

TITRE DU PROJET : Fonctions immunosuppressives et protumorales d'HSP110

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : JEGO

Prénom : Gaëtan

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : JACQUIN

Prénom : Elise

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

Inserm U1231 "Center for Translational and Molecular Medicine", Equipe "HSP-Pathies"

UFR des Sciences de Santé, uB, 7 Bd Jeanne d'Arc 21000 DIJON

Directeur de thèse : Pr Gaëtan JEGO (HDR), gaetan.jego@u-bourgogne.fr

Co-directeur de thèse : Dr Elise JACQUIN, elise.jacquin@u-bourgogne.fr

Fonctions immunosuppressives et protumorales d'HSP110

Au centre des thématiques de recherche de l'équipe HSP-Pathies depuis de nombreuses années, les protéines de choc thermique (HSP pour *Heat Shock Proteins*) HSP70 et HSP110 sont reconnues comme des protéines chaperonnes aux propriétés protumorales. Si le rôle d'HSP110 dans la progression tumorale est moins étudié que celui d'HSP70, des publications récentes semblent la faire émerger comme une cible thérapeutique, voire théranostique, pertinente. La protéine HSP110 est surexprimée dans de nombreux cancers tels que les mélanomes, les cancers du sein, les cancers colorectaux (CRC) ou encore les lymphomes. Dans les CRC, une surexpression d'HSP110 a été associée avec la progression tumorale et la présence de métastases, suggérant qu'elle pourrait constituer un marqueur de mauvais pronostic. Par ailleurs, des travaux antérieurs de l'équipe du Dr Garrido ont montré qu'une mutation du gène codant HSP110 résultant en l'expression d'un dominant-négatif d'HSP110 chez les patients atteints d'un CRC MSI (pour *Microsatellite Instability*) est associée à une sensibilité accrue à la chimiothérapie (5-FU, Oxaliplatine) et à une survie accrue des patients. Ainsi, l'inhibition d'HSP110 est une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers comme l'attestent les travaux du laboratoire. Le rôle pro-tumoral d'HSP110 peut à la fois s'expliquer par ses fonctions intrinsèques aux cellules cancéreuses telles que son action anti-apoptotique ; la stimulation de la prolifération cellulaire suite à l'activation de voies de signalisation impliquant STAT3, Myd88 et NFκB ou encore Wtn/β-Catenin ; son rôle nucléaire dans la réparation de l'ADN; ainsi que par ses fonctions extracellulaires, **en particulier son action immunomodulatrice**. En effet, des travaux antérieurs du laboratoire et d'un autre groupe montrent que les protéines HSP110 délivrées dans le milieu extracellulaire par les cellules cancéreuses (libres ou dans des exosomes) orientent la polarisation de cellules myéloïdes (TAM pour *Tumor-Associated Macrophages* et cellules dendritiques) vers un profil pro-tumoral. Par ailleurs, la combinaison d'un inhibiteur d'HSP110 avec des anticorps monoclonaux ciblant PD-L1 chez des souris porteuses de

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

tumeurs colorectales CT26 présente une efficacité thérapeutique supérieure à celle des mono-traitements, suggérant qu'il pourrait être intéressant de coupler l'inhibition d'HSP110 aux stratégies d'immunothérapies actuelles et que sa capacité à sensibiliser des tumeurs aux inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire tels que des anti-PD-L1 mérite d'être explorée.

Ainsi, le premier axe de ce projet de thèse vise à mieux comprendre le rôle d'HSP110 dans les réponses immunitaires dirigées contre les tumeurs colorectales. Grâce à la technique d'édition du génome CRISPR-Cas9, des cellules cancéreuses colorectales murines et humaines déficientes en HSP110 seront générées. Après caractérisation, ces modèles HSP110 KO seront utilisés pour élucider de nouvelles fonctions extracellulaires d'HSP110.

Les cellules cancéreuses murines WT et HSP110 KO (modèles MC38 et CT26) permettront la réalisation d'expériences de croissance tumorale chez des souris immunocompétentes (C57BL/6 et BALB/c respectivement), la croissance tumorale devant s'avérer réduite chez les souris porteuses de tumeurs HSP110 KO d'après les précédents travaux décrits ci-dessus. Une comparaison de la croissance tumorale et de la survie entre souris immunodéficientes et immunocompétentes permettra d'évaluer l'amplitude de la contribution du système immunitaire dans les fonctions pro-tumorales d'HSP110 qui reste encore peu étudiée *in vivo*. Nous explorerons ces questions par le biais de l'immunophénotypage du microenvironnement des tumeurs (TME pour *Tumor MicroEnvironment*) HSP110 WT et HSP110 KO par cytométrie en flux spectrale multiparamétrique (Aurora, Cytek), une technologie proposée par la plateforme de cytométrie de Dijon. Nous quantifierons ainsi la proportion des différentes cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (TAM, MDSCs pour *Meloid-Derived Suppressive Cells*, lymphocytes T helpers, cytotoxiques et régulateurs (Tregs), cellules NK pour *Natural Killer*) ainsi que leur fonctionnalité. Une analyse fine du TME par single-cell RNAseq sera réalisée pour identifier les changements transcriptionnels induits par HSP110 extracellulaire dans les différentes populations de cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Nous nous intéresserons aussi au niveau d'expression membranaire de PD-L1 dans les cellules tumorales et les cellules myéloïdes isolées à partir du TME pour déterminer si HSP110 module l'expression de ce point de contrôle du système immunitaire comme suggéré par les travaux du laboratoire.

Le traitement de souris porteuses de tumeurs par injection intraveineuse ou intratumorale d'exosomes dérivés de cellules cancéreuses HSP110 WT ou KO permettra de spécifier le rôle d'HSP110 exosomale et nous testerons si l'administration d'inhibiteurs d'HSP110 comme agents thérapeutiques reproduit l'impact d'une délétion d'HSP110 *in vivo*.

Ces travaux seront complétés par des approches *ex vivo* à l'aide de cellules immunitaires primaires murines et humaines cultivées en présence ou non de surnageants de culture de cellules cancéreuses murines (ex : MC38, CT26) ou humaines (ex : HCT116, SW620) respectivement. Nous évaluerons ainsi l'action directe d'HSP110 extracellulaire sur :

- l'activation, la prolifération et la polarisation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ;
- la polarisation de cellules myéloïdes. Nous approfondirons ainsi les travaux antérieurs du Dr Jegou en combinant des approches de cytométrie en flux, cytokines arrays et RTqPCR.
- les capacités de phagocytose et de présentation antigénique de ces cellules myéloïdes ainsi que leur capacité à activer la prolifération et les fonctions effectrices de lymphocytes T CD8⁺.

Ces données permettront une meilleure compréhension du rôle d'HSP110 dans les réponses immunitaires antitumorales dirigées contre les CRC.

Le second axe de travail, qui pourra être réalisé en parallèle, s'attachera à étudier les liens entre HSP110 et les différentes formes d'autophagie. La libération des HSP dans le milieu extracellulaire ne fait pas intervenir la voie de sécrétion conventionnelle mais pourrait impliquer des voies de sécrétion dépendantes des lysosomes et de la protéine de l'autophagie LC3, similaires à celles impliquées dans la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . L'expertise du Dr Jacquin dans le domaine de l'autophagie, permettra l'étude du **rôle potentiel des protéines de l'autophagie dans la libération d'HSP110 dans le milieu extracellulaire**, sous forme soluble ou associée à des exosomes. Nous disposons pour cela de modèles cellulaires déficients pour différentes protéines de l'autophagie et des outils CRISPR-Cas9 nécessaires à la génération de nouveaux modèles.

Nous nous intéresserons aussi au **rôle des protéines de l'autophagie sur les conséquences de la liaison d'HSP110 à ses récepteurs membranaires**, les TLR2/4 (pour *Toll-Like Receptors*) exprimés par ses cellules immunitaires cibles. L'activation de ces récepteurs TLR par leurs ligands a été décrite comme un inducteur de la CASM (pour *Conjugation of Atg8 to Single Membranes*), un processus impliquant l'activité non conventionnelle de protéines de l'autophagie étudié par le Dr Jacquin

depuis 2014. Ainsi, nous **étudierons la capacité d'HSP110 extracellulaire à induire la CASM** dans les cellules immunitaires innées. Pour cela, nous stimulerons des macrophages compétents et incompetents pour la CASM disponibles au laboratoire avec la protéine HSP110 recombinante soluble ou immobilisée sur des billes de latex pour favoriser sa phagocytose, ainsi qu'avec des exosomes issus de cellules cancéreuses exprimant ou non HSP110. La lipidation de la protéine LC3 sera alors mesurée par western-blot et immunofluorescence afin de déterminer si HSP110 extracellulaire stimule la CASM. Nous préciserons alors le rôle des TLR grâce à des anticorps bloquants et nous nous intéresserons à **l'impact de la CASM induite par HSP110 extracellulaire sur sa capacité à moduler les réponses immunitaires antitumorales**. Nous évaluerons la polarisation des macrophages compétents et incompetents pour la CASM vers un profil tolérogène et pro-tumoral suite à leur stimulation par HSP110 ainsi que leurs capacités de phagocytose et de présentation antigénique en combinant des approches similaires à celles décrites dans l'axe 1. Leur capacité à stimuler la prolifération et l'activité cytotoxique de lymphocytes T CD8⁺ sera aussi étudiée. L'obtention du modèle murin d'inactivation de la CASM généré par notre collaborateur, le Dr Florey (The Babraham Institute, Cambridge, UK) nous permettra non seulement d'étendre ces travaux à des cellules dendritiques primaires mais aussi de tester leur pertinence *in vivo* grâce à l'implantation à ces souris de cellules cancéreuses HSP110 WT ou KO (Axe 1). Nous évaluerons ainsi l'impact de la CASM sur la modulation des réponses immunitaires antitumorales par HSP110 et déterminerons ainsi si cibler cette voie de signalisation peut limiter l'action protumorale de cette HSP.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

Ce projet de recherche bénéficie d'un environnement humain et scientifique favorable à son bon déroulement, grâce à une collaboration étroite et complémentaire entre les membres de l'équipe HSP-Pathies, la plateforme ImaFlow et le centre de zootechnie de l'uB.

Il bénéficie du financement récurrent Inserm et de l'uB, d'un BQR apporté par l'uB (4000 euros) ; d'une aide à l'installation du Dr Elise Jacquin apportée par la Ligue contre le Cancer de Côte-d'Or (25 000 euros), ainsi que le financement INCA PLBIO2022-093 (600 000 euros) qui concerne HSP110.

- Connaissances et compétences requises

Le/la candidat(e) devra posséder de solides connaissances en biologie et signalisation cellulaire ainsi qu'en immuno-oncologie. Il/elle devra maîtriser les techniques les plus usitées telles que la culture cellulaire, l'immunoblotting, l'immunofluorescence, et les techniques classiques de biologie moléculaire et l'édition du génome par CRISPR/Cas9. Une expérience en cytométrie en flux et en expérimentation animale seront des atouts supplémentaires.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Surexprimée dans de nombreux cancers dont les cancers colorectaux, la protéine de choc thermique HSP110 (*Heat Shock Protein*) apparaît comme un marqueur de mauvais pronostic et une cible thérapeutique pertinente. Ses effets protumoraux peuvent à la fois s'expliquer par ses fonctions intrinsèques aux cellules et par ses fonctions extracellulaires, en particulier son action immunosuppressive. En effet, des travaux antérieurs du laboratoire montrent que les protéines HSP110 délivrées dans le milieu extracellulaire par les cellules cancéreuses orientent la polarisation de cellules immunitaires innées vers un profil pro-tumoral. Ainsi, ce projet de thèse vise à mieux comprendre le rôle d'HSP110 dans les réponses immunitaires dirigées contre les tumeurs colorectales. Ce travail consistera à caractériser l'impact d'HSP110 sur l'infiltration et la fonctionnalité des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs grâce à des modèles précliniques et à identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents par des expériences complémentaires menées *ex vivo*. Parallèlement, nous nous intéresserons à la contribution des protéines de l'autophagie dans l'action protumorale d'HSP110 extracellulaire. En effet, l'autophagie pourrait intervenir dans la sécrétion d'HSP110 et certaines protéines de l'autophagie pourraient, au travers de leur action non conventionnelle lors du processus de CASM (*Conjugation of Atg8 to Single Membranes*), être impliquées dans les réponses des cellules immunitaires cibles d'HSP110. En élucidant les mécanismes d'action d'HSP110 sur les réponses immunitaires antitumorales, nous pourrions établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les traitements par immunothérapie utilisés actuellement en clinique.

The large heat shock protein of 110 kDa (HSP110) is overexpressed in many cancers including colorectal cancers (CRC) and is considered as a poor prognosis marker and a relevant therapeutic target. HSP110's protumor effects are associated with both intracellular functions, including its chaperone role, and extracellular activity. HSP110 is indeed secreted in the extracellular compartment and exerts immunosuppressive functions by stimulating the polarization of innate immune cells towards a tolerogenic and protumoral profile. This PhD thesis project aims at deciphering the role of HSP110 in immune responses against CRC. This work will consist in characterizing the impact of HSP110 on immune cell recruitment and functionality in the tumor microenvironment using preclinical models of tumor growth in mice. Underlying mechanisms will be further assessed by complementary *ex vivo* and *in vitro* experiments. We will also test the role of autophagy proteins in HSP110 protumoral activity. While autophagy could be involved in HSP110 secretion, the unconventional activity of some autophagy proteins during CASM (*Conjugation of Atg8 to Single Membranes*) could mediate the effect of extracellular HSP110 on its target immune cells. By elucidating how HSP110 restrains antitumor immune responses, we hope to determine new therapeutic approaches to improve current anticancer immunotherapies.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biologie - Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : HSP, immunité anti-tumorale, autophagie, CASM