaustive les conséquences moléculaires sur la BNB. Ce projet pionnier explore la possibilité que la NPCI pourrait être une pathologie neuro-vasculaire.

Abstract 068

Rôle de l'instabilité génomique dans le potentiel métastatique des cellules tumorales circulantes (CTC) de cancer bronchique non à petite cellule (CBNPC)

Tala TAYOUN – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Françoise FARACE

CNRS UMS 3655, Gustave Roussy, VILLEJUIF

Tala Tayoun^{1,2*}, Vincent Faugeroux^{1,2*}, Emma Pailler^{1,2}, Marianne Oulhen^{1,2}, Olivier Deas³, Laura Mezquita⁴, Laura Brulle-Soumare³, Stefano Cairo³, Jean-Yves Scoazec⁵, Virginie Marty⁶, Maud NgoCamus⁴, Claudio Nicotra⁴, Patricia Kannouche⁶, Benjamin Besse⁴, Jean-Gabriel Judde³, Patrycja Pawlikowska², Françoise Farace^{1,2}

1- Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, "Cellules Tumorales Circulantes" Plateforme translationnelle, CNRS UMS3655 – INSERM US23AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France ; 2- Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy INSERM "Biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies thérapeutiques en oncologie", F-94805, VILLEJUIF France ; 3- XenTech, F-91000, EVRY France ; 4- Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Département de Médecine oncologique, F-94805, VILLEJUIF France ; 5- Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, "Histo-Cytopathologie" Plateforme translationnelle, CNRS UMS3655 – INSERM US23 AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France ; 6- Université Paris-Sud, Institut Gustave Roussy INSERM U8200 "Stabilité génétique et oncogénèse", F-94805, VILLEJUIF France

* Les deux auteurs ont contribué à parts égales à cette étude.

Contexte et objectifs. La progression métastatique est la principale cause de décès par cancer. La formation de métastases est due à une fraction rare de cellules tumorales circulantes (CTC) qui possèdent des caractéristiques de cellules souches cancéreuses et la capacité d'initier une tumeur. Dans ce projet nous émettons l'hypothèse que des mécanismes d'instabilité génomique et de réparation de l'ADN ont un rôle clé dans le potentiel métastatique des CTC. Nous avons étudié des modèles de xénogreffes dérivés de CTC (*CTC-derived xenografts - CDX*) de patients atteints de cancer bronchique non à petite cellule (CBNPC) ainsi que des lignées établies à partir de ces CDX, et présentons ici leur caractérisation génomique et fonctionnelle. Ce travail nous permettra d'identifier des altérations génétiques et fonctionnelles spécifiques des CTC, pouvant représenter de nouvelles cibles thérapeutiques.

Méthodes. Les CTC ont été enrichies à partir d'échantillons de sang (30mL) de 58 patients atteints de CBNPC avancés et implantées par voie sous-cutanée dans des souris Nod/Scid-IL2R γ -/- (NSG). Quatre modèles CDX; GR-CDXL1, GR-CDXL2, GR-CDXL3 et GR-CDXL4 ont été développés.

Trois lignées cellulaires ont pu être établies à partir des tumeurs de ces CDX. Ces modèles ont été caractérisés par immunofluorescence (IF), immunohistochimie et séquençage de l'exome. Le stress réplicatif, l'instabilité chromosomique (CIN) et la réponse aux dommages à l'ADN ont été évalués dans les lignées cellulaires par IF, western blot et l'étude de la dynamique des fourches de réplication. Leur tumorigénicité et leur potentiel métastatique ont été évalués dans le modèle de membrane chorioallantoïque (CAM) d'embryon de poulet et des souris NSG greffées par voie intracardiaque.

Résultats. Les quatre CDX présentent un phénotype épithélial, concordant avec l'histologie des biopsies des patients. Le séquençage de l'exome et la reconstruction des arbres phylogénétiques des quatre modèles ont montré la présence d'altérations du nombre de copies (CNA) de plusieurs gènes « *drivers* » de l'instabilité génomique. Tous les CDX comportent des altérations du gène *PARP1*, GR-CDXL1 présente une mutation du gène *BRCA2* et une délétion du promoteur du gène *FANCA*. Une perte de *BRCA1* et un gain d'*AKT* ont été détectés dans GR-CDXL3, ainsi qu'une duplication complète du génome (*whole-genome doubling*). Les résultats de cette étude génomique nous ont orientés vers l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN dans nos modèles. Un défaut dans la voie de réparation par recombinaison homologue (*HR*) et un stress réplicatif chronique est observé dans GR-CDXL1. GR-CDXL3 présente une CIN numérique indépendante de dérèglement pré-mitotique. GR-CDXL4 présente un stress réplicatif et une CIN élevée. L'injection des trois lignées dérivées de CDX génère des métastases dans des souris NSG ainsi que dans le modèle de la CAM, en nombre particulièrement élevé pour GR-CDXL3, corrélant avec son profil de CIN.

Discussion. Ces résultats génomiques et fonctionnels mettent en évidence différents mécanismes d'instabilité génomique dans les modèles GR-CDXL1, GR-CDXL3 et GR-CDXL4. Des tests pharmacologiques *in vitro* avec des drogues ciblant les différents gènes impliqués dans les mécanismes d'instabilité et de réparation de l'ADN sont en cours. Les résultats obtenus *in vitro* seront confirmés dans les modèles CAM et NSG. Nous espérons que ces résultats permettront d'aboutir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la progression métastatique du CBNPC.

Abstract 069

Origines de la létalité cellulaire consécutive à une dérégulation de la recombinaison homologue dans les cellules humaines

Mélissa THOMAS – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Josée GUIROUILH-BARBAT

Inserm U1016-CNRS UMR 8104, Institut Cochin, PARIS

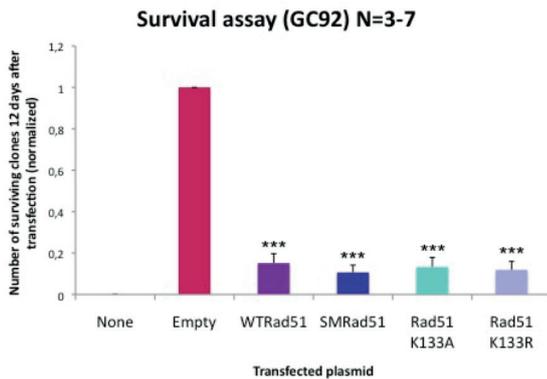
L'instabilité génétique est une des caractéristiques du cancer. Un défaut dans les systèmes de surveillance et de réparation de l'intégrité du génome prédispose à la formation de tumeurs et à leur progression.

Les cassures double brin (CDB) sont des lésions extrêmement toxiques dont la réparation peut donner lieu à des réarrangements chromosomiques. Il existe deux systèmes majoritaires de réparation des CDB dont la recombinaison homologue (RH), qui permet de réparer ces CDB de manière fidèle. La RH protège également les fourches de réplication bloquée et permet le redémarrage de la réplication. Rad51 et BRCA2 sont les protéines pivots de la RH.

Des résultats préliminaires ont montré que l'inhibition de la RH par un dominant négatif de Rad51, ainsi que la surexpression de Rad51, est toxique dans des cellules humaines, bien qu'un faible nombre de cellules arrive à survivre.

Figure 1

Nombre de colonies survivantes, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle, 12 jours après transfection. SMRad51, Rad51 K133A et Rad51 K133R sont trois formes dominantes négatives de la Rad51 qui inhibent la RH.



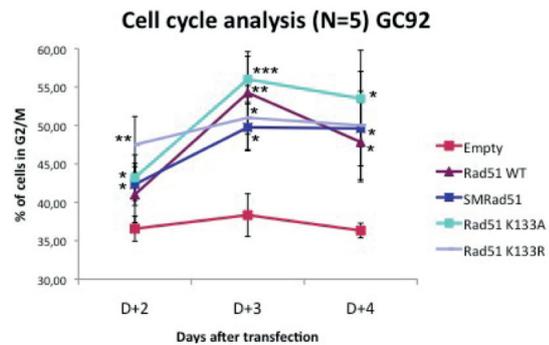
Les formes héréditaires du cancer du sein ou des ovaires sont majoritairement mutées dans BRCA2 ou BRCA1. Des mutations dans des gènes de la RH sont également retrouvées dans des cancers de la prostate, de l'estomac, du colon, du pancréas, des poumons, de la tête et du cou.

Ainsi, mon projet a pour but d'identifier les mécanismes et les causes de la létalité induite par une dérégulation de la RH dans les cellules humaines, ainsi que de comprendre comment certaines cellules arrivent à y survivre.

J'ai tout d'abord analysé les cycles cellulaires de cellules inhibées pour la RH, ou surexprimant Rad51. J'ai observé que les cellules s'accumulent en G2/M.

Figure 2

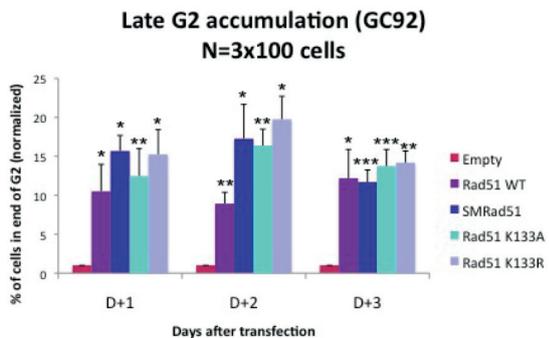
Pourcentage de cellules en G2/M. Les cellules sont marquées à l'iodeure de propidium (IP) puis analysées au cytomètre de flux. Le marquage à l'IP permet de différencier les phases G1, S et G2/M.



L'immunofluorescence permet de distinguer spécifiquement la mitose de la fin de la phase G2 grâce au marquage de l'histone 3 phosphorylée sur la sérine 10 (H3PS10). Les cellules exprimant une forme de Rad51 s'accumulent en fin de G2.

Figure 3

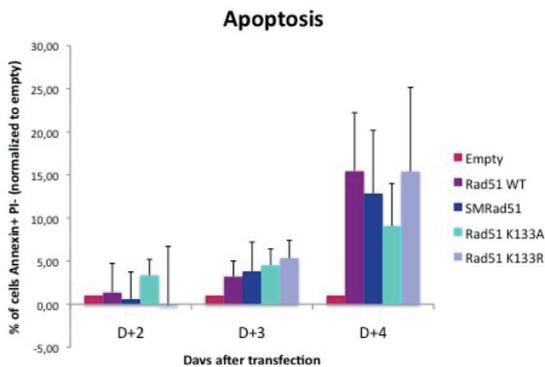
Pourcentage de cellules en fin de G2, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle. Les cellules en fin de G2 présentent un marquage H3PS10 ponctiforme et faible (Hendzel et al. 1997).



Des expériences de vidéomicroscopie (coll. O. Gavet, Institut Gustave Roussy) ont suggéré que les cellules transfectées par une des formes de Rad51 mourraient en apoptose. Des résultats préliminaires de mesure de la mort apoptotique par marquage Annexin-V semblent confirmer ce résultat.

Figure 4

Pourcentage de cellules apoptotiques, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle.



Je propose que dans les cellules déficientes en RH, une accumulation de fourches de réplication bloquées provoquerait une forte augmentation du stress réplicatif. La surexpression du Rad51 WT entrainerait une accumulation toxique d'intermédiaires de recombinaison, qui saturerait les systèmes de traitement de ces intermédiaires.

Pour valider cette première hypothèse, j'analyse la dynamique de réplication par peignage moléculaire (coll. M. Debatisse, Institut Gustave Roussy).

Les premières observations semblent indiquer que les cellules transfectées par une des formes de Rad51 ont une réplication ralentie.

Je testerai ma seconde hypothèse en mesurant la quantité d'intermédiaires de recombinaison grâce à la technique d'électrophorèse en gel 2D (coll. S. Lambert, Institut Curie - Orsay)

Les tumeurs dérégulées pour les protéines de la RH ont nécessairement développé des mécanismes ou des mutations permettant la survie et la prolifération de ces cellules.

Des analyses in-silico ont permis d'établir une liste de gènes candidats, qui sont co-mutés de manière significative dans les cancers BRCA1/2. Ces gènes jouent un rôle soit au niveau des fourches de réplication, soit au niveau du checkpoint G2/M.

Les résultats de séquençages de fibroblastes primaires de patients FANCD1 ainsi que les résultats d'un crible haut débit de banque shARN viendront étoffer cette liste (coll. R. Veitia, Institut Jacques Monod).

Abstract 070

La protéine GILZ : un nouveau modulateur important de la biologie des cellules dendritiques

Mathias VETILLARD – 4^e année de thèse 2019

Inserm UMR-S996 – Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique – Clamart

Les cellules dendritiques (DC) sont primordiales dans l'activation des réponses lymphocytaires T (LT) anti-tumorales. Toutefois, leur efficacité d'activation des LT effecteurs (Teff) est altérée par le microenvironnement tumoral (MET) au profit de leur polarisation vers un profil régulateur (DCreg) favorisant l'accumulation de LT régulateurs (Treg), qui contrecarrent la fonction des Teff. Au vu de l'importance des DC pour le succès des thérapies anti-tumorales, caractériser les mécanismes qui contrôlent leur subversion en DCreg au sein du MET et comment restaurer et/ou améliorer leurs fonctions dans cet environnement est essentiel. Nous nous intéressons plus particulièrement à la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ), un régulateur de la transcription et de la signalisation relayant les effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes (GC) dont l'expression augmente sélectivement dans les DC infiltrant les tumeurs. Les travaux précédents de mon équipe ont démontrés que GILZ promeut la différenciation de DCreg in vivo. En générant des souris dont les DC sont conditionnellement déficientes en GILZ (CD11c-GILZko), nous avons ensuite établi que l'inactivation de GILZ accroît la capacité de macropinocytose des DC mais réduit leur activité de présentation croisée. En outre, la délétion de GILZ dans les DC annule les effets négatifs du stress sur la réponse aux traitements anti-tumoraux chez la souris.

Sur la base de ces données, j'ai entrepris de caractériser 1) l'expression de GILZ dans les sous-populations de DC de tissus sains ou de tumeurs, 2) l'effet de cette expression sur la migration des DC et 3) son impact sur

l'activation de Teff et Treg dans des cancers et lors de traitements de type «immune-checkpoint blockade».

L'expression de GILZ est hétérogène entre les sous-populations de DC, dominante dans les DC conventionnelles de type1 des organes lymphoïdes. Finement régulée en contexte pathologique, elle est augmentée dans les cellules CD11c issue de peau dysplasique et de ganglion drainant des tumeurs TC1, mais diminuée lors d'inflammation cutanée aigue (DTH). De plus, la migration des DC GILZko aux ganglions lymphatiques est retardée, et leur chimiotaxie envers CCL21 est réduite. Enfin, alors que les souris CD11c-GILZko présentent une proportion de Treg similaire à celle des souris contrôles à l'homéostasie, nous rapportons un défaut quantitatif en Treg au sein des tumeurs TC1 et lors de la DTH. Ce défaut est sans impact sur la croissance tumorale mais est associé à une exacerbation des symptômes de la DTH.

Nos travaux démontrent que l'expression de GILZ par les DC contrôle leur migration vers les ganglions et promeut l'accumulation de Treg en contexte pathologique, mais non à l'homéostasie. Ces travaux suggèrent que le développement d'un inhibiteur pharmacologique ciblant GILZ pourrait améliorer les traitements anti-tumoraux via la modulation de la biologie des DC.

Abstract 071

Comprehensive transcriptomic characterization of 1600 sarcomas for diagnosis and immune contexture

Julien VIBERT – 1^{ère} année de thèse 2018

Authors: **Julien Vibert***, **Sarah Watson***, Camille Benoist, Joshua Waterfall, Gaëlle Pierron† and Olivier Delattre†

* Co-first authors

† Co-senior authors

Affiliation: Institut Curie, Paris, France

Introduction. Sarcomas represent about 15 % of all childhood cancers and are still lethal in a large proportion of cases. They comprise a heterogeneous group of bone and soft tissue tumors with more than 100 distinct histological entities, often presenting a diagnostic challenge to pathologists.

Methods. To address this pathological complexity and better characterize the molecular biology of sarcomas, we performed whole-transcriptome RNA-seq on frozen tumor tissues as part of the diagnostic workflow for more than 1600 patients, mainly children and young adults, addressed for sarcoma molecular diagnosis throughout France.

Results. From a clinical perspective, RNA-seq proves to be a powerful complementary test to pathology for diagnosis of sarcomas: it allows agnostic detection of subtype-specific fusion transcripts, as well as diagnostic indication by gene-expression profile clustering.

In addition to its diagnostic utility, RNA-seq provides a rich source of information for studying the molecular biology of sarcomas. Indeed,

as shown recently in our group, it allows detection of previously uncharacterized sarcoma entities associated with novel fusion genes.

Using dimensionality reduction techniques, either linear such as PCA, or non-linear such as t-SNE or UMAP, we perform unsupervised clustering of our cohort, revealing insights into the global structure of the transcriptomic landscape of sarcomas. We show that many histological entities have a distinct gene-expression profile, emphasizing the utility of RNA-seq for diagnosis.

To explore the immune microenvironment of sarcomas and potential correlates of response to immunotherapy, we deconvolute bulk RNA-seq data to estimate the presence of immune and stromal cell types, allowing a comprehensive characterization of the immune landscape of sarcomas.

Finally, we apply state-of-the-art deep learning tools to perform unsupervised clustering and non-linear dimensional reduction of our RNA-seq samples, allowing a finer and more insightful representation of the structure of the sarcoma transcriptomic landscape.

Conclusion. Besides improving the diagnostic workflow for patients, our comprehensive analysis of sarcoma RNA-seq allows characterization of distinct molecular subtypes and of the immune landscape, opening up perspectives for better diagnosis, classification, and biological discoveries in sarcoma.

Abstract 072

SALL4 expression defines a molecular subset of pancreatic ductal adenocarcinoma with poor prognostic features

Angélique VIENOT – 1^{ère} année de thèse 2017

Authors: **Angélique Vienot**^{1,2,3}, Caroline Truntzer⁴, Maxime Laydi^{1,5}, Charline Tirole¹, Franck Monnier^{1,6}, Kamal Asgarov¹, Virginie Mougey¹, Adeline Bouard¹, Marine Jary^{1,2,3}, Dewi Vernerey^{1,7}, Jean-Paul Feugeas¹, Christophe Borg^{1,2,3}

Affiliations: 1. University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France; 2. Department of Medical Oncology, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon, France; 3. INSERM CIC-1431, Clinical Investigation Center in Biotherapy, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon, France; 4. Platform of Transfer in Cancer Biology, Centre Georges-François Leclerc, F-21000 Dijon, France; 5. Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon, France; 6. Department of

Pathology, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon, France; 7. Methodological and Quality of Life in Oncology Unit, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon, France;

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is marked by molecular heterogeneity assigning a poor prognosis and resistance to therapies. Stemness properties may provide a powerful explanation for tumour heterogeneity. The embryonic transcription factor SALL4 is an unfavourable predictor of survival expectancy in various cancers, but the role of this protein in PDAC remains unclear.

Methods: Transcriptomic databases (ICGC, TGCA, and GSE85916) were extracted from their respective data portal. Overall survival (OS) and clinicopathological and mutational features were evaluated according

to the level of SALL4 expression. The correlated and intersected genes between the three databases were investigated through KEGG and GO pathway enrichment analyses to define SALL4 high samples. Specific markers of a stromal signature will be assessed by immunohistochemistry in a prospective cohort of patients with localized PDAC.

Findings: Median OS was 24.5 months versus 15.6 months in SALL4 high and low subsets, respectively ($H=1.55$; $P=0.007$) in the ICGC cohort. Clinicopathological parameters and genomic alterations were not associated with the level of SALL4 expression. SALL4 was enriched by squamous tumours (45.3%) but was a more relevant prognostic

biomarker than molecular classification in multivariate analysis. PDAC transcriptomic profile correlated with SALL4 expression includes stemness signalling, metabolic feature, EMT, angiogenesis, stromal composition, and TGF- β -driven cancer-associated fibroblasts (CAFs) pathways. A SALL4-related stromal signature was identified, and will be applied to patient samples using immunohistochemistry for clinical validation.

Interpretation: A SALL4 high expression defines a side population of PDAC associated with a poor prognostic and enriched by TGF- β -activated CAFs.

Abstract 073

Étude par biologie structurale intégrée de complexes de complexes transcriptionnels du récepteur nucléaire ERRalpha impliqués dans la progression tumorale

Pierre VILELA – 1^{ère} année de thèse 2018

Inserm U1258 - CNRS: UMR 7104 - Univ. de Strasbourg - Illkirch

Auteurs : **P. Vilela**, B. Klaholz, I. Billas

Le récepteur nucléaire apparenté aux récepteurs aux œstrogènes (ERRalpha) est un facteur de transcription ligand-dépendant régulant l'expression de gènes clefs du métabolisme énergétique des cellules. Dans le cas de cellules cancéreuses, le récepteur ERRalpha est surexprimé et cette observation est corrélée à la présence de tumeurs agressives et au développement de résistances aux traitements. Cette protéine étant impliquée directement dans la prolifération cellulaire, sa disparition par knock-down conduit à la réduction de la croissance des tumeurs, ainsi qu'à leur multiplication. ERRalpha apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle.

Le but de ma thèse consiste en la détermination structurale de complexes associés à ERRalpha et en la caractérisation biochimique et biophysique des interactions entre les différentes sous-unités des complexes par des méthodes de biologie structurale.

Nous avons récemment obtenu la structure cristallographique du domaine de liaison à l'ADN de ERRalpha positionné sur un élément de réponse naturel et avons caractérisé les interactions protéine-protéine et protéine-ADN. De plus, dans le cadre d'un projet impliquant le récepteur entier, nous étudions le complexe co-activateur ERRalpha/PGC-1alpha, principal partenaire de ERRalpha, par cryo microscopie électronique (cryo EM), ainsi que le complexe inhibiteur PCAF/ERRalpha. Des grilles de microscopie pour le complexe ERRalpha/PGC-1alpha de bonne qualité ont été obtenues permettant ainsi l'acquisition de jeux de données de cryo EM qui sont en cours d'analyse. Ceci devrait nous permettre une première reconstruction 3D de ce complexe et l'analyse fine des interactions entre le récepteur et son co-activateur PGC-1alpha. Quant au complexe PCAF/ERRalpha, l'expression et la purification ont été menées à bien et les études biochimiques et biophysiques sont en cours.



Affiches

Abstract 074

Développement et validation pré-clinique d'un peptide thérapeutique dans le cancer mammaire

Tesnim AL KHALIFA – 1^{ère} année de thèse 2018

AL KHALIFA Tesnim¹, BAUD Stéphanie¹, CHAZEE Lise¹, KIEFFER Bruno², DEDIEU Stéphane¹, ETIQUÉ Nicolas¹

1- UMR CNRS 7369 MEDyC, Equipe «Matrice Extracellulaire, Cancer et Cibles thérapeutiques», Université Reims Champagne-Ardenne, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

2- UMR CNRS 7104 - Inserm U 1258, Equipe «Structure et Dynamique des polymères biologiques par Résonance Magnétique Nucléaire» IGBMC, 1 Rue Laurent Fries 67400 Illkirch-Graffenstaden

La protéase aspartique pro-cathepsine D est sécrétée abondamment dans le microenvironnement tumoral par les cellules cancéreuses mammaires et constitue un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. Cette protéine est en effet capable de stimuler l'angiogenèse, la formation de métastases ainsi que la croissance des fibroblastes. Cet effet sur les fibroblastes passe par la liaison de la pro-cathepsine D à un récepteur d'endocytose de la famille des récepteurs au LDL, le récepteur LRP-1. Cette liaison se fait au niveau de la partie extracellulaire de la chaîne β du récepteur et plus particulièrement au niveau des résidus 349 à 394. Les fibroblastes jouant un rôle essentiel au sein du microenvironnement tumoral, notre objectif est de concevoir des peptides originaux dérivés de LRP-1 capables de bloquer sélectivement l'interaction pro-cathepsine D/LRP-1 afin d'en inhiber ses effets délétères lors de la tumorigenèse.

Une caractérisation complète de l'interaction est un préalable au *design* de peptides bloquants. C'est pourquoi nous avons initié des approches *in silico* pour caractériser de façon précise cette interaction. L'absence de données structurales expérimentales de la chaîne β de LRP-1 sur le serveur PDB nous a poussé à utiliser des

méthodes bioinformatiques de prédiction structurale afin de proposer une structure représentative de la zone minimale d'interaction.

Un outil de dynamique moléculaire (logiciels GROMACS) a été utilisé à fin d'accéder aux différentes conformations explorées par ce fragment en conditions de température et pression physiologiques.

Les structures et conformations obtenues ont été exploitées dans des expériences de *docking* moléculaire en prenant pour cible la pro-cathepsine D (PDB : ILYW).

En parallèle, un peptide de 46 acides aminés (nommé F4) correspondant à la zone minimale d'interaction de LRP-1 (résidus 349 à 394) a été synthétisé afin d'étudier par thermophorèse micro-échelle (MST) son affinité envers la pro-cathepsine D.

Nos expériences *in silico* ont permis de proposer des modèles pertinents d'interaction entre la pro-cathepsine D et LRP-1 et d'identifier des résidus clés au sein de ces deux partenaires.

Par ailleurs, l'étude de la liaison du peptide F4 à la pro-Cathepsine D par thermophorèse micro-échelle a permis de définir un K_D à l'équilibre pour cette interaction proche de 2 μ M.

Les résultats des analyses *in silico* sont en cours de validation par des approches expérimentales de biologie moléculaire mais également de biophysique (RMN). A partir de ces données, le peptide F4 sera optimisé de sorte que celui-ci puisse répondre aux conditions de biocompatibilité (solubilité, stabilité...) et comportant les résidus clefs identifiés. Ce dernier pourra alors être testé dans des expériences *in cellulo* afin de caractériser son effet sur l'interaction entre la pro-cathepsine D et le récepteur LRP-1.

Abstract 075

BMPRI1 and JAK2/STAT3 inhibition targets BMP4-niche mediated leukemic stem cells that persist during CML remission

Kawtar ARIZKANE – 1^{ère} année de thèse 2018

K. Arizkane^{1,2,3,4}, S. Jeanpierre^{1,2,3,4,5}, S. Thongjuea⁶, E. Grockowiak^{1,2,3,4}, K. Geistlich^{1,2,3,4}, L. Barra^{1,2,3,4}, T.Voeltzel^{1,2,3,4}, A. Guillemin⁷, S. Gonin-Giraud⁷, O. Gandrillon⁷, F. Nicolini^{1,2,3}, A. J. Mead⁸, V. Maguer-Satta^{1,2,3,4} and S. Lefort^{1,2,3,4}

1- CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69000 Lyon; 2- Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69000 Lyon; 3- Université de Lyon, 69000, Lyon, France; 4- Department of Signalling of tumour escape, Lyon; 5- Centre Léon Bérard, 69000 Lyon; 6- MRC WIMM Centre for Computational Biology,

Weatherall Institute of Molecular Medicine, NIHR Oxford Biomedical Research Centre, John Radcliffe Hospital OX3 9DU, Oxford, UK; 7- Laboratoire de biologie et modélisation de la cellule. LBMC - Ecole Normale Supérieure - Lyon, Université Claude Bernard Lyon - Centre National de la Recherche Scientifique : UMR5239 - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale : U1210 - Ecole Normale Supérieure de Lyon 46 allée d'Italie 69007 Lyon, France; 8- Haemopoietic Stem Cell Biology Laboratory, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

Objectives. Even if the use of a specific BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor (TKI) seems to improve Chronic Myeloid Leukemia (CML) patients care, the TKI are not curative given that several CML patients retain Leukemic Stem Cells (LSC) and leukemic progenitors in their Bone Marrow (BM).

The Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) that set the destiny and the proliferation of the Hematopoietic Stem Cells (HSC) as well as their interaction with their niche which is dysregulated at the beginning of the CML's development. These alterations maintain a permanent LSC and progenitors pool that express high levels of the receptor BMPRI1B and evolve throughout the treatment in order to progressively implement a BMP4 autocrine loop, finally leading to the persistence and the progression of the cells that resist to TKI treatment.

Recently, a major study revealed that a specific LSC sub-fraction survived in the CML sensitive patients from which resistant cells emerge. We investigated how the BMP signaling could be linked to these persistent LSC.

Methods. We use single cell RNA-Seq analysis of BCR-ABL+ persistent cells coming from CML patients. We developed a new model of CD34+CD38- LSC that displays similar characteristics to persistent primary LSC.

Results. Q-PCR analysis of bulk CD34+ from CCyR or resistant patients, or single cell RNA-Seq analysis of BCR-ABL+ persistent cells display a co-enrichment of BMP signalling, quiescence and HSC signatures, without modulation of major canonical target genes. We identify a direct correlation between BMPRI1B and Stat3 only in quiescent CML cells. We showed that in the CD34+ CD38- LSC's model the P-Smad 1/5/8+ and P-STAT3+ subsets increased when we use a combination of drugs, the AG490 (Jak2 inhibitor) and the E6201 (BMPRI1B inhibitor). This combination can efficiently inhibit the proliferation of the persistent CML cells and also increase their differentiation. Also, unexpectedly the AG490 showed the ability to increase the BMP4's production covered by the mesenchymal bone marrow cells, fostering the niche's protection toward LSCs. The addition of the E6201 prevents this phenomenon by inhibiting the BMP4's mediated LSCs protection against TKIs.

Conclusions. Our data suggest that AG490-E6201 drug combination is optimal to impair the maintenance of CML persistent LSC and prevent BMP4-supporting mesenchymal stem cells protection.

Abstract 076

Caractérisation du rôle des propriétés mécaniques de la niche hématopoïétique dans la mise en place des mécanismes de résistance dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes

Léa BARRAL - 1^{ère} année de thèse 2019

Inserm U1052 - CRCL - Lyon

Une cellule peut interagir avec son environnement par l'activation d'éléments intracellulaires, appelées voies de signalisation. Particulièrement, la cellule peut répondre aux signaux mécaniques, tels que l'adhésion ou la compression de cet environnement, c'est la biomécanique. Dans le cas des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), qui sont des cancers du sang, les cellules leucémiques se multiplient excessivement dans la moelle osseuse. Ce tissu ne pouvant pas se déformer, les cellules aussi bien sanguines que celles de l'environnement (le stroma), sont comprimées. Il existe aussi d'autres changements, dont la sécrétion anormalement élevée de petites molécules, appelées cytokines, de la famille des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Ces BMPs sont aussi des activateurs de biomécanique, signifiant que lorsque la cellule perçoit les BMPs, elle change de comportement. Mon équipe a montré que la présence de BMPs permettait d'induire la résistance aux traitements dans une autre leucémie (LMC). Dans la LAM, 80% des patients traités par chimiothérapies résistent et rechutent

5 ans après traitement. Cette résistance est en partie expliquée parce que les cellules résistantes restent plus longtemps dans la moelle, protégées par le stroma, alors que les cellules sensibles sont tuées par le traitement. Des résultats préliminaires montrent que ces cellules résistantes expriment le récepteur aux BMPs, appelé BMPRI1b, et ont une activité biomécanique plus importantes que les cellules sensibles. C'est pourquoi, on cherche à comprendre comment ces changements de BMPs dans la moelle et la compression des cellules influent sur la résistance des cellules leucémiques et leur relation avec le stroma. Pour cela, nous regarderons d'abord quelles voies de biomécanique sont activées par la compression dans les cellules leucémiques et le stroma, et comment celles-ci interagissent les unes avec les autres. Puis, nous regarderons l'effet de la chimiothérapie et si la compression favorise la résistance de ces cellules. Enfin, nous analyserons dans quelles conditions certaines cellules deviennent résistantes et pourquoi.

Abstract 077

Development of a Myogenin knock-in mouse line for live imaging

Maria BENAVENTE DIAZ – 4^e année de thèse 2019**Maria Benavente Diaz**^{1,2,3}, Francina Langa-Vives⁴ and Shahragim Tajbakhsh^{1,2}

1- Institut Pasteur, Stem Cells & Development, Department of Developmental & Stem Cell Biology ; 2- CNRS UMR 3738, Paris, France ; 3- Sorbonne Universités, Paris, France ; 4- Mouse Genetics Engineering Center, Institut Pasteur, Paris, France

Most muscle satellite (stem) cells, characterized by the expression of the paired homeodomain transcription factors Pax7 and Myf5, are quiescent during homeostasis in adults. Following injury, satellite cells enter the cell cycle and generate myoblasts that subsequently fuse to form new myofibres. Differentiation of progenitor cells depends on the successive expression of myogenic regulatory factors: MyoD (commitment), and Myogenin (differentiation).

Live imaging approaches in our lab allow us to observe muscle regeneration dynamics upon injury. This technology provides critical information on dynamic processes that are not captured by static approaches, and that involve fixation and staining. Using a transgenic mouse where Pax7 drives expression of nGFP, we can follow the fate of satellite cells, however, a model that allows us to identify cells that are differentiating is not available. Thus, we developed a knock-in mouse model by inserting a nuclear-localized Tomato fluorescent reporter in the 3'-UTR of the Myogenin locus using CRISPR-Cas9 technology in embryonic stem cells. Live imaging of satellite cells exposes differential dynamics of activation of this differentiation marker thereby exposing an underlying heterogeneity in the stem cell population during the myoblast to differentiation transition.

Abstract 078

Cartographie des mécanismes de résistance à la mort cellulaire dans les neuroblastomes : vers l'identification de nouveaux mécanismes tumorigéniques

JOSEPH BISACCIA – 1^{ère} année de thèse 2018
Inserm U1052 - CRCL - Lyon

Le neuroblastome est la tumeur solide extra-crâniale la plus fréquente chez l'enfant : environ 150 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Le neuroblastome dérive de la transformation oncogénique de cellules des crêtes neurales. La survie des enfants varie selon le stade de la maladie. Elle est inférieure à 50% chez les patients de haut grade présentant des métastases, malgré l'utilisation combinée de traitements de chirurgie, de chimiothérapie, de greffe ou radiothérapie. Il est donc urgent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces tumeurs pour développer de nouveaux traitements plus efficaces et moins toxiques.

D'après le modèle de Hanahan et Weinberg, les cellules tumorales acquièrent notamment la capacité de résister à la mort cellulaire. L'apoptose extrinsèque, induite par les récepteurs de mort, est ainsi bloquée dans une large fraction de patients atteints de neuroblastomes de haut grade, car l'un des acteurs majeurs de cette voie, appelé Caspase-8, est perdu par les cellules tumorales. L'objectif de mon projet de thèse est de compléter cette cartographie des voies de mort cellulaire notamment dans un contexte de chimiorésistance

et de définir si et comment cibler ces anomalies pour restaurer la mort cellulaire. Une analyse bibliographique a permis d'identifier le récepteur TLR3 comme une cible de choix grâce à son potentiel d'activation de l'apoptose et de la nécroptose en condition d'absence de la Caspase-8.

Au cours de ma première année de thèse, j'ai réalisé une analyse bioinformatique du profil d'expression des effecteurs de mort cellulaire à partir de 4 jeux de données transcriptomiques. J'ai pu identifier une corrélation positive entre les niveaux d'expression d'effecteurs de l'apoptose et de la nécroptose. A l'aide de modèles cellulaires, j'ai montré que TLR3 peut déclencher la mort de cellules tumorales de neuroblastome, probablement par une voie faisant intervenir les lysosomes. Nous cherchons à présent à évaluer l'efficacité de TLR3 in vivo et également à caractériser les mécanismes conduisant certaines lignées à résister à la voie de mort induite par ce récepteur.

Ces premiers résultats nous ont permis de soumettre une publication dans Scientific Report.

Abstract 079

Interférence des oncoprotéines de HPV avec l'interactome humain

Anna BONHOURE – 1^{ère} année de thèse 2016

Auteurs : Anna Bonhoure⁽¹⁾, Anne Forster⁽²⁾, Khaled Ould Babah⁽²⁾, Irina Paula Suarez⁽¹⁾, Alexandra Cousido-Siah⁽¹⁾, André Mitschler⁽¹⁾, Camille Kostmann⁽¹⁾, Auguste Demenge⁽¹⁾, Alberto Podjarny⁽¹⁾, Yves Nominé⁽¹⁾, Gilles Travé⁽¹⁾
(1) IGBMC Illkirch, France ; (2) IREBS Illkirch, France

Les papillomavirus humains (HPV) sont de petits virus à ADN infectant les épithéliums. Il en existe une grande diversité : ils se différencient par leur tropisme (muqueux/cutané) et les manifestations cliniques qu'ils provoquent. Certains HPV causent des proliférations bénignes (verrues, condylomes) tandis que d'autres provoquent différents cancers. En 2012, l'OMS a classifié 12 types de HPV comme agents cancérogènes pour l'Homme. Les HPV de types 16 et 18 sont notamment responsables de respectivement 60 et 10 % des cancers du col de l'utérus. Les HPV sont également impliqués dans les cancers ORL (oropharynx, de la cavité orale et larynx), cancers de la peau sans mélanome ainsi que les cancers de l'anus, du vagin et du pénis. Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont à l'origine de la cancérogenèse : elles favorisent la réplication virale en stimulant la prolifération cellulaire. En particulier, E6 de HPV se lie, modifie l'activité et provoque parfois la dégradation d'un ensemble de

protéines humaines en les capturant via des motifs peptidiques de consensus «LXXLL». Chaque protéine E6 produite par un type de HPV donne cible un certain ensemble de protéines hôtes, et ces préférences d'interactions déterminent la variabilité d'effets pathologiques provoqués par le virus.

En utilisant approche chromatographique de rétention développée au sein de l'équipe (HoldUp), nous avons quantifié l'affinité des protéines E6 pour un ensemble de peptides LXXLL provenant de cibles cellulaires putatives. Nous avons comparé les préférences d'interaction des protéines E6 de cinq types de HPV ayant divers tropismes et cancérogénicité. De plus, plusieurs structures à haute résolution de E6 en complexe avec des peptides LXXLL ont été résolues par l'équipe par cristallographie aux rayons X. Nos résultats obtenus avec une approche fragmentaire sont en accord avec les études protéomiques réalisées avec des protéines entières, ce qui souligne l'importance de l'affinité et des motifs linéaires dans les interactions protéine-protéine. Ces données permettent une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires par lesquels les protéines E6 peuvent causer le cancer. De plus, elles créent de nouvelles opportunités pour le développement d'inhibiteurs spécifiques des oncoprotéines E6.



Abstract 080

Biomarqueurs d'inflammation et risque de cancer du sein dans la cohorte européenne EPIC

Manon CAIRAT – 1^{ère} année de thèse 2017

Auteurs : **Manon Cairat**¹, Sabina Rinaldi¹, Romain Ouldamar¹, Anne-Sophie Navionis¹, Carine Biessy¹, Isabelle Romieu², Elisabeth Weiderpass³, Vivian Viallon¹, Marc Gunter¹, Laure Dossus¹, on behalf of EPIC

1- Section Nutrition et Métabolisme, Centre International de recherche sur le Cancer, Lyon, France

2- National Institute of Public Health, Centre for Population Health Research, Cuernavaca, Morelos, Mexico City

3- Centre International de recherche sur le Cancer, Lyon, France

Introduction. L'obésité est un facteur de risque avéré du cancer du sein après la ménopause mais est associée à une diminution de risque avant la ménopause. Les mécanismes biologiques à l'origine de ces relations ne sont pas pleinement compris. Le tissu adipeux est connu pour sécréter une variété de cytokines et d'hormones pro-inflammatoires, et l'inflammation est suspectée jouer un rôle dans l'association obésité-cancer du sein chez les femmes ménopausées. La majorité des études prospectives ayant évalué l'association entre marqueurs de l'inflammation et risque de cancer du sein ont mesuré uniquement la protéine C-réactive (CRP), marqueur systémique non spécifique d'inflammation.

Objectif. L'objectif de cette étude était d'examiner si des concentrations élevées de 11 cytokines et adipokines (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17D, IL-1RA, CRP, leptine et adiponectine) étaient associées au risque de cancer du sein, globalement, selon le statut ménopausique et par sous-types de cancer.

Matériels et méthodes. Cette étude est nichée dans la cohorte européenne EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). Au sein de cette cohorte, 1618 cas incidents de cancer du sein

et 1618 témoins ont été sélectionnés. Les niveaux pré-diagnostic de cytokines et d'adipokines ont été mesurés à l'aide d'immunososages ultra-sensibles disponibles dans le commerce. Des méthodes de régression logistique conditionnelle ont été utilisées pour estimer les odds ratio (OR) selon le niveau de chacun des biomarqueurs, avant et après ajustement sur l'indice de masse corporelle (IMC) et l'effet modificateur potentiel de l'IMC a été testé.

Résultats. Globalement, aucune association statistiquement significative n'a été observée entre les marqueurs d'inflammation étudiés et le risque de cancer du sein. Après stratification sur le statut ménopausique, des associations statistiquement significatives ont été observées entre les niveaux de CRP ($OR_{SD} = 1,11$ IC 95% 1,00-1,23), TNF- α ($OR_{SD} = 1,15$ IC 95% 1,04-1,30), leptine ($OR_{SD} = 1,15$ IC 95% 1,04-1,27) et le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées au recrutement (849 cas). Après ajustement sur l'IMC, seul le TNF- α restait à la limite de la significativité statistique ($OR_{SD} = 1,13$ IC 95% 1,00-1,28). Les résultats ne changeaient pas en fonction des sous-groupes de cancer du sein et de l'IMC. Par contre, la leptine était associée à une augmentation du risque de cancer du sein uniquement chez les femmes ménopausées n'utilisant pas d'hormones exogènes au prélèvement sanguin (non-utilisatrices d'hormones : $OR_{SD} = 1,19$ IC 95% 1,01-1,41 ; utilisatrices d'hormones : $OR_{SD} = 0,99$ IC 95% 0,81-1,21 ; Pinteraction= 0,03). Aucune association significative n'a été observée chez les femmes pré ou péri-ménopausées (748 cas), globalement et par sous-groupes.

Conclusions. Ces résultats indiquent que l'inflammation pourrait jouer un rôle dans la survenue du cancer du sein, plus spécifiquement chez les femmes ménopausées.

Abstract 081

Rôle de LOXL2, une enzyme d'échafaudage de la matrice extracellulaire, dans la plasticité phénotypique des mélanomes

Alexandrine CARMINATI – 1^{ère} année de thèse 2019

Auteurs : **Carminati A**, Lecacheur M, Deckert M, Tartare-Deckert S Inserm, U1065, Equipe Microenvironnement, Signalisation et Cancer, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d'Azur, Nice, France. Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016.

Contexte : Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif traité par les thérapies moléculaires ciblant l'oncogène BRAFV600E bien que les rechutes soient fréquentes. La progression tumorale implique la transition réversible entre un phénotype cellulaire prolifératif et un phénotype invasif dédifférencié. Les cellules qui expriment le facteur de différenciation mélanocytaire MITF (MITFhigh) sont alors prolifératives

alors que les cellules MITFlow sont peu prolifératives, particulièrement invasives et expriment des marqueurs de résistance comme AXL. La plasticité phénotypique peut être induite en réponse aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) et l'acquisition d'un phénotype invasif (MITFlow/AXLhigh) a été décrite comme un mécanisme d'échappement aux thérapies ciblées. Des travaux du laboratoire portant sur le rôle de la rigidité tumorale dans la résistance aux thérapies ciblées ont révélé une accumulation de LOXL2, une enzyme d'assemblage du collagène, dans la matrice extracellulaire (MEC) des tumeurs en réponse aux BRAFi. LOXL2 est un membre de la famille des Lysyl OXidase, impliqué dans le processus métastatique dans les cancers du sein mais dont le rôle dans

le mélanome n'est pas connu. Notre hypothèse est que la production de LOXL2 par les cellules de mélanome ainsi que sa présence au sein du microenvironnement tumoral pourrait influencer la plasticité vers un état mésenchymateux tolérant aux traitements.

Méthodes : L'impact de LOXL2 est évalué par des approches perte de fonction ARNi sur les propriétés prolifératives et invasives des cellules de mélanome (analyse de la prolifération, de marqueurs phénotypiques et expériences de chemotaxie). Les expériences sont réalisées sur un panel de différentes cellules de mélanome choisies en fonction de leur statut prolifératif MITF^{high} ou invasif MITF^{low}/AXL^{high} et sur des cellules de patients fraîchement isolées appelées « short-term ».

Résultats : Les résultats obtenus montrent que LOXL2 est exprimée préférentiellement par les cellules de mélanome invasives et résistantes aux thérapies MITF^{low}/AXL^{high} et révèlent un rôle potentiel de cette enzyme

dans le maintien du phénotype invasif. Enfin, l'analyse de la migration de certaines lignées cellulaires invasives, nous a donné des résultats préliminaires encourageants sur le rôle de LOXL2 sur les propriétés migratoires.

Discussion : Ces observations indiquent ainsi un lien original entre LOXL2 et la plasticité tumorale que nous devons approfondir notamment en réalisant différentes approches pertes et gains de fonction (surexpression et CRISPR). Nous évaluerons la contribution de LOXL2 dans l'adaptation et la résistance des cellules en réponse aux BRAFi grâce à son inhibition pharmacologique dans un modèle de xéno greffe *in vivo*. Ainsi, comprendre les processus moléculaires impliqués dans la plasticité des cellules de mélanome induite par le microenvironnement reste un enjeu fondamental dans les recherches sur ce cancer pour lutter contre les résistances.

Abstract 082

Rôle d'une déméthylase d'histone dans la régulation de la production de piRNAs par des séquences spécifiques

Karine CASIER – 4^e année de thèse 2019

CNRS UMR 7622 – Institut Biologie Paris Seine – Sorbonne Univ. – Paris

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN mobile présentes dans tous les génomes en proportion variable – chez l'Homme elles constituent près de la moitié du génome. Ces séquences mobiles représentent une source de variabilité génétique mais peuvent aussi être délétère pour l'intégrité du génome, en générant cassures chromosomiques ou mutations. Dans les cellules germinales, la transposition est régulée par la voie des PIWI-Interacting RNA (piRNAs). Les piRNAs sont produits à partir de séquences particulières, essentiellement hétérochromatiques, composées de fragments d'éléments transposables et appelées piRNA clusters.

Notre équipe de recherche s'intéresse entre autres à la biologie des piRNA clusters. Nous utilisons une construction transgénique, composée de répétitions en tandem, capable de mimer un piRNA cluster appelée *BX2*. *BX2* possède la particularité de pouvoir se trouver dans deux états épigénétiques différents : dans un état inactif (*BX2^{OFF}*) – le cluster ne produit pas de piRNA transgéniques – ou dans un état actif (*BX2^{ON}*) – le cluster produit des piRNA transgéniques. Il est possible de modifier son état épigénétique de *BX2*, c'est-à-dire de passer de *BX2^{ON}* à *BX2^{OFF}* ou de *BX2^{OFF}* à *BX2^{ON}*.

Nous pensons qu'il existe des gènes requis pour la maintenance du cluster *BX2* à l'état inactif. Nous avons conçu et entrepris un criblage génétique qui nous a permis de trouver un facteur d'épissage, *half pint* (*hfp*) dont la perte de fonction entraîne une activation du cluster *BX2^{OFF}*. Parmi les gènes cibles de *hfp* identifiés un seul gène reproduit l'activation de *BX2* : il s'agit d'une déméthylase d'histone,

appelée *JHDM2* et conservée chez l'Homme (gène *Kdm3*). *Hfp* régule l'épissage *JHDM2*. La surexpression de *JHDM2* en contexte mutant *hfp* empêche l'activation de *BX2*, confirmant ainsi que l'activation de *BX2* chez un mutant *hfp* s'effectue par l'intermédiaire de *JHDM2*. L'analyse de ce mutant par des expériences de séquençage de l'ARN révèle qu'une dizaine de régions génomiques, contenant des facteurs de transcription somatiques, sont transcrites de manière aberrante et produisent des piRNAs alors que ces régions sont transcriptionnellement inactives en contexte sauvage. Nous pensons que l'expression ectopique de ces facteurs dans le mutant *JHDM2* est associée à des modifications d'organisation des domaines chromatinien.

L'identification récente de piRNAs dans des cellules tumorales a permis d'ouvrir un nouveau champ de recherche et de compréhension à l'origine de certains phénomènes épigénétiques de tumorigénèse. Ces piRNA peuvent être considérés comme des marqueurs moléculaires de dysfonctionnement pouvant affecter l'expression de certains gènes. Par ailleurs, *JHDM2* a aussi été identifié dans le contrôle de la tumorigénèse. Notre hypothèse est qu'il existe des gènes – dont *JHDM2* fait partie – requis pour la détermination des frontières de l'hétérochromatine locale. Ainsi, la mutation de ces gènes pourrait conduire à une propagation anormale de l'hétérochromatine entraînant la production de piRNAs et l'inactivation des gènes adjacents. Ce projet vise à valider le rôle de ce gène dans la détermination des frontières hétérochromatiques et à préciser le lien entre piRNA, hétérochromatine et cancers.

Abstract 083

METAML – Étude systémique *in vivo* du dialogue métabolique entre le microenvironnement et les cellules résistantes à la cytarabine dans les Leucémies Aigües Myéloïdes

Guillaume COGNET – 1^{ère} année de thèse 2018

Guillaume COGNET, Thomas FARGE, Mathilde GOTANEGRE, Claudie BOSC, Maud HEUILLET, Noémie BUTIN, Hanna K. BARBIER, Estelle SALAND, Marie SABATIER, Emeline BOET, Floriant BELLVERT, Lucille STUANI, Jean-Charles PORTAIS, Jean-Emmanuel SARRY

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération excessive et incontrôlée de blastes leucémiques, bloqués à un stade précoce de leur différenciation. Malgré l'efficacité des chimiothérapies utilisées (comme la cytarabine ou AraC), de très nombreux cas de rechutes sont observés, initiées par des cellules leucémiques chimiorésistantes (CLRs). La résistance aux traitements est fortement soutenue par le microenvironnement des cellules leucémiques. En effet, il a été démontré que l'apport des acides aminés du microenvironnement dans les cellules leucémiques et leur intégration dans le métabolisme énergétique joue un rôle crucial dans le métabolisme des cellules leucémiques (Zhang et al., Mol. Cell 2014 ; Jones et al., Cancer Cell 2018 ; Kreitz et al., Cells 2019 ; Stuani et al., BMC Biology 2019). Il a aussi été démontré que les adipocytes de la moelle osseuse soutiennent un apport en acides gras accru (Ye et al., Cell Stem Cell 2016 ; Tabe et al., Scientific Reports 2018). Dans l'équipe, nous avons pu démontrer que les cellules résistantes à l'AraC sont caractérisées par un métabolisme mitochondrial exacerbé *in vivo*, notamment soutenu par les acides gras (Farge et al., Cancer Cell 2017), à l'aide de modèles murins (NSG) xénotransplantés avec des cellules primaires de patients (PDX) et des lignées cellulaires (CLDX). Ces modèles *in vivo* sont primordiaux dans l'étude des résistances aux traitements, puisqu'ils permettent de reconstituer le microenvironnement tumoral et son dialogue avec les cellules leucémiques. Il a ainsi été démontré *in vivo* que les CLRs développent des caractéristiques transitoires qui permettent la régression tumorale post-chimiothérapie (Boyd et al., Cancer Cell 2018). Ces caractéristiques, dépendantes de la signalisation du microenvironnement, ne peuvent donc pas être

reproduites *in vitro*. Ainsi, l'objectif de ma thèse est de caractériser *in vivo* le dialogue entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement, et d'identifier de nouvelles voies métaboliques impliquées dans la chimiorésistance. Pour cela, il est notamment nécessaire 1/ de caractériser les microenvironnements tumoraux des modèles murins utilisés et 2/ de développer de nouveaux outils intégrant les approches métabolomiques et fluxomiques dans les modèles murins *in vivo*. A ces fins, nous avons mis en place des méthodes de prélèvement de tissus, d'extractions et d'analyses métabolomiques adaptées. Les prélèvements d'organes pesés et figés dans l'azote liquide sont extraits dans un mélange acétonitrile/méthanol/eau afin d'isoler les métabolites des protéines, puis analysés à l'aide d'une méthode non-ciblée de chromatographie liquide (colonne HILIC) couplée à de la spectrométrie de masse (QTOF). Ces méthodes nous ont permis de réaliser dans un premier temps une étude sur le profil métabolomique de plusieurs tissus de souris NSG naïves (rate, moelle osseuse, sang, pancréas, poumon, foie, rein, tissu adipeux et muscle), dans le but de caractériser de manière exhaustive le modèle murin utilisé pour l'étude des CLRs et les microenvironnements dans lesquels évolueront les cellules leucémiques. Dans un second temps, nous avons xénotransplanté des lignées cellulaires de LAM (MOLM14 et U937) dans des souris NSG puis traité la moitié d'entre elles à l'AraC, afin d'étudier l'impact de l'AraC sur le métabolisme *in vivo* dans les différents organes décrits plus haut. Nous espérons ainsi identifier des différences dans des voies métaboliques entre les souris traitées ou non à l'AraC, qui pourraient être soutenues par les échanges de métabolites entre le microenvironnement et les cellules leucémiques et donc participer aux mécanismes de résistance de ces cellules. Enfin, nous développons actuellement des analyses de profilage isotopique *in vivo* qui nous permettront d'évaluer la contribution de ces métabolites du microenvironnement dans les voies métaboliques impliquées dans la chimiorésistance.

Abstract 084

Contrôle de l'activité lymphocytaire par les granules de stress. Nouvelles cibles pour l'immunothérapie ?

Nicolas CURDY – 1^{ère} année de thèse 2018

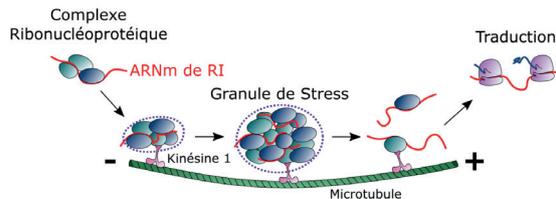
Inserm UMR 1037 - CRCT - Toulouse

Contexte et objectif. Ces dernières années l'essor de l'immunothérapie et plus particulièrement du blocage des checkpoints inhibiteurs immunitaires (BCI) a révolutionné le traitement du cancer. Cette approche vise à utiliser des anticorps dirigés contre les récepteurs inhibiteurs immunitaires (RI), tel que PD-1 ou CTLA-4, pour prévenir leurs interactions avec leurs ligands surexprimés par les cellules tumorales et maintenir la réponse immunitaire. Cependant, le BCI ne fonctionne globalement que

dans 25% des cas et nécessite d'être amélioré. À cet effet, l'investigation de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des RI, jusqu'alors peu connu, a permis de découvrir un nouveau mécanisme reposant sur les microtubules, les kinésines 1 et les granules de stress (GS) (Figure 1)^{2,3} qui contrôle l'ensemble de ces RI. L'objectif actuel est de caractériser ce nouveau mécanisme de régulation dans les lymphocytes T (LT) pour trouver un moyen de moduler l'expression d'un ensemble de RI.

Figure 1

Modèle du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des checkpoints/récepteurs inhibiteurs immunitaire (RI). Les ARNm de RI forment des complexes ribonucléoprotéiques qui vont être transportés le long des microtubules pour agréger et former des granules de stress empêchant leurs traductions. Un désassemblage de ces granules de stress permettrait la libération de ces ARNm de RI qui seraient alors traduits en protéine avant d'être adressées à la membrane plasmique.



Méthodes. La caractérisation des GS dans les LT constitue l'élément clé de ce projet et se déroule en 2 étapes : une analyse protéomique permettant l'identification des composants régulateurs constituant les GS de LT, et une analyse transcriptomique des ARN qu'ils contiennent pour en déterminer les fonctions régulées.

Résultats. Un protocole adapté de la littérature permet d'isoler des granules ribonucléoprotéiques à partir de lysat de LT. Par la suite, une immunoprécipitation de la protéine G3BP1 permet ensuite d'isoler spécifiquement les GS. Dans un premier temps, une analyse protéomique

et transcriptomique de GS de lignée cellulaire lymphocytaires tumorales Jurkat a été réalisée. L'analyse par spectrométrie de masse des constituants protéiques de GS de ces cellules a permis d'identifier près de 450 protéines constitutives. Celles-ci possèdent des fonctions attendues de « métabolisation des ARN » (liaison, épissage, traduction et autres), mais sont néanmoins majoritairement (~75%) différentes de celles identifiées dans d'autres contextes cellulaires et devraient permettre l'identification de cibles spécifiques de ce mécanisme dans ce contexte cellulaire. L'analyse des ARN totaux contenus dans les GS de Jurkat a permis d'identifier près de 3100 ARN (~10% des ARN total) codant pour des récepteurs membranaires et des protéines de transduction de signal.

Discussion. Ces premiers résultats ont permis de valider l'approche expérimentale et suggère un rôle régulateur important de l'activité lymphocytaire par ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Une analyse des GS de LT de donneurs sains devrait permettre une caractérisation plus physiologique de ce dernier en plus de permettre l'identification de cibles potentielles pour le perturber.

Références (non comprises dans le nombre de caractères)

1. Curdy, N., Lanvin, O., Laurent, C., Fournié, J.-J. & Franchini, D.-M. Regulatory Mechanisms of Inhibitory Immune Checkpoint Receptors Expression. *Trends Cell Biol.* **29**, 777-790 (2019).
2. Franchini, D.-M. et al. Microtubule-Driven Stress Granule Dynamics Regulate Inhibitory Immune Checkpoint Expression in T Cells. *Cell Rep.* **26**, 94-107.e7 (2019).
3. Franchini, D.-M., Lanvin, O., Curdy, N. & Fournié, J.-J. Contrôle de l'activité lymphocytaire par les granules de stress - Nouvelles cibles pour l'immunothérapie? *médecine/sciences* **35**, 507-509 (2019).

Abstract 085

Cycline A, un lien entre prolifération et polarité cellulaire, deux processus dérégulés dans les cellules cancéreuses

Pénélope DARNAT – 4^e année de thèse 2019
CNRS UMR 7622 - Institut Biologie Paris Seine - Paris

La prolifération cellulaire anarchique associée à une perte des polarités apico-basale et planaire, que régie la voie de la PCP, est une caractéristique des cancers des épithéliums, qui représentent plus de 80% des cancers. Comprendre comment ces processus interagissent reste un domaine d'investigation majeur et jusqu'à présent, les systèmes biologiques couramment utilisés n'ont pas réussi à identifier de liens entre ces mécanismes dans la cancérogenèse. Ce projet est basé sur l'identification d'un acteur du cycle cellulaire, la Cycline A comme un de ces liens, qui intégrerait prolifération cellulaire et polarité cellulaire planaire (PCP), deux processus qui suite à leurs dérégulations provoquent l'apparition de cellules cancéreuses et leurs disséminations par métastases dans les organismes.

Pour ce faire, notre modèle d'étude est la division asymétrique au sein des cellules du lignage des soies mécanosensorielles de *Drosophila melanogaster*. La division asymétrique repose sur une coordination précise dans le temps et l'espace entre les facteurs de cycle et ceux de la polarité pour permettre la polarisation de la cellule mère et celle de son fuseau pour ainsi permettre la répartition différentielle des déterminants

cellulaires entre les cellules filles leur conférant ainsi des identités différentes. Prolifération et polarité cellulaires servent ainsi la diversité cellulaire. La protéine majeure de la PCP, Frizzled, a été montrée pour contribuer à la maintenance de l'identité différentielle entre cellules filles et, au contrôle de l'orientation du fuseau mitotique. La perte de la division asymétrique chez la drosophile provoque la perte de l'identité cellulaire récapitulant la tumorigenèse chez les mammifères.

Dans ce contexte, j'ai montré (1) *in vivo* une localisation asymétrique d'une fraction de Cycline A, (2) qu'elle interagissait, grâce aux techniques de Proximity Ligation Assay et microscopie STED, à ce locus avec les facteurs de la PCP Frizzled et Dishevelled. (3) J'ai après pu mettre en exergue que cette localisation particulière dépendait de cette interaction et, (4) aussi son implication dans l'orientation des divisions de ces cellules comme les facteurs de la PCP. Ce projet a donc pour objectif d'analyser le lien, médié par la Cycline A, entre prolifération cellulaire et la polarité planaire ouvrant de nouvelles perspectives en cancérologie grâce à l'identification d'un facteur clé qui intègre des processus biologiques qui sont cancérogènes suite à leurs dérégulations.

Abstract 086

Development of innovative nanocomposite hydrogels for the treatment of Glioblastoma Multiforme

Amel DJOUDI – 1^{ère} année de thèse 2019

Amel Djoudi¹, Rodolfo Molina-Peña¹, Nela Buchtová¹, Clément Toulec², Nicolas Hauville¹, François Hindré¹, Carmen Alvarez-Lorenzo³, Christine Jérôme², Emmanuel Garcion¹, Frank Boury¹
1- CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France ; 2- Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), Université de Liège, Liège, Belgium ; 3- Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica at the University of Santiago de Compostela, Spain
Keywords GBM, nanocomposite hydrogel, protein encapsulation, polymeric nanoparticles, in vitro studies, physico-chemical characterizations.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and lethal subtype of brain cancer. According to the WHO, it belongs to the Grade IV brain cancers. It is highly invasive and can infiltrate cerebral tissue, and therefore the complete resection of the tumor is difficult. GBM tumor is removed by surgery but it relapses in 90% of cases, 6 to 7 months after treatment due to radiotherapy resistance. Indeed, patients affected with GBM only survive 6 months without treatment whereas with Temozolomide (TMZ) chemotherapy combined with radiotherapy it lengthens their overall survival to 6 additional months [1-6]. TMZ is an alkylating agent, which forms an active metabolite called MTIC in vivo. This latter affects DNA replication, by methylating guanines causing double-strand DNA breaks then cell apoptosis [3]. Another option is the FDA approved Gliadel® wafer that allows the sustainable release of the antineoplastic agent Carmustine® close to the resection cavity. Gliadel® associated to radiotherapy and TMZ increases the overall survival from 1 to 2 years for GBM patients, however this therapy has additional side effects [3]. To overcome these hurdles other systems have been investigated like β -Glucan scaffold imbedding chemoattractants. These systems are designed to concentrate and trap GBM cells into the scaffold in the resection cavity [4][6].

The current project is based on a new injectable nanocomposite hydrogel where a protein is encapsulated in polymeric nanoparticles (NPs). PLGA NPs are prepared via non-toxic and biocompatible solvents [5][8][12-14] and are incorporated into nanocomposite hydrogels to achieve a controlled release of an active compound. Such matrices have been developed in tissue engineering applications such as cartilage regeneration [11][12]. The therapeutic protein used is a bone morphogenic protein (BMP), which is involved in neurogenesis. Herein, a differentiating strategy is applied to lead cancer cells and more precisely cancer stem cells to acquire a less aggressive phenotype that may increase their radiotherapy sensitivity [7].

Since brain microenvironment is composed of a Hyaluronic acid (HA) enriched extracellular matrix (ECM), we expect to develop an injectable, biocompatible, bioadhesive and biodegradable HA scaffold. HA is thus a good candidate since it possesses all those functionalities [8-10].

Finally, the most challenging part of this innovative strategy is the encapsulation of the BMP protein and tuning its delivery in situ. The encapsulation yield and release from hydrogel will be studied in vitro to obtain a proof of concept regarding cytotoxicity and efficiency on U87MG cell line and on primary patient cells. During this work, optimization of the formulation process and physico-chemical characterizations such as

rheology, mechanical properties tests and other types will be performed. Bioperformance evaluation of our device on preclinical models is also expected.

References:

1. Stupp, R., M. Brada, M. J. van den Bent, J.- C. Tonn, et G. Pentheroudakis. « High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up ». *Annals of Oncology* 25, no suppl 3 (29 avril 2014): iii93-101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>.
2. Garnier, Delphine, Ophélie Renoult, Marie-Clotilde Alves-Guerra, François Paris, et Claire Pecqueur. « Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target ». *Frontiers in Oncology* 9 (6 mars 2019). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00118>.
3. Ashby, Lynn S., Kris A. Smith, et Baldassarre Stea. « Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review ». *World Journal of Surgical Oncology* 14, no 1 (24 août 2016). <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0975-5>.
4. Autier, Lila, Anne Clavreul, Maximiliano L. Cacicedo, Florence Franconi, Laurence Sindji, Audrey Rousseau, Rodolphe Perrot, Claudia N. Montero-Menei, Guillermo R. Castro, et Philippe Menei. « A New Glioblastoma Cell Trap for Implantation after Surgical Resection ». *Acta Biomaterialia* 84 (janvier 2019): 268-79. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>.
5. Haji Mansor, Muhammad, Mathie Najberg, Aurélien Contini, Carmen Alvarez-Lorenzo, Emmanuel Garcion, Christine Jérôme, et Frank Boury. « Development of a Non-Toxic and Non-Denaturing Formulation Process for Encapsulation of SDF-1 α into PLGA/PEG-PLGA Nanoparticles to Achieve Sustained Release ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 125 (avril 2018): 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.12.020>.
6. Najberg, Mathie, Muhammad Haji Mansor, Frank Boury, Carmen Alvarez-Lorenzo, et Emmanuel Garcion. « Reversing the Tumor Target: Establishment of a Tumor Trap ». *Frontiers in Pharmacology* 10 (12 août 2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00887>.
7. Piccirillo, S. G. M., B. A. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, G. Broggi, H. Brem, A. Olivi, F. Dimeco, et A. L. Vescovi. « Bone Morphogenetic Proteins Inhibit the Tumorigenic Potential of Human Brain Tumour-Initiating Cells ». *Nature* 444, no 7120 (décembre 2006): 761-65. <https://doi.org/10.1038/nature05349>.
8. Krishnaswamy, Venkat Raghavan, Amit Benbenishty, Pablo Blinder, et Irit Sagi. « Demystifying the Extracellular Matrix and Its Proteolytic Remodeling in the Brain: Structural and Functional Insights ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, no 16 (août 2019): 3229-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03182-6>.
9. Wang, Christine, Xinming Tong, et Fan Yang. « Bioengineered 3D Brain Tumor Model To Elucidate the Effects of Matrix Stiffness on Glioblastoma Cell Behavior Using PEG-Based Hydrogels ». *Molecular Pharmaceutics* 11, no 7 (7 juillet 2014): 2115-25. <https://doi.org/10.1021/mp5000828>.
10. Suo, Aili, Weijun Xu, Yaping Wang, Tiantian Sun, Lijie Ji, et Junmin Qian. « Dual-Degradable and Injectable Hyaluronic Acid Hydrogel Mimicking Extracellular Matrix for 3D Culture of Breast Cancer MCF-7 Cells ». *Carbohydrate Polymers* 211 (mai 2019): 336-48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.115>.
11. Buchtová, N., A. D'Orlando, P. Judeinstein, O. Chauvet, et J. Le Bideau. « Water Dynamics in Silanized Hydroxypropyl Methylcellulose Based Hydrogels Designed for Tissue Engineering ». *Carbohydrate Polymers* 202 (15 décembre 2018): 404-8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.143>.
12. Buchtová, Nela, Gildas Réthoré, Cécile Boyer, Jérôme Guicheux, Frédéric Rambaud, Karine Vallé, Philippe Belleville, et al. « Nanocomposite Hydrogels for

Cartilage Tissue Engineering: Mesoporous Silica Nanofibers Interlinked with Siloxane Derived Polysaccharide ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, no 8 (août 2013): 1875-84. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4951-0>.

13. Zhao, Mengnan, Fabienne Danhier, Chiara Bastiancich, Nicolas Joudiou, Lakshmi Pallavi Ganipineni, Nikolaos Tsakiris, Bernard Gallez, et al. « Post-Resection Treatment of Glioblastoma with an Injectable Nanomedicine-Loaded Photopolymerizable Hydrogel Induces Long-Term Survival ». *International Journal*

of Pharmaceutics 548, no 1 (septembre 2018): 522-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.033>.

14. Bastiancich, C., P. Danhier, V. Pr at, et F. Danhier. « Anticancer Drug-Loaded Hydrogels as Drug Delivery Systems for the Local Treatment of Glioblastoma ». *Journal of Controlled Release* 243 (décembre 2016): 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.034>.

Abstract 087

BRCAness comme biomarqueur circulant

Alexandre EECKHOUTTE – 1^{ère} année de thèse 2018
Inserm U830 - Institut Curie - Paris

Les sous-types les plus agressifs des cancers des seins et des ovaires - les cancers du sein triple-négatif (TBNC, négatif pour les récepteurs d'hormones et HER2) et les carcinomes séreux de haut-grade (HGSOC) - sont associés à la D ficiency en Recombinaison Homologue (HRD), un défaut de la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Les tumeurs dans ce contexte sont sensibles à des traitements notamment les inhibiteurs poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (Coleman et al., 2019). L'HRD émerge suite à l'inactivation des gènes *BRCA1/2*, *RAD51C* et *PALB2* et est caractérisé par une instabilité g nominique spécifique (Nik-Zainal, et al., 2016; Staaf, et al., 2019). Même si les gènes responsables de l'HRD sont connus, tester exhaustivement leur inactivation est difficile; il faut évaluer les mutations de ces gènes, notamment la perte d'hétérozygotie et les variants d'effets inconnus, ainsi que la méthylation de leur promoteurs (pour *BRCA1* et *RAD51C*). Cela motive le développement de marqueurs de substitution de l'HRD en utilisant des « cicatrices » g nominiques caractéristiques de son instabilité. Les développements récents basés sur le séquençage à haut débit ont atteint une excellente capacité à évaluer l'HRD (HRDetect, scarHRD, Signature3, SigMA), (Davies et al., 2017; Staff et al., 2019; Sztupinski et al., 2018; Polak et al., 2017; Gulhan et al., 2019). Cependant, ces méthodes sont techniquement complexes, demandent beaucoup de temps et un important stockage de données, nécessitent souvent un échantillon normal associé et peuvent être c teuses.

Nous avons introduit *shallowHRD*, un script pour tester la D ficiency en Recombinaison Homologue basé sur le nombre d'altérations g nominiques à grande échelle (LGA) obtenues à partir de séquençage pang nominique (WGS)   faible couverture (sWGS; ~ 1X). Il a été démontré que le sWGS détecte de manière robuste les altérations en nombre de copies (CNAs), même dans des échantillons de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) (Macintyre et al., 2018) et dans des biopsies liquides (Van Roy, et al., 2017). Cette méthode est à faible c t et produit des données faciles à stocker. Le concept de LGA suit les approches utilisés dans les puces de génotypages (SNParray), exploitant un nombre accru de CNAs intrachromosomiques à grande échelle, caractéristiques de l'HRD (Abkevich et al., 2012; Birkbak et al., 2012; Popova, et al., 2012). Le test HRD est indépendant de la plo idie sans référence à un nombre absolu de copies, surmontant dans une certaine mesure la variation en pureté tumorale. *shallowHRD* possède des performances similaires à la plupart des approches actuelles de pointes (87,5% de sensibilité et 90,5% de spécificité), via un séquençage d'ADN à faible c t et une adaptabilité à tous types d'échantillons.



Abstract 088

Rôle de la dissémination précoce dans le cancer colorectal

Zeinab HOMAYED – 1^{ère} année de thèse 2017

Zeinab Homayed,¹ Guillaume Belthier,¹ Emmanuelle Sidot,¹ Denis.Greuet,¹ Steeve Thirard,¹ Christophe Duperray,² François Gerbe,¹ Philippe Jay,¹ Julie Pannequin,¹

1- IGF, UMR5203 CNRS, UT191 INSERM et UM, Montpellier, France

2- Plateforme de cytométrie, IRBM, Montpellier Rio Imaging, Montpellier, France

Contexte et objectifs. Alors que la majorité des décès attribués au cancer est due aux métastases, les mécanismes impliqués dans le processus métastatique demeurent à ce jour peu compris. La littérature a essentiellement décrit la dissémination tumorale comme un processus tardif de la tumorigénèse en ignorant la dissémination précoce qui peut se produire avant même l'apparition de la tumeur primaire.

De récentes études utilisant des modèles de souris transgéniques notamment dans le cas du cancer du sein, du pancréas et du mélanome ont permis de démontrer l'existence d'une dissémination tumorale très précoce mais rien n'a encore été démontré dans le cas du cancer colorectal.

Afin de pallier à ce manque, l'objectif de ce projet est de déchiffrer les mécanismes de dissémination précoce dans un modèle murin transgénique et de les valider sur des échantillons de patients.

Méthodes. Notre modèle murin récapitule les étapes très précoces de la tumorigénèse intestinale et qui permet de suivre les cellules intestinales qui disséminent dans le sang mais également dans les organes distants comme le foie et les poumons.

Ce modèle permet sous le contrôle du promoteur de la villine, l'expression de l'enzyme CreERT2 spécifiquement dans l'épithélium intestinal. La CreERT2 va induire dans ce tissu l'expression de la GFP et simultanément l'inactivation d'APC qui est un gène suppresseur de tumeur responsable de l'initiation du cancer colorectal.

En résumé, sous l'action du tamoxifène, les cellules intestinales vont être vertes et la tumorigénèse intestinale sera initiée.

Le suivi et la caractérisation de la dissémination pourront être réalisés par imagerie *ex vivo* après transparaïsation, par cytométrie en flux et en cultivant les cellules disséminées.

Un deuxième modèle murin rapprochant plus de la pathologie humaine, où des produits chimiques (AOM/DSS) sont responsables de l'induction d'une tumorigénèse colique va être utilisé pour valider les premiers résultats.

Résultats. Les résultats préliminaires sur les deux modèles nous montrent qu'une dissémination précoce se produit depuis les adénomes intestinaux. Par cytométrie en flux nous avons pu détecter des cellules exprimant la GFP dans le sang mais également dans le foie ou dans les poumons qui sont les organes de prédilection de formation des métastases dans le CRC. Ces résultats ont été renforcés par l'observation de cellules GFP circulantes sur des animaux endormis (microscopie intravitale), l'observation de cellules GFP dans un poumon transparaïsé et par l'obtention de tumeurs dérivées à partir des foies et des poumons de souris porteuses de polypes. Enfin, nous avons observé un remodelage du microenvironnement cellulaire dans les organes où se trouvent des cellules disséminées.

Conclusion et perspectives. Les résultats préliminaires ont confirmé l'existence d'une dissémination précoce et que celle-ci modifie le microenvironnement des organes cibles. La compréhension de cette modification du microenvironnement sera la prochaine étape de ce projet. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique sur cellules uniques de ces cellules disséminées mais également des différents types cellulaires de l'organe cible nous permettra d'établir une signature transcriptomique permettant d'identifier des régulateurs clés de la dissémination précoce. Enfin, l'expression de certaines protéines phare de cette signature sera validée sur des prélèvements cliniques de patients (adénomes, cancers colorectaux à un stade très précoce de la maladie).

Abstract 089

L'activation du récepteur purinergique P2RX7 contrôle la croissance des tumeurs pulmonaires

Serena JANHO DIT HREICH – 1^{ère} année de thèse 2018

Serena Janho dit Hreich^{1,2,4}, Laetitia Douquet^{1,2}, Alina Ghinet^{5,6}, Paul Hofman^{1,2,3,4} et Valérie Vouret-Craviari^{1,2,4}

1. Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, 06108 Nice, France

2. Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

3. Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, Hôpital Pasteur, Nice, France

4. FHU OncAge, Nice, France

5. Hautes Etudes d'Ingenieur (HEI), Yncréa Hauts de France, UCLille, Laboratoire de chimie durable et santé, 13 rue de Toul F-59046 Lille, France

6. INSERM U995, LIRIC, Université de Lille, CHRU de Lille, Faculté de médecine – Pôle recherche, place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France

Contexte et objectifs : P2RX7 est un récepteur canal activé par de fortes concentrations d'ATP extracellulaire (ATPe) ; Ces concentrations sont présentes dans les tissus inflammatoires et le microenvironnement tumoral. L'activation de P2RX7 entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, une perméabilisation des cellules pouvant entraîner la mort et la formation de l'inflammasome NLRP3 conduisant à la production des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-

18. Notre laboratoire a montré que l'expression de P2RX7 contrôlait la croissance des tumeurs et a alors proposé que favoriser son activation contrôlerait la pousse tumorale.

Pour tester cette hypothèse, nous avons synthétisé un modulateur positif de P2RX7, nommé HEI3090, qui favorise l'activation de P2RX7 uniquement en présence d'ATP. Nous avons montré que HEI3090 freine la croissance des tumeurs pulmonaires de la lignée Lewis Lung Carcinoma (LLC) dans des souris immunocompétentes et active une réponse immunitaire anti-tumorale. De plus, nous avons montré que HEI3090 cible les cellules de l'hôte (compartiment stromal) exprimant P2RX7 et non les cellules tumorales.

Nos objectifs sont de déterminer (1) les cibles cellulaires et (2) moléculaires de HEI3090.

Méthodes : Pour caractériser les cibles cellulaires et moléculaires de HEI3090 nous utilisons des modèles de tumeurs murins syngéniques, des anticorps déplétants, des expériences de transfert adoptifs de souris WT vers des souris *p2rx7-/-* et des dosages cytotoniques par ELISA.

Résultats : Le transfert adoptif de splénocytes issus de souris WT exprimant P2RX7 vers les souris *p2rx7-/-* a permis un contrôle de la croissance tumorale contrairement aux souris du groupe contrôle.

Ceci montre que HEI3090 cible les cellules immunitaires pour avoir un effet anti-tumoral. Etant donné que l'activation de P2RX7 permet la production d'IL-1 β et d'IL-18 capables d'activer une réponse immunitaire, nous les avons dans un premier temps dosé *in vivo* et avons montré une augmentation de production d'IL-18 par HEI3090 mais pas d'IL-1 β . De plus, grâce aux expériences de neutralisations, nous avons montré que seul IL-18 est indispensable pour contrôler la croissance des tumeurs.

Discussion : Nous avons montré que l'axe ATP/P2RX7/IL-18 induit une réponse immunitaire anti-tumorale permettant de freiner la croissance des tumeurs pulmonaires. Les cellules dendritiques et les macrophages expriment P2RX7 et sont les principales cellules productrices d'IL-18. L'implication de ces cellules qui pourraient être la première cible de HEI3090 est en cours de validation grâce à des expériences de transfert adoptifs et de déplétions. Nous savons que l'activation de P2RX7 permet la production d'IL-1 β et d'IL-18 via l'inflammasome NLRP3. Or, nous avons aussi montré de façon surprenante que HEI3090 ne module pas la production d'IL-1 β mais uniquement celle de l'IL-18. Il semblerait ainsi que HEI3090 agisse sur la production d'IL-18 indépendamment d'IL-1 β ce qui suggère l'existence d'une voie ATP/P2RX7/IL-18 indépendante de NLRP3. Des expérimentations sont actuellement en cours afin de pouvoir caractériser au mieux le mode d'action de HEI3090.

Abstract 090

Regulation and limitations of the DNA replication checkpoint in the control of entry into mitosis

Vicente LEBREC – 4^e année de thèse 2019

Vicente LEBREC, Olivier GAVET
CNRS UMR9019 - Gustave Roussy

Replication stress is recognized as a major source of genomic instability and has notably been identified as an important driver early on in tumorigenesis. Exposure to endogenous or exogenous genotoxic sources that challenge DNA replication results in the activation of checkpoint mechanisms that transiently halt cell cycle progression and facilitate DNA repair. Consistently, those checkpoint mechanisms exhibit a sustained activity in pre-cancerous lesions and are thus believed to act as a major barrier to genomic instability and tumorigenesis. Checkpoint kinase 1 (Chk1) is a central player of the DNA damage response (DDR) during S and G2 phases and is activated by a broad variety of DNA alterations, notably replication stress.

Several important works revealed unexpectedly that checkpoint-proficient cells are not fully protected from premature mitotic entry upon replication stress, resulting into the execution of mitosis with under-replicated loci and/or persistent DNA alterations. Such situations might challenge the accurate segregation of chromosomes and the integrity of the genetic content transmitted to the cell progeny, potentially contributing to early steps of tumorigenesis.

We aim to elucidate how checkpoint proficient cells can achieve entry into mitosis despite unreplicated DNA lesions. To this end, we developed a FRET (Förster Resonance Energy Transfer) biosensor to specifically follow Chk1 activity in time-resolved live single cell assays. This approach allowed us to precisely describe unexpected cell-cycle dependent regulations of Chk1 activity both in unperturbed asynchronous cells and following a variety of DNA damages. More importantly, we could decipher the cell-to-cell heterogeneous behavior of non-cancerous populations exposed to replication stress. Indeed, we could describe a minimum of five classes of response to replication stress, each characterized by stereotypical patterns of Chk1 inactivation and/or re-activation in G2 phase, preceding or not mitosis firing. Among cells reaching NEBD, we could notably distinguish cells that entered mitosis in spite of a persistent Chk1 kinase activity. This phenotype provides the first direct evidence in mammals that mechanisms exist to force commitment to mitosis despite ongoing detection of DNA alterations, a process first identified in yeast as «checkpoint adaptation».

Our most recent data regarding the characterization of those cellular behaviors and subsequent consequences on genomic stability will be presented.

Abstract 091

Développement d'anticorps pH-dépendants avec un meilleur profil de sécurité pour l'immunothérapie du cancer

Tristan MANGEAT – 4^e année de thèse 2020

Tristan Mangeat¹, Pierre Martineau¹ and Bruno Robert¹
1- IRCM-INSERM U1194, University Montpellier, Montpellier, France

Contexte et objectifs : La survie globale des patients atteints de cancers même à un stade avancé a été améliorée avec les traitements à base d'anticorps monoclonaux. Plus récemment, des anticorps couplés à des drogues cytotoxiques ou ADCs (*Antibody Drug Conjugates*) ont permis de limiter la survenue de récurrences liées notamment à l'hétérogénéité tumorale. [1]. Cependant, plusieurs études pré-cliniques et cliniques ont montré que la fixation des ADCs, et donc la libération des drogues cytotoxiques au sein du tissu sain exprimant la cible, peut conduire à des toxicités importantes [2,3]. Afin d'éviter la liaison des ADCs à la cible exprimée par le tissu sain, nous souhaitons tirer profit de l'acidification spécifique du microenvironnement tumoral. Ce phénomène, appelé effet de *Warburg*, provient de la métabolisation préférentielle du glucose en acide lactique par les cellules tumorales. L'export du métabolite s'accompagne alors d'une acidification du milieu extracellulaire [4,5]. La stratégie consiste à développer des anticorps pH-dépendants, c'est-à-dire capable de se lier à leur cible à pH acide (pH 6-6,8) au niveau tumoral et ayant une très faible fixation ou, dans l'idéal, nulle sur la même cible présente sur le tissu sain à pH physiologique (pH 7,2-7,4).

Méthodes : Nous avons mis au point une nouvelle méthode de sélection et de criblage de fragments d'anticorps ou scFvs par *phage display* afin d'identifier des anticorps pH-dépendants dirigés contre un récepteur à activité tyrosine kinase, exprimé dans de nombreux cancers, mais aussi présent au niveau des cellules saines du système immunitaire. L'évaluation de la fixation pH-dépendante des anticorps sur la protéine recombinante a été réalisée par ELISA et SPR. Différentes lignées

cancéreuses et cellules saines immortalisées, exprimant la cible d'intérêt avec des niveaux d'expressions variables, ont servi à évaluer la liaison et l'internalisation des anticorps par cytométrie en flux et immunofluorescence.

Résultats : A l'issue de sélections en condition acide par *phage display* avec des banques de scFvs [6,7], 11 scFvs ont été sélectionnés pour leur fixation à pH acide et leur ratio de fixation pH acide/pH physiologique. La majorité des scFvs reformatés au format IgG1 humaine conservent une très bonne liaison pH-dépendante à la protéine recombinante. Les deux meilleurs anticorps présentent également une meilleure fixation à pH acide qu'à pH physiologique sur différentes lignées tumorales et une absence de fixation au récepteur exprimé par les cellules saines immortalisées à pH physiologique. Enfin, ces deux anticorps sont capables d'internaliser le récepteur.

Discussion : Il est donc maintenant envisagé d'évaluer la cytotoxicité de ces anticorps sur des lignées cancéreuses et de démontrer l'intérêt d'ADCs pH-dépendants. A l'aide d'une étude *in vivo* de biodistribution de ces anticorps, nous souhaitons également montrer leur spécificité de ciblage tumoral.

- [1] G. von Minckwitz et al., NEJM (2019)
- [2] P. A. Ott et al., J Clin. Oncol. (2014)
- [3] C. M. Annunziata et al., Invest New Drugs (2013)
- [4] O. Warburg, Sciences (1956)
- [5] A. Anemone et al., Cancer Metastasis Rev. (2019)
- [6] P. Philibert et al., BMC Biotechnol. (2007)
- [7] G. Robin et al., Journal of Molecular Biology (2014)

Abstract 092

Syndrome de Lynch (Prédisposition Héritaire aux Cancers MSI) : Étude des Conséquences Génomiques et Fonctionnelles de la Déficience MMR au Stade Pré-Tumoral (Crypte intestinale MMR-déficiente)

Hugo MONTÉMONT – 1^{ère} année de thèse 2019

Inserm U938 - CRSA Hôpital St-Antoine - Paris

Contexte. Les tumeurs dites microsatellites instables (MSI) représentent 15-20% des cancers colorectaux (CCR), gastriques ou de l'endomètre. Elles surviennent le plus souvent de manière sporadique mais elles peuvent être héréditaires, i.e. les tumeurs associées au Syndrome de Lynch. Les patients Lynch sont prédisposés à un cancer de type MSI dès l'âge adulte, le plus souvent avant 50 ans, car ils sont porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation inactivatrice sur l'un des gènes du système

de réparation de l'ADN, le mismatch repair (MMR). La déficience du MMR dans les cellules n'est pas en soi un événement transformant, mais elle est l'élément déclencheur d'un processus général d'instabilité génétique affectant surtout les séquences répétées (appelées microsatellites) du génome. Les mutations des microsatellites sont susceptibles d'être oncogéniques lorsqu'elles affectent des séquences ayant un rôle fonctionnel.

Morphologiquement, la perte du 2e allèle est objectivée par l'émergence de cryptes MMR-déficientes dans la muqueuse colique saine des patients Lynch ; l'équipe d'accueil a récemment montré que ces cryptes se concentrent au pourtour des tumeurs MSI, laissant supposer que c'est la dégénérescence des cryptes MMR-déficientes qui initie le cancer.

Méthode et Résultats attendus. Dans ce cadre, nous cherchons à décrire les profils génomiques et d'expressions par Exome-seq et RNA-seq des cryptes MMR-déficientes par une approche de microdissection laser de ces entités morphologiques dans l'intestin des patients Lynch et dans un modèle murin associé à l'étude du Syndrome de Lynch : Lgr5-CreERT2;Msh2flox/-. Le matériel de départ est conservé en FFPE ; après déparaffinage, les échantillons sont traités par immunohistochimie (IHC ; anticorps contre les protéines MMR MSH2 et MLH1) pour différencier les cryptes MMR-déficientes lors de la microdissection par laser et permettre une extraction parallèle ADN et ARN. Par cette approche Omique, nous espérons dresser un inventaire des événements mutationnels précoces et susceptibles de représenter des événements initiateurs de l'oncogenèse MSI. Une analyse post-génomique et fonctionnelle sera aussi initiée, dont l'orientation sera à programmer en fonction des résultats obtenus. Une attention particulière sera

portée à des mutations somatiques et/ou des anomalies d'expressions associées, susceptible d'expliquer la survenue d'un passage favorisée à la déficience MMR dans l'intestin des patients Lynch au niveau de ces lésions pré-néoplasiques, ou qui pourraient permettre d'expliquer un avantage sélectif conféré aux cellules préparant la cellule MMR-déficiente à une transformation maligne.

Discussion. Cette étude nous permettra d'identifier des événements précoces potentiellement contributifs à l'initiation du processus tumorigénique MSI dans le côlon. Un tel axe de recherche est donc particulièrement pertinent lorsqu'on sait que les CCR MSI sont la forme héréditaire la plus fréquente des CCR. En dehors du côlon, les résultats obtenus seront susceptibles de concerner d'autres localisations tumorales associées au syndrome de Lynch qui partagent les mêmes mécanismes oncogéniques liés à leur instabilité microsatellitaire. Sur le plan clinique, les mécanismes contribuant à favoriser la déficience MMR dans le tissu colique des patients Lynch peuvent être considérés comme des facteurs de risque pour l'émergence de tumeurs MSI et constituer des cibles thérapeutiques d'intérêt dans le contexte d'une médecine de précision en pleine émergence.

Abstract 093

Caractérisation des réseaux moléculaires et voies biologiques associés à la réponse et à la résistance acquise aux thérapies de différenciation dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutation IDH : intégration de données moléculaires à haut débit longitudinales issues de deux essais cliniques.

Nicolas POULAIN – 1^{ère} année de thèse 2019

Nicolas Poulain^{1,2}

1- Inserm U1170, Villejuif, France

2- Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

Des mutations somatiques touchant les gènes isocitrate dehydrogenases (IDH)-1 et -2 surviennent fréquemment dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ainsi que dans certaines tumeurs solides (gliomes, glioblastomes, chondrosarcomes, cholangiocarcinomes). Ces mutations engendrent une modification de l'activité des enzymes IDH et l'accumulation d'un «onco-métabolite» qui affecte de façon importante le programme d'expression génique de la cellule. Dans le cas des LAM, les mutations IDH sont considérées comme «fondatrices» de la maladie, et les modifications d'expression génique qu'elles engendrent bouleversent l'homéostasie du compartiment des cellules myéloïdes au sein du système hématopoïétique, et participent à la transformation

de ces cellules à l'origine de la maladie. Il existe aujourd'hui des médicaments de thérapie ciblée, dirigés contre les enzymes mutantes IDH1 et IDH2 qui bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des LAM associées aux mutations IDH. Les résultats des premiers essais cliniques utilisant ces médicaments ont été rapportés en 2018 et 2019. L'objectif de l'étude est de comprendre comment des LAM présentant une mutation IDH réagissent à ces nouveaux médicaments, et comment ces LAM échappent éventuellement à ces traitements. Ce projet utilisera des données génomiques (séquençage à haut débit) obtenues de cellules de patients inclus dans ces essais cliniques. Nous chercherons à i) comprendre les modifications d'expression génique engendrées par ces mutations et responsables de la transformation cellulaire ii) établir les mécanismes de résistance acquise à ces thérapies ciblées. Ces travaux permettront d'évaluer l'efficacité de ces nouvelles thérapies, dont les applications débordent très largement le seul cadre des LAM.

Abstract 094

EMT-transcription factor ZEB1 down-regulates the POL θ -mediated end-joining pathway

Melanie PRODHOMME – 4^e année de thèse 2019

Authors: **Melanie PRODHOMME**^(1,2), Roxane POMMIER⁽³⁾, Camille FRANCHET⁽⁴⁾, Frédérique FAUVET^(1,2), Valérie BERGOGLIO⁽⁵⁾, Pierre BROUSSET⁽⁴⁾, Anne-Pierre MOREL^(1,2), Anne-Cécile BRUNAC⁽⁴⁾, Mojgan DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN^(1,2), Caroline MOYRET-LALLE^(1,2), Jean-Sébastien HOFFMANN⁽⁴⁾, Alain PUISIEUX^{(1,2,6)*}, Agnès TISSIER^{(1,2)*}

(1) Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Équipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France.

(2) LabEx DEVweCAN, Université de Lyon, Lyon, France.

(3) Gilles Thomas Bioinformatics Platform, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, 69008, France.

(4) Laboratoire de pathologie, Laboratoire d'excellence Toulouse Cancer, Institut Universitaire du Cancer-Toulouse, Oncopole, 1 avenue Irène-Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex, France

(5) CRCT, INSERM UMR 1037 Toulouse, France.

(6) Curie Institute

* Co-last authors

Genomic instability is commonly accepted as a hallmark of cancer, even though some tumors develop in absence of a marked chromosomal instability (CIN). A prominent contributor to CIN during tumorigenesis is the mutagenic repair of double-strand breaks (DSB) eventually resulting from an oncogenic activation. Mammalian cells rely on two major pathways for DSB repair: canonical non-homologous end-joining (c-NHEJ) and homologous recombination (HR). Additionally, a third highly mutagenic end-joining pathway, mediated by the DNA polymerase theta (POL theta) encoded by the POLQ gene, has been characterized.

This mechanism required the alignment of microhomology sequences for the initiation of the repair is thus termed theta-mediated End joining (TMEJ). Recurrent cancer genome studies have revealed significant microhomology at chromosomal breakpoints involving TMEJ in chromosomal rearrangements during tumorigenesis. Today, the central question of TMEJ regulation remains a missing link to understand TMEJ implication in tumor progression.

To address this question, we tested whether the gene expression of the TMEJ actors differs in primary breast tumors depending on CIN. In silico and then in vitro experiments led us to the observation that the expression of the POLQ gene was down-regulated, as well as the POL theta protein level in low instability primary tumors and cancer cell lines compare to high instability ones. The zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), an epithelial to mesenchymal transition (EMT) regulator, was characterized in our team by a specific high expression in low CIN tumors and has been shown to confer a chemotherapeutic resistance to breast cancer. We demonstrated that POLQ and ZEB1 expression were mutually exclusive in primary tumors. Furthermore, we established that the POLQ gene was a transcriptional target of ZEB1. This ZEB1 modulation of POLQ expression resulted in a reduction of TMEJ activity, suggesting a previously unrecognized role of ZEB1 as a repressor of TMEJ. Finally, a depletion of ZEB1 allowed the sensitization of ZEB1-expressing cells to chemotherapeutic treatments.

In conclusion, our findings identified ZEB1 as a pivotal factor required for orchestrating DSB repair pathway choice and as a consequence may represents a predictive therapeutic indicator.

Abstract 095

Argonaute catalytic activity is required for maternal mRNA clearance in embryos

Piergiuseppe QUARATO – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Germano CECERE

Laboratoire de Germano CECERE, Institut Pasteur, PARIS

Argonaute proteins and their interacting small RNAs play a key role in regulating complementary mRNA targets during animal development. Here, we investigate a novel and essential function of the catalytically active Argonaute protein CSR-1 in maternal mRNA degradation during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. We show that CSR-1 interacts with endogenous small RNAs antisense to hundreds of cleared maternal mRNAs in embryos, and preferentially cleaves mRNAs no longer engaged in translation. The depletion of CSR-1 during maternal to zygotic

transition leads to embryonic lethality in a catalytic-dependent manner and impairs the degradations of its embryonic mRNA targets. Given the conservation of Argonaute catalytic activity, we propose that a similar mechanism operate to clear maternal mRNAs during maternal to zygotic transition across species.

Abstract 096

Contrôle traductionnel de la fonction endothéliale lymphatique par des ribosomes spécialisés

Emilie ROUSSEL – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Anne-Catherine PRATS

UMR 1048-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UPS, Toulouse

Le système lymphatique joue un rôle primordial dans l'homéostasie tissulaire. Dans certaines pathologies telles que le lymphoedème ou le cancer la fonction lymphatique va être dérégulée. En réponse à l'hypoxie tumorale, la formation de vaisseaux lymphatiques (lymphangiogenèse) est induite, ces derniers constituent une voie privilégiée pour la dissémination des métastases. Les facteurs de croissance lymphangiogéniques tel que le VEGFC et le VEGFD sont fortement régulé au niveau de la traduction de leur ARNm. Lors du stress, la traduction globale est bloquée, alors que la traduction des ARNm des facteurs lymphangiogéniques est activée par un mécanisme d'entrée interne des ribosomes qui implique des éléments structuraux de leurs ARNm, les IRES (Internal Ribosome Entry Sites).

Depuis quelques années, le rôle du ribosome dans le contrôle traductionnel est mis en avant, et il apparaît que celui-ci a révélé sa capacité à traduire des familles d'ARNm distinctes en fonction de sa composition. Ces découvertes ont amené au concept « d'hétérogénéité ribosomique » : certaines protéines ribosomiques permettent la traduction de sous-populations d'ARNm. Ces régulations proviennent variation de composition du ribosome ou de modifications des protéines et des ARN ribosomiques. Ainsi il a été montré qu'une variation de méthylation des ARNr dans les cellules cancéreuses active la traduction des ARNm à IRES.

L'implication de ribosomes « spécialisés » dans la régulation de l'expression des facteurs lymphangiogéniques lors du stress lié à l'hypoxie tumorale, ou dans le développement du lymphoedème, reste à élucider. L'objectif de mon projet est d'explorer le rôle de modifications ribosomiques dans le contrôle de la traduction IRES-dépendante, dans les cellules endothéliales lymphatiques soumises à l'hypoxie et au stress du réticulum endoplasmique. L'impact du stress sur la composition du ribosome et les modifications des protéines et ARN ribosomiques sera étudié, ainsi que le rôle de ces modifications sur le contrôle de la traduction IRES-dépendante et sur la fonction endothéliale lymphatique.

Mon projet se focalisera sur les IRES des facteurs lymphangiogéniques et sur leur régulation dans les cellules endothéliales lymphatiques (CEL). La cinétique de régulation de ces IRES par le stress sera analysée. Ces conditions une fois déterminées, les protéines et ARN ribosomiques seront alors purifiés à partir de polysomes; les protéines seront analysées par spectrométrie de masse et les méthylations des ARNr par RiboMethSeq. Cela permettra d'identifier différents candidats qui seront étudiés quant à leur capacité de réguler la traduction IRES-dépendante. Le rôle de ces candidats dans le contrôle de la fonction endothéliale lymphatique sera évalué dans des modèles murin de tumeurs et de lymphoedème. Ce projet vient d'être initié, les premiers résultats seront présentés.



Abstract 097

Interaction entre la voie FANCD2 et la senataxin dans la réplication, la transcription et la réponse aux dommages de l'ADN

Maha SAID – 1^{ère} année de thèse 2017

Directeur de thèse : Valeria NAIM

CNRS UMR 8200, Gustave Roussy, VILLEJUIF

Genomic instability is an enabling characteristic of cancer and a common feature of neurodegenerative diseases and aging. Extensive studies over the last years have led not only to the identification of the causes of genomic instability, but also to the understanding of the underlying mechanisms. In the scientific community, there is general consensus that DNA replication stress (RS), (i.e. conditions favoring replication fork stalling leading to incomplete DNA replication) that arise following the cell's exposure to various exogenous and endogenous stressors, is a key driver of genomic instability. Interestingly, the genome organization and dynamics per se can also favor RS under some circumstances. Examples of genomic regions where timely completion of replication is particularly challenging are common fragile sites (CFSs), genomic loci that often harbour tumour suppressor genes or oncogenes and tend to form breaks, gaps, or de-condensations on mitotic chromosomes under replication stress conditions. In addition, studies have uncovered a plethora of proteins that guard the genome from RS, which if mutated can induce genome instability. In more recent years, scientists have discovered that a key source of RS, and subsequently genomic instability, is represented by transcription. Further studies have shown that transcription and replication, if not spatially and temporally coordinated may have detrimental effects on the cells. Fanconi Anemia (FA) is a rare inherited bone marrow failure disease characterized by congenital abnormalities and cancer predisposition, caused by mutations in any of the 22 so far identified FANCD2 genes. FA is manifested as abnormalities at the cytological, physical and molecular levels. At the cellular level FA is characterized by chromosome fragility and hypersensitivity to DNA interstrand- crosslinking (ICL) agents. Besides ICL repair, the canonical role of the FA pathway, the FA proteins play roles in resolving DNA damage arising during replication and transcription, and in coordinating both processes. FA cells exhibit a high rate of chromosomal aberrations (i.e., breaks, gaps, and radial figures), arising from a compromised DSB repair. Interestingly, studies showed that the aberration breakpoints occurring in FA cells frequently overlap CFS. Other studies showed that at these specific loci, FANCD2 (a key component in the FA pathway) accumulates together with other repair factors namely BLM and the structure specific endonucleases SLX4, XPF-ERCC1 and MUS81-EME1 to process replication intermediates that, if persistent, can lead to chromosome segregation defects. In addition, it has been reported that FANCD2 is recruited to CFS and limits the formation of R-loops (DNA: RNA hybrids with a looped out single stranded DNA). However, the fine mechanisms underlying the aforementioned roles of FANCD2 have not been completely unraveled. R-loops are a two-edged sword; they tend to occur naturally over specific loci where they play key regulatory roles. However, R-loops also pose a threat to the genome when they occur in an unscheduled manner. For this reason, the prevalence of R-loops must always be monitored by specific resolving factors. One known R-loop resolving factor is Senataxin (SETX), a RNA:DNA helicase mutated in Axonal neuropathy type 2 (AOA2) and Amyotrophic Lateral Sclerosis type 4 (ALS4) patients. SETX is implicated in several genome maintenance pathways analogous to those regulated by FANCD2 proteins. The most prominent functions shared by SETX and

FANCD2 proteins include the coordination of replication with transcription and the repair of ICLs. In addition, SETX functions in concert with BRCA1 to resolve R-loops at transcription termination sites allowing for faithful transcription termination, and forms nuclear foci in response to replication stress, both critical for the maintenance of the genome. SETX foci occur predominantly in cells in the G2/M phases, similar to what was observed for FANCD2 foci at CFS. SETX also plays a role during meiosis, and SETX knockout mice are infertile (a phenotype shared with FA mice) as a result of impaired meiotic sex chromosome inactivation and meiotic recombination. Taking into account the common cellular processes that the FANCD2 pathway and SETX participate in, I asked whether there is a functional relationship between them in the maintenance of the genome stability. To answer this question, I first analyzed the relative subcellular localization and found that FANCD2 and SETX are localized in close proximity in a subset of cells in both untreated and Aphidicolin (Aph, an inhibitor of replicative DNA polymerases)-treated conditions (replicative stress conditions). I next aimed to determine if SETX depletion affected FANCD2 expression, mono-ubiquitylation (a readout of FA pathway activation) or recruitment. I found that SETX downregulation does not affect FANCD2 protein level nor mono-ubiquitylation compared to control cells in untreated and Aph-treated conditions. Furthermore, I detected no significant effects of SETX depletion on FANCD2 foci formation in interphase nuclei as compared to control cells in untreated and Aph-treated conditions. As I found no obvious effect of SETX depletion on FANCD2 function, I planned to characterize the phenotype of SETX-depleted cells in more detail at the level of chromosome integrity. By scoring chromosomal aberrations in control and SETX-depleted cells, I revealed an increase in chromosome fragility in SETX-depleted cells compared to control, even in the absence of replication stress. As a complementary approach, I examined the impact of FANCD2 on SETX localization. Following FANCD2 depletion by siRNA, I observed an increase in the percentage of SETX positive nuclei following Aph treatment in control cells. In addition, the percentage of SETX positive cells and the number of SETX foci per nucleus was increased in FANCD2-depleted cells, and this was further heightened following Aph treatment. Furthermore, I observed that SETX foci accumulate in the nucleoli, some of them localizing to distinct nuclear foci. To determine whether there is an epistatic relationship between FANCD2 and SETX, I tested the viability and proliferative capacity of FANCD2, SETX, or FANCD2 and SETX-depleted cells. Surprisingly, I detected a highly significant decrease in colony formation in double depleted cells compared to control and single depleted counterparts. However, following FANCD2 and SETX co-depletion, the frequency of chromosome breaks was similar to that seen in control cells, and significantly decreased as compared to the SETX knockdown condition, suggesting that FANCD2 is involved in induction of breaks elicited by SETX depletion. My future plans are to determine the mechanism underlying breakage induction in absence of SETX and how this affects chromosome behavior and cell fitness. These findings may potentially lead to uncover synthetic lethal interactions to be exploited in cancer therapy.

Abstract 098

Caractérisation des «usines de traduction» de la β -caténine et implication dans le cancer

Soha SALLOUM – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Edouard BERTRAND

CNRS UMR 5535, INSTITUT DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE, MONTPELLIER

La voie Wnt/ β -caténine joue des rôles importants dans l'embryogenèse et chez l'adulte. En effet, un tiers des tumeurs colorectales est causé par une altération de cette voie. La β -caténine est régulée de manière très stricte au niveau de sa stabilité, en particulier grâce au suppresseur de tumeur APC. La β -caténine localisée aux jonctions adhérentes est stable alors que celle présente dans le cytoplasme est dégradée rapidement par le protéasome. Cependant, cette protéine est stabilisée en présence d'un signal Wnt, et elle peut alors être transportée dans le noyau où elle active la transcription. Les facteurs impliqués dans la dégradation de la β -caténine sont l'Axin, APC et les kinases CK1a et GSK3b, qui tous ensemble forment le "complexe de destruction". En absence de Wnt, ce complexe lie la β -caténine et le dirige vers la dégradation. En présence de Wnt, ce complexe se lie au récepteur Wnt à la membrane plasmique et il n'interagit plus avec la β -caténine, qui est ainsi stabilisée.

Nous avons découvert un nouveau mécanisme de régulation dans lequel la β -caténine est traduite dans des foyers spécialisés, que nous avons appelés « usines de traduction ». Ces foyers permettent une dégradation co-translationnelle de la β -caténine, et ils jouent ainsi un rôle important dans le contrôle du niveau de son expression.

Le but de ce projet qu'on vient de débiter est d'étudier en détail les usines de traduction de la β -caténine et d'aborder leurs rôles éventuels lors de la tumorigenèse. Pour cela, des approches protéomiques seront utilisées pour caractériser la composition biochimique de ces usines ainsi que celles des polysomes traduisant la β -caténine. Ensuite, le rôle des facteurs identifiés sera déterminé grâce à des siRNA ou des lignées KO, en analysant: (i) l'expression de la β -caténine, par Western-blot; (ii) la formation des usines, par des approches d'imagerie de molécules uniques d'ARN (smFISH); et (iii) la traduction de la β -caténine, par des approches de ribosome profiling ou d'imagerie de la traduction. Enfin, l'implication des usines de traduction dans la tumorigenèse sera abordé en déterminant leur présence ou absence dans des séries de tumeurs colorectales.

Ce projet apportera une connaissance détaillée des foyers de traduction de la β -caténine et il précisera le rôle de ces foyers dans des cellules normales ou cancéreuses. En particulier, nos expériences pourraient déterminer une nouvelle fonction pour le suppresseur de tumeur APC, qui serait d'organiser ces foyers de traduction et ainsi de contrôler la synthèse et le devenir de la protéine β -caténine naissante.



Abstract 099

Rôle de Perlécane, protéine de la membrane basale, dans le signalisation inter-organe liée aux BMPs

Prune SMOLEN – 1^{ère} année de thèse 2018

Institut Biologie Valrose - CNRS UMR 7277- Inserm U1091 - Univ. de Nice, Nice

Au cours du développement animal, les transitions développementales nécessitent que la croissance et la maturation de tous les organes soient coordonnées. Dans de nombreux organismes, ces transitions sont déclenchées par un axe neuroendocrinien, comme l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les mammifères. La façon dont cet axe neuroendocrinien perçoit le statut développemental des organes n'est pas encore connu.

Il a été récemment démontré chez la drosophile que l'orthologue de BMP2/4, Dpp, agit comme un signal inter-organe dans ce processus. Chez cet organisme, la transition développementale est caractérisée par la production d'une hormone stéroïdienne, l'ecdysone, au niveau d'une glande neuroendocrinienne, la « ring gland ». Ce pic d'ecdysone permet le passage de l'état larvaire à l'état pupal, on parle de métamorphose. Tout au long de la période larvaire, Dpp, produit par différents tissus, est sécrété dans l'hémolymphe (équivalent du sang). La réception de Dpp au niveau de la « ring gland » inhibe la production d'ecdysone, prévenant ainsi d'une métamorphose précoce. Néanmoins, lorsque tous les tissus périphériques atteignent leur maturité, Dpp cesse d'être sécrété dans l'hémolymphe permettant ainsi la synthèse d'ecdysone et donc la métamorphose (Setiawan et al, Life Si Alliance 2018). Notre hypothèse de travail vient d'une étude montrant que la membrane basale (MB) des tissus périphériques entrave la sécrétion du Dpp de ces tissus vers

l'hémolymphe (Ma et al, Dev. Cell. 2017). Parmi les composés de la MB, on retrouve Perlécane (Pcan), protéoglycane à chaînes de sulfate d'heparane capable de lier de nombreux facteurs de croissance tels que Hedgehog, WNT et BMP. Nos données indiquent que la perte de Pcan dans certains tissus périphériques de drosophile induit une hyper activation de la signalisation Dpp dans ces tissus. De plus, nous avons démontré que la signalisation Dpp induit une néotranscription de *pca*n à la fin de l'état larvaire, mettant en évidence l'existence d'une boucle de régulation *in vivo* entre Pcan et Dpp.

Nous proposons que l'augmentation de la production de Dpp au niveau des tissus périphériques durant la phase larvaire permet d'activer l'expression de *pca*n juste avant la métamorphose. En retour, Pcan induirait une rétention de Dpp, autorisant ainsi le déclenchement de la métamorphose.

Nous avons commencé à tester cette hypothèse et découvert que des animaux déplétés en Pcan présentent un retard important dans la survenue de la métamorphose. Nous montrons que ce retard est spécifique à la transition développementale larve-pupe et peut être corrigé en fournissant de l'ecdysone aux animaux mutants. Ce projet permettra d'approfondir nos connaissances sur les régulations inter-organes *in vivo* et sur le rôle de la MB dans ce processus.

Abstract 100

Ciblage des fonctions non-canoniques de la télomérase dans les cancers

Nicolas SOUBEIRAN – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Marina SHKRELI

Inserm U1081 - CNRS UMR 7284, IRCAN, NICE

La télomérase est une ribonucléoprotéine capable d'assurer le maintien de la longueur et de la stabilité des télomères à l'extrémité des chromosomes. Elle se compose de deux sous-unités : TERT, une sous-unité protéique responsable de l'activité reverse transcriptase, et TERC, un ARN qui sert de matrice pour la synthèse des séquences télomériques. En conditions normales, la télomérase est très peu exprimée dans les cellules différenciées. Cependant, elle est réactivée dans 90% des cancers humains. Le maintien de la longueur des télomères dans les cellules cancéreuses permet de stabiliser leur génome au cours des divisions et leur confère ainsi une capacité de prolifération illimitée.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la sous-unité protéique TERT de la télomérase possède d'autres activités indépendantes du maintien de la taille des télomères qui favorisent les cancers épithéliaux.

Plusieurs études suggèrent que cette activité, dite non-canonique, est accomplie via la capacité de TERT à moduler des voies de signalisations critiques pour la prolifération et la différenciation cellulaire. L'équipe a montré que l'épithélium rénal est particulièrement sensible à l'activité non-canonique de la télomérase. En effet, la surexpression d'un variant de TERT qui comporte une mutation abrogeant la capacité de la protéine à rallonger les télomères dans l'organisme adulte induit la reprogrammation des cellules épithéliales rénales en cellules dédifférenciées et prolifératives montrant les caractéristiques de cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent que l'activation des voies de signalisation ciblées par la télomérase dans l'épithélium rénal peut conduire à la progression de pathologies associées à un défaut de différenciation, et à la prolifération anormale de ces cellules.

L'objectif de mon projet de thèse est d'identifier les voies de signalisation dérégulées par TERT lors de la reprogrammation de l'épithélium rénal in vivo et de définir si elles sont nécessaires à l'activité de TERT. Nous avons ainsi réalisé une approche de séquençage à haut débit (RNAseq) au cours du processus de reprogrammation de ces cellules. De manière inattendue, ce travail a montré que TERT cible l'interaction et le remodelage de la matrice extra-cellulaire avant même d'induire la différenciation et la prolifération de l'épithélium rénal. Mes résultats montrent que ce ciblage moléculaire précoce de TERT se traduit par une modification des propriétés de la matrice extracellulaire in situ. De plus, l'analyse de tumeurs rénales primaires révèle que les gènes ciblés par TERT, impliqués dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire, sont également dérégulés dans ce contexte. Par ailleurs, nos résultats préliminaires montrent que le vieillissement de l'épithélium rénal, associé à une détérioration de la matrice extra-cellulaire, réprime la capacité de TERT à reprogrammer l'épithélium rénal in vivo. Ainsi, mes résultats

nous amènent à émettre l'hypothèse que la qualité de la matrice extra-cellulaire représente un facteur crucial pour le déploiement des fonctions non-canoniques de TERT in vivo.

Afin de tester cette hypothèse, j'utilise un système de culture primaire original qui va me permettre de déterminer si les propriétés mécaniques de la matrice modulent l'activité de TERT sur l'épithélium rénal. Je vais également déterminer si la détérioration de la matrice extra-cellulaire associée au vieillissement réprime les fonctions pro-tumorigéniques de TERT in vivo dans un modèle de cancer induit chimiquement. Enfin, je vais utiliser mes cultures primaires issues de tumeurs rénales afin de déterminer si l'activation des gènes ciblant le remodelage de la matrice extra-cellulaire est nécessaire pour la prolifération tumorale. Ce travail apportera un regard original, et inattendu sur la capacité de la matrice extra-cellulaire à réguler des processus biologiques fondamentaux associés à la surexpression d'oncogènes tels que TERT.

Abstract 101

Mechanistic study of ZEB1 and ZEB2 antagonistic roles in melanoma

Yaqi TANG – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Julie CAMEL

Inserm U1052, Centre Léon Bérard, LYON

ZEB1 and ZEB2 are epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) inducing transcription factors whose aberrant activation promotes tumor initiation and metastasis in carcinoma. In neural-crest derived melanoma, our lab previously showed that ZEB2 is already expressed in normal melanocytes, where it regulates their differentiation. ZEB2 expression is decreased during melanoma progression, consistent with a tumor suppressive role, while ZEB1 is reactivated, acting as an oncogene. Antagonistic functions of ZEB1 and ZEB2 in the melanocytic lineage at least partly depend on the opposite regulation of MITF, the master regulator of phenotype switching in melanoma. My project aims at further deciphering the mechanisms of action of ZEB1 and ZEB2 in regulating melanoma cancer cell plasticity and resistance to

treatment. We first demonstrated that $TNF\alpha$ and $TGF\beta$ treatment induces a progressive phenotype switching from a differentiated/proliferative $MITF^{high}/ZEB2^{high}$ state to an invasive/stem-like $ZEB1^{high}/MITF^{low}$ state. Fluorescent reporters for MITF and the neural-crest stem cell marker p75 are used to follow intra-tumor heterogeneity overtime. Expression of markers of intermediate phenotypes, such as SOX10 and SOX9, is also analyzed. Moreover, Chromatin-IP experiments demonstrate that ZEB2, MITF and p75 are ZEB1 direct target genes, either up or down-regulated. Further Chip-Seq analyses will give a more comprehensive view of ZEB1 and ZEB2 targets during phenotype switching in melanoma, allowing to propose potential new therapeutic strategies.

Abstract 102

Immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie des tumeurs cérébrales pédiatriques

Pauline THOMAS – 1^{ère} année de thèse 2019

Directeur de thèse : Stéphane BIRKLE

U1232 Centre de Recherche en Cancérologie-Immunologie Nantes-Angers, NANTES

Contexte et objectif : Les tumeurs cérébrales sont les tumeurs solides les plus fréquentes de l'enfant et la principale cause de décès par cancer. Celles-ci incluent les gliomes de haut grade, les épendymomes et les tumeurs embryonnaires telles que les médulloblastomes et les tumeurs térétoïdes rhabdoïdes atypiques. Certaines d'entre elles infiltrant le tissu cérébral et sont donc inopérables. Le seul recours reste la radiothérapie, mais sans bons résultats. De nombreux essais thérapeutiques associant d'autres traitements comme la chimiothérapie n'ont pas permis d'amélioration substantielle. De plus, ces protocoles de radiothérapie sont copiés sur ceux utilisés chez les adultes et ont des effets délétères sur le développement cérébral. Il n'existe actuellement aucun traitement conçu spécifiquement pour les populations pédiatriques. Afin de palier à ce manque et d'améliorer le pronostic et la qualité de vie de ces patients, il est nécessaire de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous développons une approche combinant la radiothérapie et une immunothérapie T-CAR. Cette dernière consiste à prélever puis à réinjecter des lymphocytes autologues après les avoir modifiées par thérapie génique afin d'induire l'expression un récepteur chimérique à l'antigène (CAR). Le CAR permet aux lymphocytes T de reconnaître l'antigène sans qu'il soit présenté par les molécules du CMH et de détruire les cellules cancéreuses. Dans ce contexte, un antigène cible exprimé spécifiquement par les cellules cancéreuses cérébrale a été identifié dans nos laboratoires ; le ganglioside GD2 O-acétylé (GD2OAc). Ces types d'immunothérapie ont montré leur efficacité dans

le traitement des leucémies réfractaires à la chimiothérapie, mais elle doit être optimisée dans le cadre des tumeurs solides afin de prendre en compte le microenvironnement vasculaire et immunitaire de ces tumeurs et l'impact de la radiothérapie avant la mise en place d'essais cliniques. Le projet vise à établir la preuve de concept de l'efficacité de la radiothérapie associée aux lymphocytes T-CAR anti-GD2OAc.

Méthodes : Nous allons montrer l'efficacité de la combinaison de ces deux thérapeutiques sur des modèles d'organoïdes développés à partir de cellules de patients, ainsi que sur des modèles orthotopiques de xénogreffe de tumeurs cérébrales de l'enfant. La texture immunitaire (acteurs cellulaires et moléculaires) du microenvironnement tumoral sera évaluée par cytométrie en flux multicouleur. Les lymphocytes T-CAR seront préparés au laboratoire et les irradiations seront réalisées à l'aide d'un irradiateur guidé par l'image pour le petit animal. L'efficacité anti-tumorale sera mesurée après l'administration de ces thérapies.

Résultats attendus : Les premiers résultats que nous acquerrons permettront d'optimiser les conditions d'irradiations à utiliser afin d'obtenir un effet immunomodulateur favorable à l'efficacité des lymphocytes T-CAR. Les résultats suivants fourniront la preuve de concept de l'efficacité de l'immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie.

Abstract 103

Intérêt de l'inhibiteur d'HDAC belinostat, en monothérapie ou associé à des inhibiteurs de Bcl-xL ou de Mcl-1, pour le traitement des cancers de l'ovaire

Cécilia THOMINE – Ligue contre le Cancer (Comité de Seine-Maritime)

Directeur de thèse : Marie VILLEDIEU

UNICAEN, Inserm U1086 ANTICIPE, Centre de Lutte Contre le Cancer F. Baclesse, CAEN

Contexte et objectif : L'identification de stratégies thérapeutiques innovantes représente un enjeu majeur pour améliorer la prise en charge des cancers de l'ovaire, première cause de décès par cancer gynécologique. Notre Unité a montré que l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes pouvait être induite en inhibant les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 et/ou en favorisant l'expression de leurs partenaires pro-apoptotiques Bim et Puma. Notre objectif était de déterminer si l'utilisation du belinostat, un inhibiteur d'HDAC actuellement en clinique, pouvait permettre de moduler l'expression génique de ces différentes cibles et constituer ainsi une stratégie thérapeutique efficace dans les cancers de l'ovaire.

Méthodes : L'efficacité des traitements a tout d'abord été évaluée *in vitro* dans les lignées cancéreuses ovariennes chimiorésistantes SKOV3 et IGROV1-R10, par différentes techniques de mise en évidence de l'apoptose. Les résultats obtenus ont ensuite été validés par une étude *ex vivo* menée sur des organoïdes tumoraux établis au laboratoire à partir de tumeurs de patientes. La réponse aux traitements a été étudiée par analyse de la morphologie et de la viabilité des organoïdes, ainsi que par évaluation de l'activité caspase induite.

Résultats : Dans nos lignées cancéreuses ovariennes, le belinostat exerce un effet cytostatique et, à plus forte concentration, un effet cytotoxique lié à l'induction de l'apoptose. Par ailleurs, il augmente

fortement l'expression protéique de Bim et de Puma, et inhibe partiellement celle de Bcl-x_L, ces modulations étant observables dès la concentration sub toxique. A cette concentration, l'association du belinostat avec des molécules BH3-mimétiques inhibant Bcl-x_L (ABT-737) ou Mcl-1 (AMG 176) induit efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes. L'étude menée dans des organoïdes tumoraux, modèles plus représentatifs des tumeurs de patientes, confirme l'efficacité du belinostat en monothérapie ou combiné à l'ABT 737 ou à l'AMG 176.

Conclusion : L'ensemble de ces résultats suggère donc l'intérêt de stratégies incluant le belinostat dans les cancers de l'ovaire.

Ce projet a été soutenu financièrement par la Ligue contre le Cancer (Comité de Seine-Maritime). Cécilia THOMINE est allocataire d'une bourse de thèse co-financée par la Région Normandie et par le Comité de Seine-Maritime de la Ligue contre le cancer.

Abstract 104

Déficiences de la protéine phosphatase Wip1 au sein du système hématopoïétique : effets sur la tumorigénèse

Burban UYANIK – 4^e année de thèse 2019

Directeur de thèse : Oleg DEMIDOV

INSERM UMR 1231, Lipides Nutrition Cancer, Dijon

Le cancer avec son incidence en augmentation constante est un problème majeur de santé publique. Aujourd'hui, l'un des principaux problèmes rencontrés lors du traitement des cancers est lié à l'échappement des cellules cancéreuses aux mécanismes de défense immunitaire, et à leur résistance à la thérapie. Il est important de rappeler que le système immunitaire joue un rôle protecteur contre la tumorigénèse en éliminant les cellules précancéreuses ou cancéreuses. Cette élimination se fait sans toxicité pour les tissus normaux et la mémoire immunitaire à long terme permet de lutter contre les récurrences du cancer. C'est dans ce contexte que l'étude de la protéine phosphatase Wip1 pourrait apporter de nouvelles solutions thérapeutiques.

En effet, il a récemment été montré que des mutations activatrices de Wip1 étaient retrouvées dans les cellules immunitaires des patients atteints de cancers ne répondant pas ou peu aux traitements. Ces mutations associées à un mauvais pronostic, suggèrent que l'activation de Wip1 au sein des cellules immunitaires pourrait négativement affecter l'immunité anti-tumorale.

Nous avons donc formulé l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de l'activité de Wip1 dans les cellules immunitaires pourrait avoir un effet bénéfique en supprimant la croissance tumorale.

Les résultats obtenus au sein des différents modèles d'études murins que nous avons développés nous ont permis de mieux comprendre le rôle joué par la protéine Wip1 au sein des cellules immunitaires et son importance dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Nous avons ainsi déterminé que la surexpression de Wip1 dans les cellules hématopoïétiques et plus particulièrement au sein des cellules immunitaires myéloïdes promeut *in vivo* la croissance tumorale, au contraire de sa déplétion qui favorise l'immunité anti-tumorale.

A terme, nous espérons proposer de nouvelles stratégies immunothérapeutiques anti-cancéreuses basées sur la modulation de l'activité de la protéine Wip1 dans les cellules immunitaires à l'aide d'un inhibiteur chimique actuellement en phase d'essai clinique.



Abstract 105

The role of ZNRF3 and TP53 inactivation in adrenocortical tumorigenesis

James WILMOUTH – 1^{ère} année de thèse 2018

Directeur de thèse : Pierre VAL

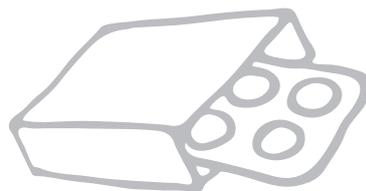
Génétique Reproduction et Développement, UMR 6293, CLERMONT-FERRAND

Context and Objectives. Adrenocortical carcinoma (ACC) is an infrequent and aggressive cancer that originates from steroidogenic cells within the adrenal cortex. Half of patients present with metastatic spread at initial diagnosis, resulting in a low 5-year survival rate. Recent genomic analysis identified the most common alteration in ACC as inactivation of the transmembrane E3 ubiquitin-ligase Zinc and Ring Finger 3 (Znrf3), a potent tumor suppressor responsible for regulating the WNT/beta-catenin pathway. In order to study the role of Znrf3 inactivation in the adrenal cortex, we generated a steroidogenic factor-1 (Sf-1) Cre mediated Znrf3 knockout mouse model. The resulting mice developed hyperplasia associated with moderate increase in WNT/beta-catenin signaling by 6 weeks; however, this was followed by regression characterized by the induction of senescence and immune recruitment. In an attempt to surpass this senescent phenotype, we developed a mouse model derived from the most aggressive subgroup of ACC, composed of p53 & Znrf3 inactivation. TP53 is involved in p21-induced senescence, therefore we hypothesize that p53 ablation in the context of Znrf3 inactivation will surpass the senescent phenotype and allow tumorigenesis to proceed. **Methods.** Adrenocortical-specific ablation of p53 and/or Znrf3 was accomplished by utilizing Aldosterone synthase (AS) Cre and the Rosa 26 mTmG reporter system. Aldosterone synthase (CYP11B2) is an enzyme required for aldosterone production and expressed solely in zona glomerulosa cells, which compose the outermost zone of the adrenal cortex. By crossing AS-Cre mice with p53 and/or Znrf3 floxed mice, four genotypes were created for this project: Controls (CTR), TP53 knockouts (p53KO), Znrf3 knockouts (Znrf3 KO), and double knockouts (DKO). Through the Rosa 26mTmG reporter system, recombination of

KO cells was visualized via GFP expression at the cell membrane. Mice were harvested at 1 year of age and adrenals, lungs, liver, and possible metastases were collected and processed into formalin-fixed paraffin embedded sections for immunohistochemistry. Adrenals and blood plasma samples were frozen at -80°C for qPCR and steroid hormone analysis, respectively.

Results. Mice with individual inactivation of p53 or Znrf3 did not show tumor formation while the combined inactivation of p53 & Znrf3 resulted in carcinoma formation and a 46.7% rate of metastasis. Tumorigenesis was analyzed via adrenal weight, Ki67 index, expression of differentiation markers, steroid hormone production, and rate of metastasis. Not all DKO mice progressed to full on carcinomas, suggesting further secondary alterations are required for tumorigenesis to proceed. Surprisingly, these adrenal tumors were accompanied by immune invasion and a robust upregulation of p16, the tumor suppressor involved in Rb-mediated senescence.

Discussion. We have demonstrated that adrenocortical specific inactivation of p53 and Znrf3 results in aggressive carcinomas and metastasis in mice. However, the strong presence of immune cells throughout the tumor microenvironment suggests that p53 does not fully inhibit the senescent phenotype initiated by Znrf3 inactivation. Our current aim is to use this mouse model to further investigate the role of senescence and immunity in adrenocortical tumorigenesis, while also characterizing circulating tumor cells via the mTmG reporter system.



Ma thèse en trois minutes

Abstract 106

Impact fonctionnel des mutations *TCF12* dans les cellules d'origine des gliomes et dans la gliomagenèse

Sofia ARCHONTIDI – 1^{ère} année de thèse 2017

S. Archontidi^{1,2}, C. Marie¹, C. Gimmonet¹, C. Parras¹, M. Sanson^{1,3}, E. Huillard¹

1. Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Sorbonne Université, Inserm, CNRS, UMR S 1127), Paris, France ; 2. Faculté de Médecine - Université Paris Sud XI, Kremlin-Bicêtre, France ; 3. AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurologie 2-Mazarin, Paris, France

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives malignes les plus fréquentes chez l'adulte. L'origine et la croissance tumorale de ces tumeurs sont attribuées aux cellules avec des caractéristiques de progéniteurs neuraux ou de précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs). De nombreuses altérations génétiques ont été découvertes dans les gliomes; cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur développement sont moins caractérisés. Outre les altérations fréquemment trouvées, des études récentes ont identifié des mutations inactivatrices du gène *TCF12* dans des gliomes, associées à des tumeurs plus agressives. *TCF12*, codant pour un facteur de transcription de la famille bHLH, est exprimé de manière aberrante dans plusieurs cancers et peut jouer des rôles d'oncogène ou de gène suppresseur de tumeurs.

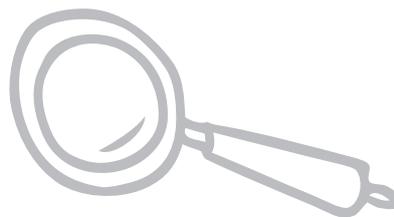
Le but de ce projet est de déterminer les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de *TCF12* sur les cellules d'origine potentielles des gliomes, ainsi que sur la croissance tumorale. Nous avons étudié

l'expression de la protéine *TCF12* dans le lignage oligodendrocytaire dans le cerveau de souris à des âges différents et nous avons observé une expression élevée corrélée avec une différenciation oligodendrocytaire. Pour caractériser les conséquences de l'inactivation de *TCF12*, nous avons développé un modèle murin permettant d'inactiver *TCF12* dans les OPCs de façon temporelle (*PDGFRaCreERT; Tcf12fl; RosaYFP*). Dans ce modèle, nous avons observé un défaut de prolifération des OPCs lorsque *TCF12* est inactivé dans le cerveau postnatal et adulte. Afin d'identifier les voies moléculaires et gènes cibles de *TCF12* dans les progéniteurs neuraux et les OPCs, nous avons initié la caractérisation des sites de liaison de *TCF12* sur le génome (ChIPseq) et des études transcriptomiques (RNAseq). Enfin, afin d'évaluer le rôle de *TCF12* dans la gliomagenèse, nous procédons à l'inactivation de *TCF12* dans deux modèles murins de gliomes.

L'ensemble de ces travaux permettra de comprendre l'implication de *TCF12* dans le développement glial et la gliomagenèse.

Références

Labreche, K. et al. *TCF12* is mutated in anaplastic oligodendroglioma. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms8207



Abstract 107

Modèle d'étude de la dissémination précoce du cancer colorectal

Guillaume BELTHIER – 4^e année de thèse 2019

Guillaume Belthier,¹ Emmanuelle Sidot,¹ Zeinab Homayed,¹ Denis Greuet,¹ Steeve Thirard,¹ François Gerbe,¹ Philippe Jay,¹ Julie Pannequin,¹
1. IGF, UMR5203 CNRS, U1191 INSERM et UM, Montpellier, France

Introduction & objectifs. Dans la grande majorité des cas, la mortalité des cancers est due à la formation de métastases selon un processus encore trop peu décrit. En effet, la littérature dans ce domaine est largement focalisée sur la phase tardive de la tumorigénèse, ignorant la dissémination précoce, notamment dans le cas du cancer colorectal.

La dissémination précoce fût récemment décrite grâce à l'utilisation de modèles murins et grâce à l'accès à des échantillons de patients notamment dans le cas du cancer du sein, du pancréas et du mélanome. Ces études démontrent que très tôt, des cellules rejoignent la circulation sanguine avant même le développement de la tumeur primaire.

Dans le but de déchiffrer les mécanismes de la dissémination précoce du cancer colorectal et surtout de comprendre son rôle dans l'évolution de la maladie, nous avons généré un modèle de souris transgéniques récapitulant les premiers stades de la maladie et permettant de suivre et d'isoler les cellules intestinales qui disséminent.

Matériels et Méthodes. Notre modèle permet l'expression d'une protéine fluorescente verte et la formation d'adénomes spécifiquement dans l'épithélium intestinal et colique. Dans ces deux épithéliums, l'enzyme va

permettre l'expression de la GFP et l'inactivation du gène suppresseur de tumeur APC, connue pour être à l'initiation de la maladie. Ainsi, la tumorigénèse sera initiée sur ces mêmes zones vertes fluorescentes, rendant la tumeur verte également. Nous pourrions rechercher la présence de cellules vertes qui auraient disséminées dans d'autres organes grâce aux technologies de transparençation & microscopie ainsi que par cytométrie en flux.

Résultats. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'une dissémination précoce se produit depuis les polypes intestinaux. Par cytométrie en flux nous avons pu détecter des cellules intestinales dans le sang mais également dans le foie ou les poumons. Nous avons également pu visualiser des cellules d'origine intestinale dans un poumon « transparençé ». Enfin, nous avons observé un remodelage du microenvironnement cellulaire dans les organes où se trouvent des cellules disséminées précoces.

Conclusion. Les résultats préliminaires ont confirmé l'existence d'une dissémination précoce et d'un remodelage des organes cibles. Dorénavant, nous souhaitons identifier des signatures transcriptomiques propres à ces cellules disséminées et comprendre pourquoi le foie et les poumons sont modifiés alors que ces souris ne développent jamais de métastases.

<https://www.youtube.com/watch?v=R2UFRzgyCic>

Abstract 108

Utilisation d'antiagrégants plaquettaires et risque de cancer du sein dans une cohorte prospective de femmes ménopausées

Manon CAIRAT – 1^{ère} année de thèse 2017

Auteurs : Manon Cairat¹, Marie Al Rhamoun², Marc Gunter¹, Gianluca Severi², Laure Dossus¹, Agnès Fournier^{1,2}

1- Section Nutrition et Métabolisme, Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon, France.

2- Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations (CESP), équipe «Exposome, Hérité, Cancer et Santé», Inserm UMR1018, Facultés de Médecine, Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Villejuif, France

Introduction. Consommée à faible dose, quotidiennement et sur une longue période, l'aspirine s'est montrée efficace contre l'apparition des cancers gastro-intestinaux. En inactivant les plaquettes, les antiagrégants plaquettaires, incluant l'aspirine faible dose et le clopidogrel, empêchent la libération de facteurs de croissance et

médiateurs inflammatoires et par conséquent sont susceptibles de jouer un rôle préventif dans l'apparition d'autres cancers dont le cancer du sein.

Objectif. L'objectif de cette étude était d'évaluer les associations entre utilisation d'aspirine faible dose ou de clopidogrel et risque de cancer du sein dans l'Etude Epidémiologique auprès de femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale (cohorte E3N).

Matériels et méthodes. La cohorte E3N inclut 98 995 femmes volontaires françaises, adhérentes à la Mutuelle Générale de l'Education Nationale (MGEN) et suivies depuis 1990. Des informations relatives au mode de vie, aux facteurs reproductifs et aux antécédents médicaux ont été recueillies tous les deux à trois ans par auto-questionnaires. Les cas

de cancers identifiés ont été validés par obtention des comptes rendus anatomopathologiques. Depuis 2004, les données de remboursement de médicaments issues de la MGEN sont aussi disponibles. Pour chaque médicament considéré, les femmes ayant au moins deux remboursements dans une période de trois mois ont été définies comme exposées. L'exposition était dépendante du temps, et, afin de prendre en compte le caractère dynamique de l'exposition, des modèles de Cox multivariés ont été utilisés pour estimer les Hazard Ratios (HRs) de cancer du sein (globalement et par sous-types) associés à l'exposition aux antiagrégants plaquettaires.

Résultats. Durant un suivi moyen de 9 ans, 2887 cas de cancer du sein ont été identifiés chez les 62,390 femmes ménopausées suivies (âge moyen au début du suivi: 63 ans). Durant le suivi, 17% ont été exposées à l'aspirine faible dose et 3% au clopidogrel. L'exposition à l'aspirine

faible dose n'était pas associée au risque de cancer du sein [HR = 1,03 (0,91 - 1,17) pour les exposées comparées aux non exposées], sauf pour les femmes ayant une durée d'utilisation cumulée de plus de quatre ans [HR = 0,68 (0,47 - 0,98)]. L'utilisation de clopidogrel était associée à une augmentation du risque de cancer du sein [HR = 1,31 (1,01 - 1,69)], indépendamment de la durée d'utilisation. Cette augmentation de risque n'était statistiquement significative que pour les cancers du sein n'exprimant pas les récepteurs hormonaux à l'œstrogène (ER-)[HR_{ER+} = 1,12 (0,81- 1,56), HR_{ER-} = 3,17 (1,69 - 5,92), P hétérogénéité=0,02].

Conclusions. Dans cette cohorte de femmes ménopausées, l'utilisation d'aspirine faible dose sur une durée cumulée de plus de quatre ans était associée à une diminution de risque de cancer du sein tandis que le clopidogrel était associé à une augmentation du risque de cancer du sein ER-, indépendamment de la durée d'utilisation.

Abstract 109

DAXX contribue à l'organisation de l'hétérochromatine et protège l'intégrité génomique des cellules pluripotentes

Antoine CANAT – 4^e année de thèse 2019

Antoine Canat¹, Adeline Veillet¹, Yasmine Khalil¹, Emmanuelle Fabre¹ and Pierre Thérizols¹.

¹ Université de Paris, Laboratoire Génomes, Biologie Cellulaire et Thérapeutiques, CNRS UMR7212, INSERM U944, Institut de Recherche St Louis, F- 75010 Paris

L'hétérochromatine correspond aux régions transcriptionnellement éteintes du génome, et corrèle avec différentes modifications épigénétiques comme H3K9me2/3, HP1α et la méthylation de l'ADN. Dans le noyau, les domaines de l'hétérochromatine ségrègent en compartiments particuliers comme les chromocentres, contenant les centromères et péricentromères, ou les domaines associés à la lamina, localisés à la périphérie. Une perte de la répression de l'hétérochromatine peut mener à des pathologies, et des perturbations de la méthylation de l'ADN sont souvent observées dans de nombreux cancers ou dans le syndrome ICF (Immunodéficience, instabilité Centromérique, anomalies Faciales). La formation des compartiments d'hétérochromatine se fait au cours du développement embryonnaire, en particulier au cours de la phase hypométhyliée. Le variant d'histone H3.3 joue un double rôle, en régulant à la fois l'euchromatine, où il est déposé par HIRA, et l'hétérochromatine, où il est déposé par le complexe DAXX/ATRAX. Ce complexe DAXX/ATRAX change de localisation lors d'une perte de la méthylation de l'ADN dans les cellules pluripotentes, où il est alors recruté aux régions répétées télomériques. Cependant, son rôle à ces localisations reste obscur. De plus, les cellules pluripotentes ont la capacité de maintenir leurs compartiments d'hétérochromatine même en l'absence de méthylation. Dans cette étude, nous étudions le rôle de DAXX dans le maintien de l'hétérochromatine, particulièrement en conditions hypométhyliées.

Nous cultivons les cellules souches embryonnaires (CSE) murines dans un milieu 2i dans lequel les cellules atteignent le niveau basal de pluripotence, qui induit une perte physiologique du niveau de méthylation de l'ADN. Nous avons généré des CSE déficientes pour le gène Daxx grâce à la technologie CRISPR/Cas9. En utilisant une combinaison de techniques moléculaires et de microscopie, nous avons mesuré différentes marques de l'hétérochromatine et l'état transcriptionnel de ces cellules. Nous avons disséqué plus loin le rôle de DAXX en modifiant l'épigénome grâce aux technologies CRISPR/Cas9 et TALE.

Nous avons identifié la protéine DAXX comme un facteur essentiel pour la survie au niveau basal de pluripotence. Alors qu'en CSE, DAXX forme de petits foyers colocalisant avec les corps nucléaires PML, nous observons que durant une perte de méthylation de l'ADN, DAXX est fortement recruté aux régions péricentromériques. Ces foyers sont entourés par une coquille géante de protéines PML. Au niveau basal de pluripotence, les CSE accumulent des dommages à l'ADN, et en l'absence de DAXX, cette accumulation est encore augmentée. Nous observons que l'induction de dommages à l'ADN, même dans un milieu permettant la méthylation de l'ADN mène au recrutement de DAXX aux régions péricentromériques. Nous montrons également qu'en l'absence de DAXX, l'organisation globale de l'hétérochromatine est affectée. Cette perturbation mène à l'augmentation transcriptionnelle des gènes présents dans l'hétérochromatine et habituellement réprimés.

Notre étude a permis de découvrir un nouveau facteur impliqué dans l'organisation de l'hétérochromatine des CSE, la chaperonne DAXX, qui est essentielle pour la survie cellulaire au niveau basal de pluripotence.

Abstract 110

Prédicteurs neuromusculaire, psychologique et comportemental de la fatigue liée au cancer chez des patientes atteintes de cancer du sein

Martin CHARTOGNE – 1^{ère} année de thèse 2017

Laboratoire Motricité Interactions - Univ. de Nantes - Le Mans UFR Sciences et Techniques - Département STAPS - Le Mans

Contexte et objectifs. La Fatigue Liée au Cancer (FLC) est définie comme une sensation pénible et persistante d'épuisement physique, mental et cognitif liée au cancer et à son traitement ; qui n'est pas proportionnelle aux activités récentes et qui interfère avec le fonctionnement quotidien [1]. La FLC est le principal effet secondaire rapporté par les personnes atteintes d'un cancer, en effet sa prévalence est entre 59 et 100% en fonction du type de cancer et de traitement [2]. Elle affecte la qualité de vie pendant et après la maladie, puisque 10% des patients la ressentiront encore 25 ans après rémission [3]. De plus ses origines sont multifactorielles, c'est-à-dire liées à des paramètres physiologiques, biologiques, psychologiques, sociaux ou comportementaux [4]. Cela rend son évaluation et la compréhension des mécanismes sous-jacents particulièrement complexe. De précédentes études ont montrée des corrélations entre FLC et les troubles du sommeil [5], l'anxiété et la dépression [6] mais également avec la fatigabilité à l'exercice [7]. Néanmoins ces corrélats de la FLC sont généralement investigués de manière isolée. Cela ne permet pas de rendre compte des mécanismes individuels de la FLC qui peuvent varier d'un individu à l'autre. L'objectif de cette étude était d'évaluer les liens entre divers facteurs physique, psychologique et comportemental liés à la FLC ressentie par des patientes atteintes de cancer du sein.

Méthode. 33 Femmes atteintes d'un cancer du sein (stade I à IV ; 57,7 ± 10,2 ans) ont été recrutées pendant la période des traitements ou dans les 2 ans les suivant. Une session expérimentale unique a été conduite afin de permettre la réalisation d'un test de fatigue des muscles fléchisseurs des doigts (handgrip), composé de 60 contractions maximales volontaires (MVC) de 4 s espacées de 1 s de récupération. La force maximale produite lors de chaque MVC a été enregistrée. L'asymptote de la relation force maximale-temps (ΔFA) a été considérée comme le seuil de fatigabilité neuromusculaire [8]. En complément, il a été demandé aux patientes de compléter à domicile des questionnaires portant sur la qualité de vie (EORTC QLQ-C30), la FLC (EORTC FA12), la quantité et la qualité du sommeil (PSQI) et les symptômes d'anxiété-

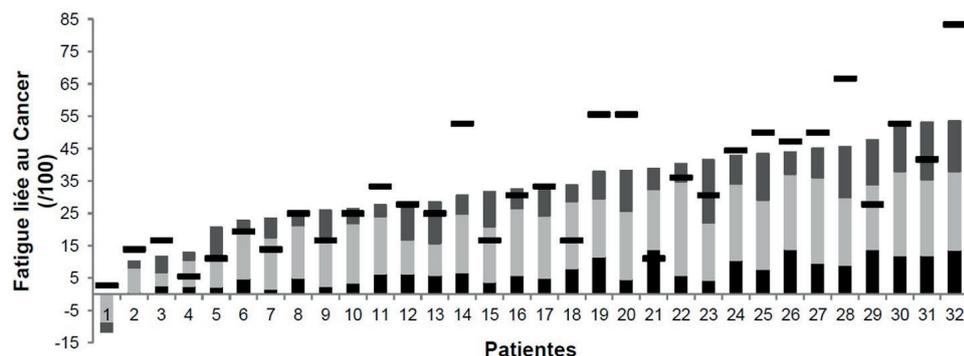
dépression (HADS). L'ensemble des données recueillies ainsi que l'âge ont été intégrés dans une analyse de régression linéaire multiple par étapes afin de déterminer leur poids respectif dans la FLC des patientes (évaluée par le score total au EORTC FA12).

Résultats. L'analyse de régression linéaire multiple a mis en avant que la FLC pouvait être prédite par un modèle incluant le score HADS, le ΔFA et le score PSQI ($r^2 = 0.55$; $p < 0.001$) sans révéler de colinéarité entre ces paramètres. Les valeurs individuelles de FLC prédites et mesurées ont été représentées, ainsi que le poids relatif des variables prédictives incluses dans le modèle final (Figure 1).

Discussion. Les résultats révèlent que les symptômes émotionnels (anxiété-dépression), la fatigabilité neuromusculaire et les troubles du sommeil permettent d'expliquer 55% de la variance de la FLC. L'ensemble de ces paramètres ont déjà été reliés séparément à la FLC [5-7], mais à notre connaissance il s'agit du premier modèle de prédiction de la FLC combinant paramètres psychologiques, physiques (neuromusculaires) et comportementaux. L'utilisation de ce modèle peut permettre aux professionnels en soins de support de déterminer les mécanismes de la FLC prédominants, afin d'individualiser leur accompagnement. En effet pour deux patientes avec une FLC similaire (e.g., les patientes 19 et 20 sur la Figure 1) les origines de cette FLC sont différentes (majoritairement liées aux symptômes dépressifs pour la patiente 19 alors que plutôt liées aux troubles du sommeil pour la 20). Ce besoin d'individualisation de l'accompagnement en soins de support basé sur les caractéristiques des patients a été largement souligné [4, 9, 10]. Cependant une part de la variance de la FLC reste inexplicée par ce modèle (i.e., 45%), d'autres mécanismes restent donc à inclure dans ce type d'analyse afin de prédire au mieux la FLC des patientes ayant un cancer du sein. C'est pourquoi, nous menons actuellement d'autres études destinées à approfondir la compréhension des mécanismes de la FLC et à évaluer l'effet d'accompagnement en soins de support sur la FLC.

Figure 1

Représentation des valeurs individuelles de FLC prédites et mesurées. Le tiret noir représente la FLC mesurée et la hauteur de la barre empilée la FLC prédite par le modèle. Les barres noire, gris foncé et gris clair représentent le poids relatifs dans la FLC prédite du score HADS, du ΔFA et du score PSQI, respectivement



Références

1. Berger AM, Mooney K, Alvarez-Perez A, et al (2015) Cancer-related fatigue, version 2.2015. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw 13:1012-1039. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2015.0122>
2. Weis J (2011) Cancer-related fatigue : prevalence , assessment and treatment strategies. 441-446
3. Faria EW (2009) Recent advances in specific training for cycling. Int Sport J 10:16-32
4. Mcneely ML, Courneya KS (2010) Exercise Programs for Cancer-Related Fatigue : Evidence and Clinical Guidelines. 8:945-953
5. Medysky ME, Temesi J, Culos-Reed SN, Millet GY (2017) Exercice, sommeil, et fatigue liée au cancer: quels liens de causalité ? Neurophysiol Clin 47:111-122. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2017.03.001>
6. Van Esch L, Roukema JA, Ernst MF, et al (2012) Combined anxiety and depressive symptoms before diagnosis of breast cancer. J Affect Disord 136:895-901. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.09.012>
7. Veni T, Boyas S, Beaune B, et al (2018) Handgrip fatiguing exercise can provide objective assessment of cancer-related fatigue : a pilot study
8. Burnley M (2009) Estimation of critical torque using intermittent isometric maximal voluntary contractions of the quadriceps in humans. J Appl Physiol 106:975-983. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91474.2008>
9. Menting J, Tack CJ, Bleijenberg G, et al (2018) Is fatigue a disease-specific or generic symptom in chronic medical conditions? Heal Psychol 37:530-543. <https://doi.org/10.1037/hea0000598>
10. Twomey R, Martin T, Temesi J, et al (2018) Tailored exercise interventions to reduce fatigue in cancer survivors : study protocol of a randomized controlled trial. 1-19

Abstract 111

The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy

Marie CHOLLAT-NAMY – 1^{ère} année de thèse 2017
 Inserm U1186 - Gustave Roussy - Villejuif

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer cells (NK)-mediated elimination of tumor cells is mostly dependent on Granzyme B apoptotic pathway, which is regulated by the wild type (wt) p53 protein. Because TP53 inactivating mutations, frequently found in human tumors, could interfere with Granzyme B-mediated cell death, the use of small molecules developed to reactivate wtp53 function in p53-mutated tumor cells could optimize their lysis by CTL or NK cells. Here, we show that the pharmacological reactivation of a wt-like p53 function in p53-mutated breast cancer cells using the small molecule CP-31398 increases their sensitivity to NK-mediated lysis. This potentiation is dependent on p53-

mediated induction of autophagy via the sestrin-AMPK-mTOR pathway and the ULK axis. This CP31398-induced autophagy sequesters in autophagosomes several anti-apoptotic proteins, including Bcl-XL and XIAP, facilitating Granzyme B-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase-3 activation and Granzyme B- or NK cell-induced apoptosis. Together, our results define a new way to increase cytotoxic lymphocyte-mediated lysis of p53-mutated breast cancer cell, through a p53-dependent autophagy induction, with potential applications in combined immunotherapeutic approaches.



Abstract 112

La Mambaquarétine, une toxine de venin de mamba vert, nouvel antagoniste du récepteur V2 pour le diagnostic et le traitement potentiel du cancer rénal

Amélia CHORFA – 1^{ère} année de thèse 2018

Amélia Chorfa¹, Maïthé Corbani¹, Nicolas Gilles², Bernard Mouillac¹ et Christiane Mendre¹

1- Institut de Génomique Fonctionnelle, Université Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

2- Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, Commissariat à l'Energie Atomique, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France

Contexte et Objectifs : Le cancer du rein représente environ 3% de l'ensemble des cancers. Malgré les traitements actuels, le taux de survie après 5 ans chez les patients atteints d'un cancer rénal à un stade avancé est de seulement 8%. Le développement de nouvelles approches est donc nécessaire pour identifier de nouvelles cibles impliquées. Le récepteur V2 de la vasopressine est exprimé au niveau du rein et son activation par la vasopressine induit l'effet antidiurétique par la production d'AMPc. Etant surexprimé dans les tumeurs rénales, ce récepteur pourrait être une cible thérapeutique intéressante. De plus, ses antagonistes spécifiques sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* chez la souris (1,2). Malheureusement, les antagonistes du récepteur V2 sur le marché actuel sont hépatotoxiques, c'est le cas du Tolvaptan. Il est donc nécessaire de développer d'autres outils thérapeutiques pour cette cible. La Mambaquarétine (MQ) est une toxine peptidique issue du venin de mamba vert caractérisée dans notre laboratoire en tant qu'antagoniste sélectif du récepteur V2. Cette molécule est capable d'inhiber la formation de kystes rénaux dans un modèle *in vivo* de polykystose rénale chez la souris *pcy* (3). Nos objectifs sont donc d'étudier l'effet de ce nouvel antagoniste V2, sur sa capacité à constituer un bon outil diagnostic d'identification

du récepteur sur des cellules cancéreuses rénales humaines et d'élargir l'indication de ses propriétés antagonistes en tant que potentiel outil thérapeutique dans le traitement du cancer rénal.

Méthodes : Avec différentes lignées cellulaires humaines de cancer rénal : ACHN, A498 et Caki-2, nous avons analysé l'expression du récepteur V2 dans ces lignées par marquage immunofluorescent avec la MQ fluorescente. Sur ces cellules, nous avons ensuite étudié l'effet inhibiteur de la MQ sur la signalisation AMPc induite par la vasopressine par un test AMPc en TR-FRET (Cisbio) et évalué son effet sur la prolifération cellulaire avec le kit MTT (Roche).

Résultats : Nos expériences de marquage avec la MQ fluorescente montrent que le récepteur V2 est exprimé dans les lignées rénales cancéreuses. La MQ est également capable d'inhiber la production d'AMPc induite par la vasopressine dans les cellules cancéreuses rénales, et de diminuer de manière significative leur prolifération.

Discussion : Le récepteur V2 est une cible pertinente pour laquelle la MQ constitue un excellent outil de marquage spécifique du récepteur V2 et un potentiel outil thérapeutique pour le cancer du rein. Des expériences de marquage sur tissus tumoraux et sur l'animal entier ainsi que des essais thérapeutiques *in vivo* sur des modèles de xénogreffes, nous permettraient de valider que la MQ pourrait constituer un candidat très pertinent dans le traitement du cancer rénal.

1. Bolignano et al, Urologic. Oncology, 2009, 642-7
2. Sinha et al, Oncogene, 2019, 1059-0
3. Ciolek et al, PNAS, 2017, 7154-9

Abstract 113

E-cadhérine : Nouvel acteur du remodelage matriciel lors de la carcinogénèse pancréatique

Aurélié DOBRIC – 4^e année de thèse 2019

Dobric.A¹, Germain.S¹, Bonier.R¹, Silvy.F¹, Soubeyran.P¹, Iovanna.J¹, Rigot.V¹, André.F¹

1- Équipe « Cancer du pancréas ». Aix-Marseille Université, CNRS, INSERM, Institut paoli-Calmettes, CRCM, Faculté des sciences de Luminy, 163 avenue de Luminy, 13009 Marseille, France.

L'adénocarcinome pancréatique ductal (ADKP) est l'un des cancers les plus mortels suite à un diagnostic tardif ainsi qu'une chimio- et radorésistance. La complexité de ce cancer est augmentée par une forte invasion tissulaire ainsi que par une dissémination métastatique précoce le classant en tête position des cancers les plus agressifs.

Des altérations d'expression des molécules d'adhérence telles que les cadhérines sont reportées dans le cas de l'ADKP. En revanche, nous ne savons pas comment ces changements peuvent contribuer à la progression tumorale. Nos précédents travaux démontrent l'implication différentielle de la E- et de la P-cadhérine dans l'invasion des cellules tumorales pancréatiques. Dans cette étude, nos travaux visent à comprendre la fonction de la E-cadhérine dans le remodelage matriciel.

Comme pour d'autres tumeurs solides, il peut être observé dans les ADKPs des structures situées au front de migration, appelées invadopodes. Ces derniers sont des structures membranaires qui

permettent lorsqu'elles sont matures, la sécrétion de différentes protéases à l'origine de la dégradation de la matrice extracellulaire environnante.

De façon à étudier la fonction de la E-cadhérine dans le remodelage de la matrice extracellulaire, nous avons sélectionné la lignée tumorale BxPC-3 qui exprime la E-cadhérine (BxPC-3 shCTRL) que nous avons déplétées par shRNA (BxPC-3 shEcad).

En réalisant un test d'invadopodes, nous avons démontré un rôle fonctionnel de la E-cadhérine dans la formation de ces structures. En effet, les cellules déplétées en E-cadhérine forment moins d'invadopodes que la condition contrôle. Ces résultats ont pu être confirmés en utilisant un inhibiteur fonctionnel de la E-cadhérine.

Par imagerie confocale, nous avons pu identifier de façon surprenante, la localisation d'un pool de E-cadhérine au niveau de la protrusion actinique qui structure l'invadopode. Le co-marquage de la E-cadhérine

avec les différents marqueurs des invadopodes (Cortactine, Tks5, MT1-MMP) confirment ces observations. De plus, cette localisation de E-cadhérine a pu être validée par Western Blot après purification de la fraction des invadopodes. Ces données montrent ainsi une localisation de la E-cadhérine inconnue jusqu'à présent et suggèrent une interaction physique et/ou fonctionnelle de la E-cadhérine avec les marqueurs des invadopodes. Des tests de co-précipitation et de proximity ligation assay (PLA), nous ont permis d'identifier une interaction physique entre la E-cadhérine et la MT1-MMP au sein des invadopodes.

Nos études révèlent ainsi une fonction inconnue de la E-cadhérine le développement tumoral. Dans les cellules tumorales pancréatiques, cette dernière intervient dans la formation des invadopodes et pourrait servir à évaluer les propriétés invasives des cellules tumorales de patients.

Abstract 114

Malignité des tumeurs mutées sur le gène SDHB : Rôle de l'homéostasie du fer et du stress oxydant

Judith GONCALVES – 4^e année de thèse 2019

Judith Goncalves¹, Aurélie Morin¹, Géraldine Gentric², Sebastian Muller³, Sophie Moog¹, Katarína Křiváková⁴, Charlotte Lussey-Lepoutre¹, Paule Bénit⁵, Raphaël Rodriguez³, Fatima Mechta-Grigoriou², Anne-Paule Gimenez-Roqueplo¹, Eric Letouzé⁶, Daniel Tennant⁴ et Judith Favier¹

1- Université de Paris, PARCC, INSERM, Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, Paris, France ; 2- Institut Curie, Inserm, Stress and Cancer Laboratory, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, PSL Research University, Paris ; 3- Chemical Biology of Cancer, CNRS UMR3666, Inserm U1143, Institut Curie, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, PSL Research University ; 4- Institute of Metabolism and Systems Research, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham. UK ; 5- INSERM, UMR 1141, Hôpital Robert Debré, Paris, France ; 6- Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, Functional Genomics of Solid Tumors

Contexte : La succinate déshydrogénase est une enzyme mitochondriale dont le déficit est responsable d'une prédisposition au développement de plusieurs types de tumeurs, dont les phéochromocytomes et les paragangliomes (PPGL), mais aussi certaines formes rares de cancers du rein et de tumeurs gastro-intestinales. La SDH est composée de 4 sous-unités codées par les gènes SDHA, B, C et D qui sont tous des gènes de prédisposition au PPGL. Pourtant, les conséquences cliniques de ces différentes mutations sont très différentes. En effet, seule une mutation sur le gène SDHB constitue un facteur de risque d'évolution métastatique et de mauvais pronostic. Les raisons de ces différences restent totalement inexplicables.

Objectif : Elucider les mécanismes expliquant les différentes présentations cliniques observées chez les patients atteints, et en particulier l'agressivité des tumeurs liées aux mutations du gène SDHB.

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé la technique du CrispR-Cas9 pour générer une lignée de cellules chromaffines murines (imCC) porteuse d'une inactivation du gène Sdhd. Le phénotype de ces cellules a été comparé à celui des imCC Sdhd^{-/-}, précédemment générées au laboratoire (Letouzé et al, Cancer Cell 2013). Nous avons effectué la caractérisation ces deux modèles cellulaires en termes de prolifération, migration et adhésion et établi leurs profils métabolique, transcriptomique, épigénétique. Dans ces cellules nous avons également étudié les niveaux cytosoliques et mitochondriaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de fer et de cuivre.

Résultats : Les cellules Sdhd^{-/-} présentent un phénotype beaucoup plus agressif que les cellules Sdhd^{-/-}, avec des propriétés adhésives et migratoires accrues, reflétant les comportements cliniques différents des tumeurs observés chez les patients porteurs de ces mutations. Les cellules Sdhd^{-/-} présentent également une plus forte inhibition des dioxygénases 2-OG dépendantes, ayant pour conséquence une hyperméthylation accrue et un phénotype pseudo-hypoxique. Par ailleurs, les imCC Sdhd^{-/-} manifestent des niveaux plus élevés de ROS, associés à un déséquilibre de l'homéostasie du fer et du cuivre cellulaire, en comparaison aux imCC Sdhd^{-/-}. La sous-unité SDHB est la seule sous-unité SDH portant trois clusters fer-soufre. Nous mettons en évidence ici, le rôle joué par les dérivés réactifs de l'oxygène et l'homéostasie du fer dans l'inhibition plus forte des dioxygénases et donc dans l'acquisition de propriétés métastatiques spécifiquement associées aux mutations SDHB. En outre, les cellules Sdhd^{-/-} montrent une sensibilité accrue à un traitement par de fortes doses d'ascorbate. Conclusion: Cette étude met en évidence, pour la première fois, un mécanisme reliant les mutations du gène SDHB au stress oxydant et à l'homéostasie du fer et du cuivre, pouvant expliquer le phénotype particulièrement agressif de ces tumeurs. Ces données suggèrent l'efficacité de l'ascorbate pharmacologique comme traitement, ciblant plus spécifiquement les voies activées dans les PPGL SDHB-dépendants.

Abstract 115

Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse

Jades HEBRAS – 4^e année de thèse 2019
CNRS UMR 5099 - Centre de Biologie intégrative - Toulouse

Parmi les ARN non-codants, les petits ARN nucléolaire à boîte C/D ou SNORDs exercent leurs fonctions régulatrices via des appariements avec les ARN ribosomiques (ARNr), afin de guider la synthèse de méthylations en 2'-O-ribose sur des nucléotides spécifiques. Notre compréhension des bases moléculaires régissant la dynamique des profils de méthylation de l'ARNr en fonction des conditions de croissance cellulaires voire dans des tissus cancéreux reste peu documentée. L'essentiel des données acquises à ce jour concerne des lignées cellulaires cultivées in vitro (HeLa, HTC116).

Dans l'article Hebras J. et al. de 2019 dans RNA Biology nous avons étudié la dynamique du profil de méthylation des ARNr dans les tissus de souris (adultes vs développement), travail réalisé en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. H. Nielsen à Copenhague, équipe qui a développé des approches pionnières (RiboMeth-seq) pour cartographier, à grande échelle, les méthylations en 2'-O-riboses sur les ARNr.

Nous avons profilé les méthylations de l'ARNr dans des ribosomes issus de tissus de souris adultes vs leurs équivalents lors du développement au stade E16.5. Les ARNr au cours du développement apparaissent globalement moins méthylés que ceux des tissus adultes. Ces observations suggèrent que les ribosomes des cellules en prolifération possèdent un profil de méthylation qui les distingue de ceux présents dans des cellules différenciées et quiescentes. Il y a cependant un contre-exemple: la position G4593 de la grande sous-unité ribosomique dont le niveau de méthylation diminue au cours du développement.

Fait remarquable, l'expression de SNORD78, prédit pour guidée Gm4593, diminue au cours du développement et corrèle donc avec le niveau de la méthylation à G4593. Le gène de SNORD78 réside dans un intron de GAS5, un long ARNnc qui héberge huit autres SNORDs. Curieusement, l'expression de GAS5, mais aussi celle des autres SNORDs, restent relativement stable durant le développement. Cela implique un mécanisme spécifique, vraisemblablement post-transcriptionnel, qui empêche la méthylation à la position G4593 via la baisse sélective d'expression SNORD78 dans les tissus adultes. Enfin, j'ai étudié la fonction potentielle de Gm4593 dans une lignée cellulaire humaine (HEK293) KO pour SNORD78 (CRISPR/Cas9). L'absence de cette méthylation n'altère pas la survie, l'apoptose ou le cycle cellulaire et des expériences avec des gènes rapporteurs montrent que l'absence de cette méthylation n'entraîne que des effets mineurs sur la fidélité du ribosome.

Ce travail montre que le profil des 2'-O méthylations des ARNr au cours du développement diffère de celui observé dans les tissus adultes. Ce travail soutient la notion de ribosomes spécialisés stipulant que le ribosome est hétérogène sur le plan structural et fonctionnel. Enfin, on révèle une relation inattendue entre expression de GAS5 et production des SNORDs. L'expression de GAS5 est souvent dérégulée dans les cancers où il influence la mort et la prolifération cellulaire. Ce travail invite donc à examiner attentivement la méthylation guidée par SNORD78 dans les tissus cancéreux, et ce, indépendamment de l'expression de son gène-hôte.

Abstract 116

Quelles sont les connaissances et les expériences que les professionnels en oncologie ont auprès des jeunes aidants ?

Pauline JUSTIN – 1^{ère} année de thèse 2019
EA 4057 - Université Paris Descartes - Institut de Psychologie - Boulogne-Billancourt

Contexte et objectifs :

Les jeunes aidants (JA) sont des enfants et des adolescents apportant une aide significative et régulière à un proche malade, souvent un parent ou un frère/une sœur. Il s'agit d'une population encore très peu connue en France. Pourtant, de nombreux jeunes y seraient confrontés dans le cadre du traitement du cancer. Ils rapporteraient avoir besoin de l'aide de soignants sans toutefois savoir comment l'obtenir. Par ailleurs, les JA ne seraient pas identifiés comme tels par les professionnels de la santé, ceux-ci se centrant principalement sur le patient. Or, mieux identifier les JA permettrait de mieux accompagner les patients. L'objectif de cette recherche est d'explorer les connaissances et les pratiques que les professionnels en oncologie ont des JA pour construire une intervention

visant à améliorer l'accompagnement des patients et de leur famille. Il s'agira notamment de savoir s'ils parviennent à les identifier et ce qu'ils font face à cette situation.

Méthodes :

L'étude a obtenu un avis favorable du Comité Éthique de la Recherche de l'Université Paris Descartes. Des médecins, cadres de santé, infirmiers, aides-soignants, psychologues et assistants des services sociaux seront interrogés, dans toute la France, en oncologie adulte et pédiatrique. L'étude se déroulera en 2 étapes : une étude qualitative exploratoire et une étude quantitative sous forme d'enquête nationale.

Pour la partie qualitative, 30 à 40 personnes professionnels seront interrogés, avec une répartition homogène entre les professions, le secteur d'activité (pédiatrie/adulte) et la zone géographique (rurale/urbaine). Les entretiens seront semi-structurés et viseront à explorer les connaissances que les professionnels ont de la question des JA, leurs expériences d'accompagnements et leurs besoins. Une analyse thématique inductive sera réalisée selon la méthode de Thomas (2006). Pour la partie quantitative, 2000 professionnels seront interrogés. Les questions en lien avec les JA seront créées à partir de l'analyse des résultats aux entretiens de l'étude qualitative. Des analyses statistiques descriptives et comparatives seront réalisées.

Résultats :

Cette étude s'attend à observer une méconnaissance du terme de JA de la part des professionnels mais une compréhension de la situation liée à une confrontation plus ou moins régulière à ce type de population. Toutefois, des différences pourraient exister selon la profession, les services et le lieu de travail.

Discussion :

Cette étude permettra de faire avancer l'état des connaissances actuelles sur les JA, et plus particulièrement le vécu et l'expérience des professionnels en oncologie. Il s'agira d'explorer ce qui est déjà mis en place par les soignants et ce, en tenant compte des spécificités du territoire (grandes villes, déserts médicaux...) pour améliorer la prise en charge des familles et des JA en oncologie adulte et pédiatrique. Cette étude permettra de sensibiliser les soignants à cette problématique pour les amener à avoir un nouveau regard sur certaines situations et faire évoluer leurs pratiques.

Les résultats permettront de proposer une intervention de sensibilisation et/ou de formation à destination des équipes de soins pour leur permettre de mieux identifier, soutenir et orienter les JA et leur famille. Une prise en charge globale de la famille est susceptible d'améliorer le pronostic du patient et de réduire les conséquences néfastes du cancer sur l'entourage.

Abstract 117

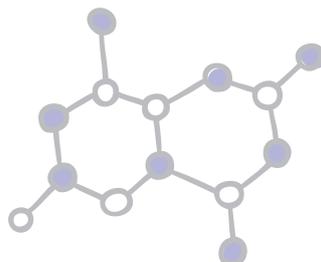
Foxp3 regulatory T cells activate tumor-produced TGF-beta: a key mechanism to prevent T cell anti-tumor immune response

Alexandra LAINE – 4^e année de thèse 2018

Lainé A.¹, Labiad O.¹, Hernandez-Vargas H.¹, This S.², Sanlaville A.¹, Bernet V.¹, Paidassi H.², Travis M. A.³ and Marie J. C.¹
 1- INSERM U1052/CNRS UMR 5286. Department of Immunity, Virology and Inflammation. Cancer Research Center of Lyon.
 2- INSERM U1111/CNRS/UMR5308. Center of Infectiology Research of Lyon.
 3- Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research, University of Manchester.

A large part of solid tumors express high amounts of Transforming Growth Factor beta (TGF-b), known as a potent suppressor of the immune system. However, TGF-b is secreted under its inactive form

and how TGF-b produced by the tumor is activated remains totally unknown. Here, we demonstrated that tumor-produced TGF-b is activated by the avb8 integrin (Itgb8) expressed at the surface of Foxp3 regulatory T cells (Tregs). The selective deletion of Itgb8 in Tregs impairs TGF-b signaling in tumor infiltrating T cells. Subsequently, the cytotoxic program of effector T cells is activated, leading to efficient tumor cell-apoptosis and control of the tumor burden. The relevance of our data found in mice was confirmed in the human pathology. Thus, our study reveals that Tregs and tumor cells work together to allow the suppressive effect of the TGF-b on effector T cells, which consequently impacts tumor progression.



Abstract 118

Identification of a Novel Subset of Neutrophils in scRNAseq Data from Lung Cancer Patient's Peripheral Blood

Pacôme LECOT – 4^e année de thèse 2019

Pacôme Lecot¹, Maude Ardin¹, Sébastien Dussurgey², Hector Hernandez-Vargas¹, Lyvia Moudombi¹, Christophe Caux¹, Marie-Cécile Michallet¹

1- Department of Immunity, Virus, and Inflammation (IVI), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France

2- Anira Cytometry platform, US8/UMS 3444/SFR Gerland Biosciences, 69366 Lyon, France

Neutrophils is the most represented immune cell type in human peripheral blood. They can either promote or prevent the establishment of systemic autoimmune or infectious diseases. In cancer patients with solid tumors, peripheral blood neutrophils are more likely associated with disease progression. Low-density neutrophils (LDNs) expand in a subset of cancer patient's blood, which is linked to a poorer prognosis.

Neutrophils can also interact with platelets, to form neutrophil-platelet aggregates (NPAs) leading to activation of the pro-inflammatory functions of neutrophils. However, the characterization of NPAs in cancer remains unexplored. By using imaging flow cytometry, we could detect NPAs in lung cancer patient's peripheral blood. We found that platelet aggregation was restricted to LDNs in contrast to normal density neutrophils (NDNs). Using public scRNAseq data from lung cancer patient's peripheral blood, we could identify a subset of neutrophils expressing platelet-specific genes, relating to NPAs, among five other neutrophil subpopulations. Interestingly, downstream transcriptomic analysis of platelet gene-expressing neutrophils compared to the other neutrophil subsets revealed that NPAs displayed a higher enrichment of the oxidative phosphorylation gene signature. Taken together, our results suggest that neutrophils from NPAs are a distinct subpopulation of neutrophils that may possess a specific function in cancer, which remains to be investigated.

Abstract 119

LynchRisk : Un modèle mathématique mendélien pour le calcul du risque individuel et familial de syndrome de Lynch et l'aide à la classification des variants

Alexandra LEFEBVRE – 1^{ère} année de thèse 2017

Laboratoire de Probabilités et Modèles Aléatoires - CNRS UMR 7599 - Univ. Pierre et Marie Curie - Paris

Contexte et objectifs : Un phénotype d'instabilité des microsatellites (MSI) est observé dans 15% des tumeurs colorectales, endométriales, moins souvent dans d'autres localisations. Il est dû à des variants pathogènes dans les gènes du système MMR (Mismatch Repair) qui peuvent être hérités (Syndrome de Lynch - LS). La détection de ce syndrome est importante pour la prise en charge des patients. Un outil mathématique de calcul du risque de LS objectif et requête pour accompagner cliniciens et/ou gestionnaires de bases de données s'avère indispensable. Les modèles de calcul de risque de LS sont divisés en deux catégories : les régressions logistiques et les modèles mendéliens. Seuls les modèles mendéliens sont capables de prendre en compte la totalité de l'histoire familiale de cancer, à savoir, l'ensemble des individus et liens familiaux et l'ensemble des phénotypes (localisation + âge au diagnostic pour les cas, âge aux dernières nouvelles pour les individus sains). D'autre part, 32% des variants constitutionnels séquencés sont de signification inconnue (VSI). Les modèles mendéliens calculant la probabilité de LS pour l'ensemble des individus, ils peuvent également, couplés aux analyses de co-ségrégation, participer à la classification des VSI. A notre connaissance, le seul modèle mendélien existant dans le contexte de LS est MMRPro, mis à jour en 2006, et comportant plusieurs limitations techniques (analyse de survie multi-état, liaison génétique, etc.). L'objectif principal de la thèse est la mise en place d'un nouveau modèle mendélien de calcul du risque de LS nommé LynchRisk (LR).

Méthode : LR est un modèle mendélien implémenté en réseau bayésien, modèle graphique pro-babiliste particulier, et utilisant la théorie des modèles graphiques probabilistes et l'algorithme *somme-produit* pour ses calculs. L'utilisation de modèles de survie multi-état rigoureux permet la prise en compte des récurrences et localisations multiples. LR intègre également, au fur et à mesure de leur disponibilité, les données cliniques et biologiques comme covariables. En ce sens, LR est un outil intégratif, à chaque étape du parcours du patient. Les paramètres du modèle sont tirés de la littérature récente référencée par l'InCa (www.e-cancer.fr) ou InSiGHT (www.insight-group.org).

Résultats : Une évaluation des résultats de LR et de MMRpro sur de nombreux cas cliniques fictifs et un sous-ensemble de trente familles du groupe hospitalier APHP.Sorbonne Université montrent la concordance entre intuition du praticien et calculs.

Discussion : Les résultats obtenus sur des cas cliniques choisis montrent un pouvoir discriminant LS versus non LS de LR. Un des premiers objectifs complémentaire serait la constitution d'une base de données conséquente pour une validation du modèle et une étude de sensibilité / spécificité.

Abstract 120

Lumière sur les cellules tumorales

Hussein MEHIDINE – 1^{ère} année de thèse 2017
CNRS UMR 8165 - IN2P3 - Orsay

Le cancer du cerveau se considère parmi les cancers les plus mortels qui attaquent les humains. Parmi les différents types des tumeurs cérébrales, le glioblastome est le plus grave en terme de malignité, et d'évolution. Sa thérapie principale consiste à la résection chirurgicale complète du volume tumoral. Le défi principal de cette intervention neurochirurgicale consiste à obtenir une identification précise des marges de la tumeur afin de réaliser une résection complète. Autour de la partie solide de la tumeur, il existe une zone d'infiltration contenant des cellules tumorales actives et qui envahissent les cellules saines, où l'incapacité à visualiser complètement les limites d'infiltration entraîne une résection non complète ce qui augmente les risques de récurrence. De même, le retrait inutile de tissu cérébral ne contenant pas de cellules cancéreuses peut entraîner des déficits neurologiques majeurs nuisant à la qualité de la vie du patient et conduit à de mauvais résultats chirurgicaux. La seule technique qui permet d'avoir un diagnostic précis sur ces zones d'infiltration est l'analyse histologique du prélèvement tumoral, mais elle s'intervient après l'opération et nécessite plusieurs jours pour obtenir les résultats. Pour adresser ce challenge, notre équipe

du laboratoire IMNC développe un nouvel outil optique qui permet d'imager, en per-opératoire, les zones tumorales à l'échelle cellulaire afin d'obtenir une information rapide et précise sur la nature tissulaire. Cet outil est un endomicroscope multimodale capable de détecter la fluorescence des différentes molécules endogènes présentes dans les cellules humaines sans aucun ajout de substances chimiques ou des marqueurs spécifiques. En plus, il est capable de détecter la génération de seconde harmonique (SHG) provenant des fibres de collagènes, indice de vascularisation dans les tissus. Mais le développement d'un tel outil nécessite en parallèle la mise en place d'une banque de données tissulaires englobant les différentes modalités d'imagerie qu'on souhaite intégrer dans notre endomicroscope. Cette banque de données aura pour objectif de caractériser et discriminer les différents types de tumeurs cérébrales à travers leurs signatures optiques spécifiques. A l'issue de cette banque de données, différentes méthodes d'analyse et de traitement de données seront développées et implémentées dans notre instrument. L'objectif étant, en se basant sur cette banque, d'être en mesure de fournir au chirurgien un diagnostic fiable en temps réel.



Abstract 121

Les cellules X : Un nouvel espoir dans la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Anne-Beatrice NOTARANTONIO – 1^{ère} année de thèse 2017
CNRS 7365 - IMOPA - Vandœuvre-lès-Nancy

A-B. Notarantonio, C. Pochon, F.Salem, M. De Carvalho Bittencourt, H.Louis, D. Bensoussan, M-T. Rubio, M. D'Aveni

Contexte : Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) constituent une population hétérogène de cellules aux propriétés immunosuppressives, décrites initialement dans le microenvironnement tumoral, de phénotype CD19⁻ CD3⁻ HLADR^{high} CD33⁺ CD11b⁺. Trois sous-types de cellules ont été définis phénotypiquement : les monocytiques CD14⁺ (M-MDSC), les granulocytiques CD15⁺ (G-MDSC), les immatures CD14⁺CD15⁺ (e-MDSC). Notre équipe a décrit l'existence d'une sous-population de M-MDSC dans les greffons de cellules souches périphériques (CSP) mobilisés par G-CSF exprimant CD34⁺ (D'Aveni et al. STM 2015). Cette population a des propriétés immunorégulatrices dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et sa richesse dans les greffons de CSH était corrélée à la survenue de GVH chez l'homme. Le potentiel immunorégulateur de ces cellules en font d'elles des candidates potentielles dans la prévention et le traitement de la GVH mais leur faible nombre dans les greffons requiert de mettre au point une méthode d'expansion *ex vivo* avant utilisation thérapeutique.

Méthodes : Dans l'objectif d'expandre des MDSC CD34⁺, nous avons mis au point une technique d'expansion de cellules X à partir de cellules souches périphériques de donneurs sains (CSP). Nous avons analysé les pourcentages des cellules X obtenues par cytométrie en flux. Parallèlement, à l'aide de coculture avec des lymphocytes T (LT), activés par anti-CD3 et anti-CD28 nous avons évalué, *in vitro*, les propriétés immunosuppressives des cellules X après expansion. Nous avons également étudié l'effet de ces cellules, *in vivo*, dans un modèle de xéno-GVH murin. Pour cela, à J-1, nous avons irradié des souris NOD-SCID-Gamma à 2 Gray, puis à J0, nous avons injecté 1 million de cellules X concomitamment à 5 millions de cellules mononucléées humaines (PBMCs), le groupe contrôle ne recevait que 5 millions de PBMCs. L'efficacité du traitement était évaluée en surveillant le poids et la survie des souris.

Résultats : Les conditions de culture ont permis de multiplier par 2.8 le pourcentage de cellules X entre J0 et J7 (10.40% ±3.29 à J0 vs 29.17% ± 12.2 à J7, p<0.0001, n=17, test Wilcoxon) (Figure 1). Sur le plan fonctionnel, nous avons montré que les cellules X étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (LT) activés, *in vitro*, (92.03% ± 4.665 LT activés seuls, versus 57.72% ± 10.52 avec cellules X, p=0.008 n=8, test Wilcoxon) (Figure 2 et 3). *In vivo*, nous avons montré une augmentation de la survie des souris ayant reçu une association de PBMCs et de cellules X (médiane de survie 66 jours dans le groupe de souris ayant reçues des PBMCs et des cellules X (n=6) versus une médiane de survie de 46 jours dans le groupe contrôle (n=6) p=0.001 (Log-Rank test) et un maintien de leurs poids au cours du suivi. (poids moyen de 30.79 grammes chez souris ayant reçues des PBMCs et des cellules X (n=6) versus un poids moyen de 27.99 grammes dans le groupe contrôle (n=6) p=0.001 (Mann-Whitney test) (Figure 4A et 4B).

Discussion : Nous avons mis au point une technique de culture de cellules X à partir de prélèvements de CSP, aux propriétés immunosuppressives *in vitro* et *in vivo*, et qui semblent donc intéressantes dans un objectif de

contrôle de la GVH. L'étude de ces cellules en single-cell ARN-seq et des mécanismes d'action devraient nous permettre dans un avenir proche de mieux caractériser ces cellules X en vue d'un développement d'un produit de thérapie cellulaire.

Figure 1

La culture de cellules de donneur sains permet d'augmenter la proportion de Cellules X entre J0 et J7 (10.40% ±3.29 à J0 vs 29.17% ± 12.2 à J7, p<0.0001, n=17)

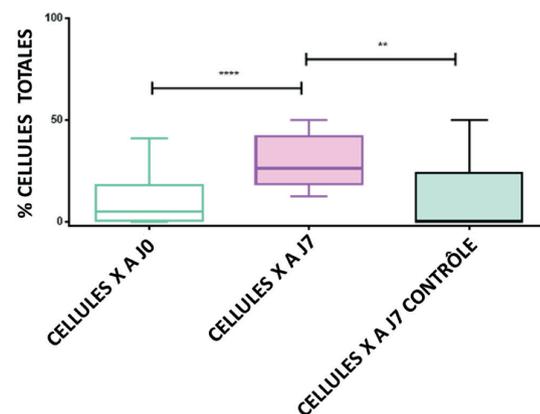


Figure 2

Représentation du pourcentage de prolifération des Lymphocytes T (LT) CD3⁺ en présence des Cellules X. La barre rouge représente la prolifération des LT CD3⁺ seuls (92.03%), la barre verte représente les LT CD3⁺ non activés (2.26%) enfin la barre bleue montre le pourcentage de prolifération des LT CD3⁺ en coculture avec des Cellules X (57.72%) La différence de prolifération entre les LT CD3⁺ seuls et la coculture des LT CD3⁺ et des Cellules X est significativement différente (p=0.008)

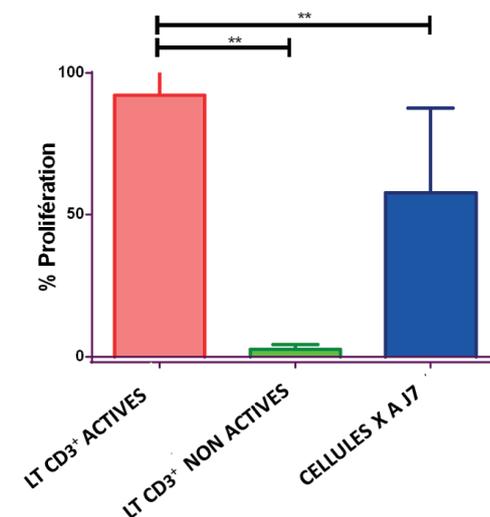


Figure 3

Prolifération à J5 des Lymphocytes T (LT) CD3+ cultivés en face des Cellules X. La courbe rouge représente la prolifération des LT CD3+ après activation par billes anti-CD3 et anti-CD28. La courbe bleue représente

l'inhibition de la prolifération des LT CD3+ par les Cellules X. La courbe verte montre l'absence de prolifération des LT CD3+ en l'absence de stimulation.

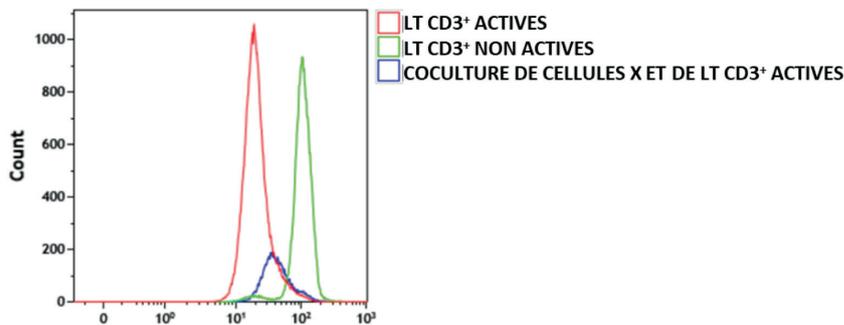
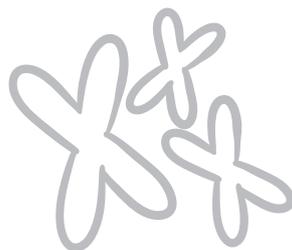
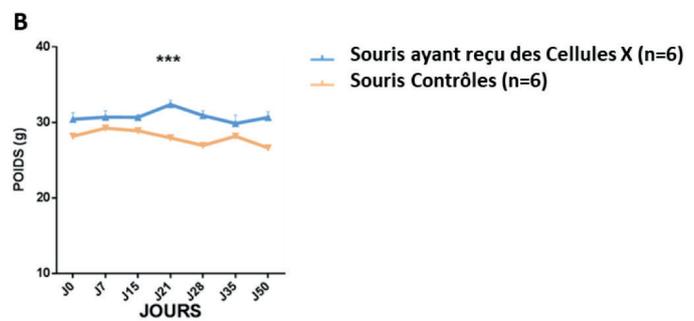
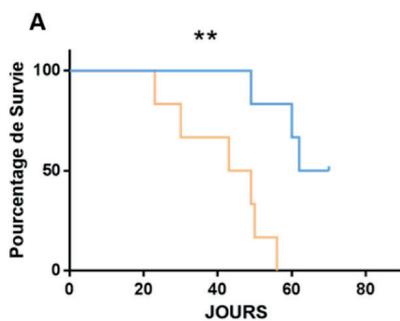


Figure 4A et 4B

Evaluation de la survie et du poids des souris Nod-Scid-Gamma (NSG) dans un modèle de xéno-GVH humain. Sur la figure 4A et 4B, la courbe bleue représente le suivi des souris ayant reçu 5 millions de cellules mononuclées humaines (PBMCs) et de 1 million de Cellules X, 24H après avoir reçu une irradiation de 2 Gray, la courbe or, correspond au groupe

contrôle et, montre le suivi des souris ayant reçu uniquement 5 millions de PBMCs après une irradiation de 2Gray. On observe une augmentation de la survie des souris injectées ($p=0.001$) et un maintien du poids chez les souris ayant reçu des Cellules X et des PBMCs versus le groupe contrôle ($p=0.001$).



Abstract 122

Identification des voies de signalisation dépendantes de PKA dans la migration et la dissémination métastatique des cellules du cancer du sein

Mathilde PROPONNET – 1^{ère} année de thèse 2017

Propionnet-Guerault, M., Boyault, Poignant J., Lemonnier N., C., Bouin, AP. and Albiges-Rizo, C.

Institut pour l'Avancée des Biosciences, CNRS UMR 5309 INSERM U1209, UGA, Grenoble

Au cours de la dissémination métastatique, les cellules cancéreuses issues d'un foyer primaire, acquièrent de nouvelles capacités de migration et d'invasion via la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'équilibre mécanique cellulaire régulé par le cytosquelette d'actine et sous la coordination des contacts cellule-cellule et cellule-matrice est perturbé entraînant une perte de cohésion cellulaire et la dissémination des cellules¹. Ainsi la formation de nouvelles tumeurs dans d'autres organes repose sur la réversibilité de cette transition – la transition mésenchymo-épithéliale (MET), dans laquelle les cellules rétablissent leur contact cellule-cellule et retrouvent une cohésion épithéliale. Le rôle de la Protéine Kinase A (PKA) dans ces deux transitions est controversé. PKA a été décrite comme un régulateur favorisant la MET ou EMT dans le cancer du sein^{2,3} et son rôle de dans la régulation de la contractilité cellulaire reste inconnu⁴. Afin de comprendre le rôle de PKA et les voies de signalisation associées à PKA dans la migration cellulaire, nous avons mis en place une approche de biologie de réseau. Basé sur les données de la littérature, nous avons défini un réseau d'interaction protéine-protéine entre la machinerie acto-adhésive (intégrines et cadhérines), les isoformes PKA, ainsi que les régulateurs de la contractilité cellulaire. La prédiction computationnelle des sites de phosphorylation spécifique de PKA a permis d'identifier 9 cibles potentielles dans le contrôle de la migration cellulaire⁵. La phosphorylation par PKA de 3 de ces 9 cibles a été confirmée dans le modèle cellulaire MDA-MB-231, cellules du cancer du sein triple négatif. Notre intérêt porte sur une de ces nouvelles cibles

qui est un marqueur métastatique et médiateur de la résistance au chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif⁶⁻⁸. Le mutant de phosphorylation de cette cible sera un atout déterminant pour étudier son rôle. Identifiés par une approche bio-informatique, 27 médicaments en phase 4 pourrait bloquer la progression et la migration des cellules du cancer du sein triple négatif. Il s'agira alors de tester ces médicaments ainsi que le mutant sur des tests de migration isolée et collective (en 2D), ainsi que des tests de croissance et de morphogénèse de mammosphères (en 3D).

1. De Pascalis, C. & Etienne-Manneville, S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1833-1846 (2017).
2. Pattabiraman, D. R. et al. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science* **351**, aad3680 (2016).
3. Nadella, K. S. et al. Targeted deletion of Prkar1a reveals a role for protein kinase A in mesenchymal-to-epithelial transition. *Cancer Res.* **68**, 2671-7 (2008).
4. Howe, A. K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta* **1692**, 159-74 (2004).
5. Xue, Y. et al. GPS 2.1: Enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 255-260 (2011).
6. Wang, C. et al. Gas6/Axl axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast cancer through Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Theranostics* **6**, 1205-1219 (2016).
7. Goyette, M. A. et al. The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression. *Cell Rep.* **23**, 1476-1490 (2018).
8. Antony, J. & Yun-Ju Huang, R. AXL-Driven EMT State as a Targetable Conduit in Cancer. *Cancer Res* **77**, (2017).

Abstract 123

Nouvel effet du sécrétome de cellules sénescences sur des cellules tumorales : la transdifférentiation neuroendocrine

Clotilde RAYNARD – 1^{ère} année de thèse 2017

Clotilde RAYNARD¹, Xingjie MA¹, Anda HUNA¹, Nolwenn TESSIER², Sylvie DUCREUX², Jean-Michel FLAMAN¹, Nadine MARTIN¹, Hector HERNANDEZ-VARGAS¹, and David BERNARD¹

1- Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Université de Lyon & Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
2- CarMeN Laboratory Inserm 1060, INRA 1397, INSA, Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France.

Suite à divers stress, les cellules rentrent dans un programme appelé sénescence entraînant un arrêt du cycle cellulaire accompagné d'un sécrétome particulier associé à la sénescence, le SASP. Les cellules

sénescences, en partie grâce à leur SASP, permettent de bloquer la prolifération et d'induire l'élimination par le système immunitaire de ces cellules à risque de transformation, mais l'accumulation du SASP peut exercer des effets pro-tumoraux. L'objectif de mon projet de thèse est d'étudier le rôle et l'impact du SASP sur différentes lignées cancéreuses mammaires. De façon étonnante, nous avons observé l'induction d'un phénotype neuroendocrinien (NE) dans des cellules luminales, MCF-7, après traitement au SASP. Cette différenciation NE (NED) est également observée dans les LNCaP, cellules cancéreuses prostatiques connues pour subir cette différenciation dans certains contextes. Mes résultats démontrent que les molécules pro-inflammatoires du SASP exprimées

par l'activation de NF- κ B, sont nécessaires pour induire ce phénotype et que le calcium semble y participer. Nous avons également étudié la pertinence de nos observations en utilisant la banque de données METABRIC où nous avons identifiés 2% de carcinomes mammaires NE (NBC), tous positifs pour le récepteur aux œstrogènes et de préférence p53 WT, conformément aux modèles utilisés pour les données fonctionnelles (MCF-7 et LNCaP). De manière intéressante, les patientes atteintes de NBC sont plus âgées, suggérant que l'accumulation de

cellules sénescentes et du SASP lors du vieillissement peut favoriser la NED. *In vivo*, nous avons observé que les glandes mammaires de souris âgées présentaient l'induction de marqueurs NE comparées à celles de jeunes souris, suggérant que vieillissement et différenciation neuroendocrine seraient liés. En conclusion, nous sommes en train de déterminer un nouvel effet du SASP, la NED, qui impacte les caractéristiques et le comportement des cancers du sein et de la prostate.

Abstract 124

Comment évaluer la parole après traitement de cancer de la cavité buccale et de l'oropharynx ?

Marie REBOURG – 1^{ère} année de thèse 2018

Marie Rebourg¹,

Sous la direction de Muriel Lalain¹ et Nicolas Fakhry^{1, 2}

¹ : Aix-Marseille Université, CNRS, LPL, UMR 7309, Aix-en-Provence, France

² : Aix-Marseille Université, APHM, Hôpital de la Conception, Service ORL et Chirurgie Cervico-Faciale, Marseille, France

Contexte et objectifs. L'amélioration des traitements des cancers de la cavité buccale (CB) et de l'oropharynx (OP) rendent prioritaire la prise en compte de la qualité de vie de patients. Les prises en charge chirurgicales et médicamenteuses sont particulièrement mutilantes et entraînent de sévères séquelles fonctionnelles notamment sur les mécanismes de production de la parole. L'altération des capacités communicationnelles est en partie évaluée par l'appréciation de l'intelligibilité (comment un message est décodé par un auditeur), des patients. Cette évaluation perceptive, Gold Standard de l'évaluation clinique, est basée sur l'évaluation de la qualité des productions de mots par les patients. Cette tâche d'écoute conduit régulièrement à une sous-évaluation des déficits car elle fait intervenir des processus de restauration perceptive (Warren, 1984; Warren et al., 1997) inhérents aux mécanismes de perception de la parole ; Ceux-ci conduisent tout auditeur à « reconstruire » un mot même mal produit en faisant référence à ses propres connaissances linguistiques, lexical (Beukelman & Yorkston, 1980; Yorkston et al., 1992).

Pour pallier ces effets, et améliorer la fiabilité de l'évaluation, le test Décodage Acoustico-Phonétique (DAP) a été développé (Astésano et al., 2018; Balaguer-Navarro, 2018). Basé sur l'utilisation de pseudo mots (PM), il permet de mesurer de manière précise et objective la sévérité de l'altération de production des différents segments de parole, en neutralisant l'accès au lexique.

Méthodes. 20 locuteurs ont participé à la constitution du corpus. 10 patients traités pour un cancer de la CB ou de l'OP et 10 témoins ont été enregistrés en production d'une liste de 50 mots (BECD, (Auzou & Rolland-Monnoury, 2006) et de 2 listes de 52 PM (DAP, Ghio et al. 2018). Les 3080 productions enregistrées ont permis la constitution de deux sous corpus de 500 stimuli BECD et 1040 stimuli DAP répartis en 6 listes. Elles ont été utilisées lors de tests de jugement perceptif de l'intelligibilité conduits auprès de 2 groupes d'auditeurs (18 naïfs et 18 cliniciens) dont la tâche était de transcrire les stimuli entendus. Les transcriptions recueillies ont permis de calculer un score d'intelligibilité, appelé score de déviation phonologique perçue (DPP). Pour l'analyse statistique, nous comparons les scores DPP par une analyse de variance pour tester les différences de scores DPP (VD) en fonction du matériel d'évaluation (VI : Mots VS PM) et du groupe d'auditeurs (VI : Naïfs VS Cliniciens).

Résultats. Les résultats ont montré que les scores DPP sont significativement plus élevés chez les patients que chez les contrôles, témoignant d'une intelligibilité altérée. Les scores DPP diminuent significativement au cours de l'évaluation basée sur des mots ($p < 0.001$) alors qu'ils restent stables au cours de l'évaluation basée sur des PM ($p = 0.041$) et ceci quel que soit le groupe d'auditeurs naïfs ($p = 0.36$) ou cliniciens ($p = 0.06$), témoignant de l'absence de restauration perceptive dans une évaluation basée sur des PM.

Discussion. Cette étude confirme la pertinence de l'utilisation de PM pour une évaluation plus fiable de la parole chez des patients traités pour un cancer de la CB ou l'OP : Une telle évaluation neutralise les processus de restauration linguistique connus pour perturber l'évaluation de l'intelligibilité (Warren, 1984) en contexte clinique. Au terme de ces premières analyses scientifiques, nos travaux portent à présent sur la possible réduction du nombre d'items pour adapter l'utilisation du test DAP au contexte clinique.

Bibliographie.

- Astésano, C., Balaguer, M., Farinas, J., Fredouille, C., Gaillard, P., Ghio, A., Giusti, L., Laaridh, I., Lalain, M., Lepage, B., Nocaudie, O., Pinquier, J., Pont, O., Pouchoulin, G., Robert, D., Sicard, E., & Woisard, V. (2018). *Carcinologic Speech Severity Index Project : A Database of Speech Disorder Productions to Assess Quality of Life Related to Speech After Cancer*. 7.
- Auzou, P., & Rolland-Monnoury, V. (2006). *Batterie d'évaluation clinique de la dysarthrie* (Ortho Edition, Vol. 2). ORTHO.
- Balaguer-Navarro, M. (2018). *Construction d'un score Carcinologic Speech Severity Index (C2SI) automatique* [Mémoire de Master 2 - Recherche - Santé publique - Epidémiologie clinique]. Paul Sabatier Toulouse III.
- Beukelman, D. R., & Yorkston, K. M. (1980). Influence of passage familiarity on intelligibility estimates of dysarthric speech. *Journal of Communication Disorders*, 13(1), 33-41. [https://doi.org/10.1016/0021-9924\(80\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0021-9924(80)90019-2)
- Warren, R. M. (1984). Perceptual restoration of obliterated sounds. *Psychological Bulletin*, 96(2), 371-383. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.96.2.371>
- Warren, R. M., Hainsworth, K. R., Brubaker, B. S., Bashford, J. A., & Healy, E. W. (1997). Spectral restoration of speech : Intelligibility is increased by inserting noise in spectral gaps. *Perception & Psychophysics*, 59(2), 275-283. <https://doi.org/10.3758/BF03211895>
- Yorkston, K. M., Dowden, P. A., & Beukelman, D. R. (1992). Intelligibility measurement as a tool in the clinical management of dysarthric speakers. *In Intelligibility in speech Disorders : Theory, measurement and management* (Raymond D. Kent, p. 265-286). John Benjamins Publishing Company. <https://benjamins.com/catalog/sspcl.1.08yor>

Abstract 125

Development of a novel anti-cancer strategy for Adrenocortical Carcinoma by nanovectorisation of microRNAs via Lipidots®

Soha REDA EL SAYED – 1^{ère} année de thèse 2018

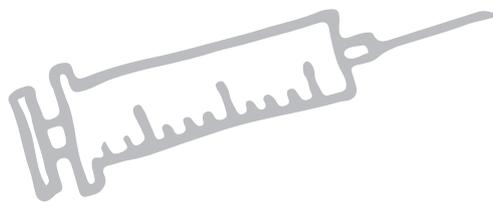
Soha Reda El Sayed¹, Adrien Nougarede², Josiane Denis¹, Laurent Guyon¹, Fabrice Navarro² and Nadia Cherradi*

1- University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, IRIG, Biology of Cancer and Infection Laboratory UMR_S 1036, F-38000 Grenoble

2-University Grenoble Alpes, CEA, LETI, F-38000 Grenoble, France

Abstract Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare endocrine malignancy associated with poor prognosis and unmet clinical needs. Although high-throughput molecular profiling has improved our knowledge of ACC genetics and its driver genes (CTNNB1, ZNRF3, TP53, Wnt, IGF2...), the disease pathogenesis is still unclear. Analysis of ACC microRNA (miRs) landscape revealed an aberrant microRNA expression in both tumors and patient serum. MicroRNAs are small non-coding RNAs of about twenty nucleotides that repress gene expression at the post-transcriptional level. Besides tumor-associated miR signatures, circulating miRs have emerged as promising diagnostic and prognostic biomarkers. We have demonstrated that overexpression of two miRs, miR-4835p and miR-139-5p is involved in ACC aggressiveness. Using bioinformatics predictions and transcriptomic data, we identified and validated N-myc downstream-regulated gene family members 2 and 4 (NDRG2 and NDRG4) as targets of miR-483-5p and miR-139-5p, respectively. We further demonstrated

that both NDRG2 and NDRG4 are markedly underexpressed in ACC and predictive of patient prognosis. Based on these results, our aims are (1), to identify the oncogenic pathways activated by miR-483-5p and miR-139-5p in ACC, and (2), to evaluate both miRs as therapeutic targets for ACC. Using PCR arrays and Antibody arrays dedicated to cancer hallmarks as well as functional analyses, we established that miR-483-5p and miR-139-5p activate MAP kinase p38 and Akt/mTOR signaling pathways. Moreover, both miRs induce expression of key players in epithelial-mesenchymal transition (EMT) process and extracellular matrix remodeling. Thus, our data suggest that miR-483-5p and miR-139-5p are potential therapeutic targets to prevent ACC invasion and progression. To test this hypothesis, we want to take advantage of the lipid nanoparticles named «Lipidots®» patented by the CEA LETI to vectorize inhibitors of our candidate miRs in pre-clinical ACC models. The physico-chemical properties of Lipidots® as well as their biocompatibility and their particular tropism for the adrenal cortex suggest that they could be relevant vectors for our cancer model. We have generated miR Inhibitors-Lipidots® nanoparticles and started to investigate their effects on the aggressive phenotype of ACC cell lines. This nanoparticle-mediated delivery of miR-inhibitors or miR-mimics could be extended to other cancers featuring miR deregulations.



Abstract 126

Rôle de Perlécane, protéine de la membrane basale, dans le signalisation inter-organe liée aux BMPs

Prune SMOLEN – 1^{ère} année de thèse 2018

CNRS UMR 7277 – Institut Biologie Valrose – Nice

Au cours du développement animal, les transitions développementales nécessitent que la croissance et la maturation de tous les organes soient coordonnées. Dans de nombreux organismes, ces transitions sont déclenchées par un axe neuroendocrinien, comme l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les mammifères. La façon dont cet axe neuroendocrinien perçoit le statut développemental des organes n'est pas encore connu.

Il a été récemment démontré chez la drosophile que l'orthologue de BMP2/4, Dpp, agit comme un signal inter-organe dans ce processus. Chez cet organisme, la transition développementale est caractérisée par la production d'une hormone stéroïdienne, l'ecdysone, au niveau d'une glande neuroendocrinienne, la « ring gland ». Ce pic d'ecdysone permet le passage de l'état larvaire à l'état pupal, on parle de métamorphose. Tout au long de la période larvaire, Dpp, produit par différents tissus, est sécrété dans l'hémolymphe (équivalent du sang). La réception de Dpp au niveau de la « ring gland » inhibe la production d'ecdysone, prévenant ainsi d'une métamorphose précoce. Néanmoins, lorsque tous les tissus périphériques atteignent leur maturité, Dpp cesse d'être sécrété dans l'hémolymphe permettant ainsi la synthèse d'ecdysone et donc la métamorphose (Setiawan et al, Life Si Alliance 2018). Notre hypothèse de travail vient d'une étude montrant que la membrane basale (MB) des tissus périphériques entrave la sécrétion du Dpp de ces tissus vers

l'hémolymphe (Ma et al, Dev. Cell. 2017). Parmi les composés de la MB, on retrouve Perlécane (Pcan), protéoglycane à chaînes de sulfate d'heparane capable de lier de nombreux facteurs de croissance tels que Hedgehog, WNT et BMP. Nos données indiquent que la perte de Pcan dans certains tissus périphériques de drosophile induit une hyper activation de la signalisation Dpp dans ces tissus. De plus, nous avons démontré que la signalisation Dpp induit une néotranscription de *pcan* à la fin de l'état larvaire, mettant en évidence l'existence d'une boucle de régulation *in vivo* entre Pcan et Dpp.

Nous proposons que l'augmentation de la production de Dpp au niveau des tissus périphériques durant la phase larvaire permet d'activer l'expression de *pcan* juste avant la métamorphose. En retour, Pcan induirait une rétention de Dpp, autorisant ainsi le déclenchement de la métamorphose.

Nous avons commencé à tester cette hypothèse et découvert que des animaux déplétés en Pcan présentent un retard important dans la survenue de la métamorphose. Nous montrons que ce retard est spécifique à la transition développementale larve-pupe et peut être corrigé en fournissant de l'ecdysone aux animaux mutants. Ce projet permettra d'approfondir nos connaissances sur les régulations inter-organes *in vivo* et sur le rôle de la MB dans ce processus.



Abstract 127

Origines de la létalité cellulaire consécutive à une dérégulation de la recombinaison homologoue dans les cellules humaines

Mélissa THOMAS – Doctorante en 3^e année de thèse (bourse Ligue contre le cancer)

Institut Cochin (Paris). U1016 UMR8104. Equipe SInG - Stabilité, Instabilité du Génôme.

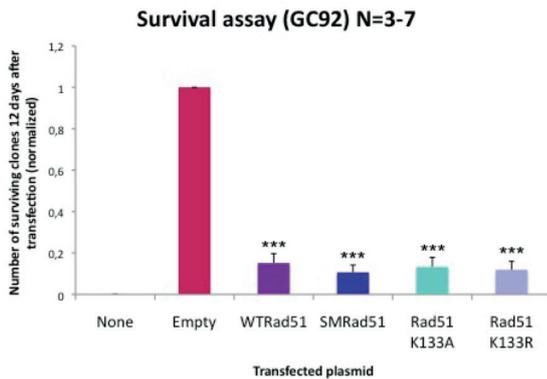
L'instabilité génétique est une des caractéristiques du cancer. Un défaut dans les systèmes de surveillance et de réparation de l'intégrité du génome prédispose à la formation de tumeurs et à leur progression.

Les cassures double brin (CDB) sont des lésions extrêmement toxiques dont la réparation peut donner lieu à des réarrangements chromosomiques. Il existe deux systèmes majoritaires de réparation des CDB dont la recombinaison homologoue (RH), qui permet de réparer ces CDB de manière fidèle. La RH protège également les fourches de réplication bloquée et permet le redémarrage de la réplication. Rad51 et BRCA2 sont les protéines pivots de la RH.

Des résultats préliminaires ont montré que l'inhibition de la RH par un dominant négatif de Rad51, ainsi que la surexpression de Rad51, est toxique dans des cellules humaines, bien qu'un faible nombre de cellules arrive à survivre.

Figure 1

Nombre de colonies survivantes, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle, 12 jours après transfection. SMRad51, Rad51 K133A et Rad51 K133R sont trois formes dominantes négatives de la Rad51 qui inhibent la RH.



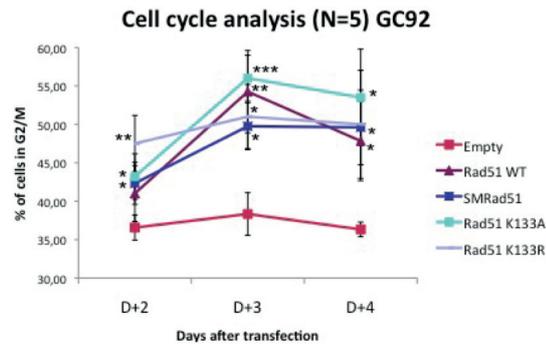
Les formes héréditaires du cancer du sein ou des ovaires sont majoritairement mutées dans BRCA2 ou BRCA1. Des mutations dans des gènes de la RH sont également retrouvées dans des cancers de la prostate, de l'estomac, du colon, du pancréas, des poumons, de la tête et du cou.

Ainsi, mon projet a pour but d'identifier les mécanismes et les causes de la létalité induite par une dérégulation de la RH dans les cellules humaines, ainsi que de comprendre comment certaines cellules arrivent à y survivre.

J'ai tout d'abord analysé les cycles cellulaires de cellules inhibées pour la RH, ou surexprimant Rad51. J'ai observé que les cellules s'accumulent en G2/M.

Figure 2

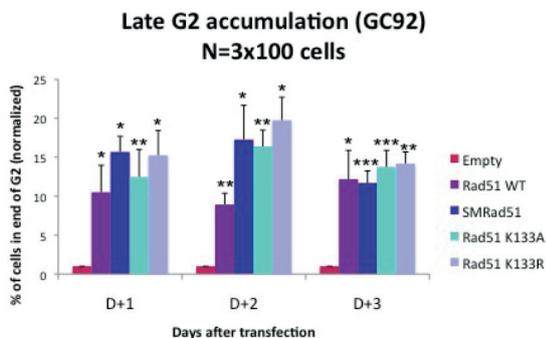
Pourcentage de cellules en G2/M. Les cellules sont marquées à l'iodure de propidium (IP) puis analysées au cytomètre de flux. Le marquage à l'IP permet de différencier les phases G1, S et G2/M.



L'immunofluorescence permet de distinguer spécifiquement la mitose de la fin de la phase G2 grâce au marquage de l'histone 3 phosphorylée sur la sérine 10 (H3PS10). Les cellules exprimant une forme de Rad51 s'accumulent en fin de G2.

Figure 3

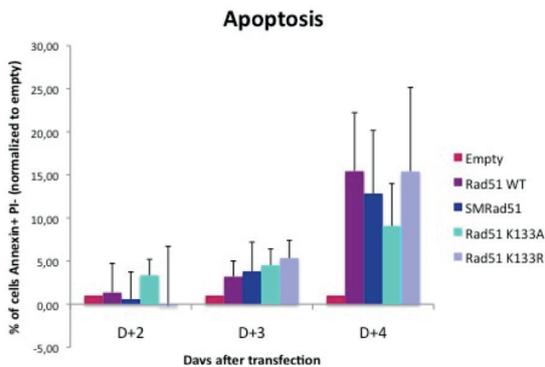
Pourcentage de cellules en fin de G2, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle. Les cellules en fin de G2 présentent un marquage H3PS10 ponctiforme et faible (Hendzel et al. 1997).



Des expériences de vidéomicroscopie (coll. O. Gavet, Institut Gustave Roussy) ont suggéré que les cellules transfectées par une des formes de Rad51 mourraient en apoptose. Des résultats préliminaires de mesure de la mort apoptotique par marquage Annexin-V semblent confirmer ce résultat.

Figure 4

Pourcentage de cellules apoptotiques, normalisé par rapport au plasmide vide contrôle.



Je propose que dans les cellules déficientes en RH, une accumulation de fourches de réplication bloquées provoquerait une forte augmentation du stress réplicatif. La surexpression du Rad51 WT entrainerait une accumulation toxique d'intermédiaires de recombinaison, qui saturerait les systèmes de traitement de ces intermédiaires.

Pour valider cette première hypothèse, j'analyse la dynamique de réplication par peignage moléculaire (coll. M. Debatisse, Institut Gustave Roussy).

Les premières observations semblent indiquer que les cellules transfectées par une des formes de Rad51 ont une réplication ralentie.

Je testerai ma seconde hypothèse en mesurant la quantité d'intermédiaires de recombinaison grâce à la technique d'électrophorèse en gel 2D (coll. S. Lambert, Institut Curie - Orsay)

Les tumeurs dérégulées pour les protéines de la RH ont nécessairement développé des mécanismes ou des mutations permettant la survie et la prolifération de ces cellules.

Des analyses in-silico ont permis d'établir une liste de gènes candidats, qui sont co-mutés de manière significative dans les cancers BRCA1/2. Ces gènes jouent un rôle soit au niveau des fourches de réplication, soit au niveau du checkpoint G2/M.

Les résultats de séquençages de fibroblastes primaires de patients FANCD1 ainsi que les résultats d'un crible haut débit de banque shARN viendront étoffer cette liste (coll. R. Veitia, Institut Jacques Monod).

Abstract 128

Immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie des tumeurs cérébrales pédiatriques

Pauline THOMAS – U1232 Centre de Recherche en Cancérologie-Immunologie Nantes-Angers

Equipe 14 « Plasticité de l'Ecosystème Tumoral après Radiothérapie et Immunothérapie » 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes

Contexte et objectif : Les tumeurs cérébrales sont les tumeurs solides les plus fréquentes de l'enfant et la principale cause de décès par cancer. Celles-ci incluent les gliomes de haut grade, les épépendymomes et les tumeurs embryonnaires telles que les médulloblastomes et les tumeurs térétoïdes rhabdoïdes atypiques. Certaines d'entre elles infiltrant le tissu cérébral et sont donc inopérables. Le seul recours reste la radiothérapie, mais sans bons résultats. De nombreux essais thérapeutiques associant d'autres traitements comme la chimiothérapie n'ont pas permis d'amélioration substantielle. De plus, ces protocoles de radiothérapie sont copiés sur ceux utilisés chez les adultes et ont des effets délétères sur le développement cérébral. Il n'existe actuellement aucun traitement conçu spécifiquement pour les populations pédiatriques. Afin de palier à ce manque et d'améliorer le pronostic et la qualité de vie de ces patients, il est nécessaire de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous développons une approche combinant la radiothérapie et une immunothérapie T-CAR. Cette dernière consiste à prélever puis à réinjecter des lymphocytes autologues après les avoir modifiés par thérapie génique afin d'induire l'expression d'un récepteur chimérique à l'antigène (CAR). Le CAR permet aux lymphocytes T de reconnaître l'antigène sans qu'il soit présenté par les molécules du CMH et de détruire les cellules cancéreuses. Dans ce contexte, un antigène cible exprimé spécifiquement par les cellules cancéreuses cérébrale

a été identifié dans nos laboratoires ; le ganglioside GD2 O-acétylé (GD2OAc). Ces types d'immunothérapie ont montré leur efficacité dans le traitement des leucémies réfractaires à la chimiothérapie, mais elle doit être optimisée dans le cadre des tumeurs solides afin de prendre en compte le microenvironnement vasculaire et immunitaire de ces tumeurs et l'impact de la radiothérapie avant la mise en place d'essais cliniques. Le projet vise à établir la preuve de concept de l'efficacité de la radiothérapie associée aux lymphocytes T-CAR anti-GD2OAc.

Méthodes : Nous allons montrer l'efficacité de la combinaison de ces deux thérapeutiques sur des modèles d'organoïdes développés à partir de cellules de patients, ainsi que sur des modèles orthotopiques de xéno greffe de tumeurs cérébrales de l'enfant. La texture immunitaire (acteurs cellulaires et moléculaires) du microenvironnement tumoral sera évaluée par cytométrie en flux multicolore. Les lymphocytes T-CAR seront préparés au laboratoire et les irradiations seront réalisées à l'aide d'un irradiateur guidé par l'image pour le petit animal. L'efficacité anti-tumorale sera mesurée après l'administration de ces thérapies.

Résultats attendus : Les premiers résultats que nous acquerrons permettront d'optimiser les conditions d'irradiations à utiliser afin d'obtenir un effet immunomodulateur favorable à l'efficacité des lymphocytes T-CAR. Les résultats suivants fourniront la preuve de concept de l'efficacité de l'immunothérapie T-CAR combinée à la radiothérapie.

Notes

Notes

Jeunes & Chercheurs

