

TITRE DU PROJET : Rôle des vésicules extracellulaires produites par une tumeur sur la vascularisation dans la niche tumorale et le blocage de l'immunité antitumorale

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : Quéré

Prénom : Ronan

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

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu)

Inserm UMR1231,

Équipe HSP-pathies (Carmen Garrido)

- localisation

Université de Médecine et de Pharmacie

7 bd Jeanne d'Arc,

21000 DIJON

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu

Ronan Quéré, PhD, HDR

- adresse courriel du contact scientifique

ronan.quere@inserm.fr

- description du projet (2 pages maximum)

Rôle des vésicules extracellulaires (VEs) sur l'angiogenèse et l'immunité antitumorale, lien avec le stress cellulaire. Les lymphomes représentent plus de 50% de tous les cancers du sang et font partie des hémopathies malignes car ils dérivent des cellules hématopoïétiques. Ce sont des cancers du système lymphatique, qui émergent des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses digestives ou respiratoires). Ils peuvent s'étendre à d'autres organes, tels que la moelle osseuse, la rate, le thymus, les ganglions et les vaisseaux lymphatiques. En général, le développement d'un cancer est dû à des dérèglements au niveau des gènes contrôlant le cycle cellulaire, entraînant notamment une prolifération incontrôlée des cellules et leur résistance à la mort. Dans le cas des lymphomes, les cellules concernées sont les lymphocytes et leurs précurseurs. Les VEs sont de petites particules cargo contenant du cytosol et composées d'une bicouche lipidique dérivant de la membrane plasmique. Elles peuvent être libérées dans l'espace extracellulaire par n'importe quel type de cellule et contiennent diverses molécules telles que de l'ARN, de l'ADN, diverses protéines et lipides, des facteurs de transcription, des cytokines et des facteurs de croissance. La formation du cargo n'est pas aléatoire mais est un processus finement contrôlé. Son contenu dépend fortement de l'état et du type de la cellule donneuse. L'angiogenèse, processus normal de

vascularisation des tissus par formation de néovaisseaux à partir de capillaires existants, est utilisée par la tumeur pour subvenir à ses besoins métaboliques en nutriments et oxygène, ainsi que pour gérer les déchets, et peut également faciliter le processus métastatique. Les VEs dérivées de tumeurs peuvent influencer le microenvironnement tumoral en modifiant les fonctions des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins présents dans la tumeur.

Dans le laboratoire d'accueil, nous avons montré que des cellules cancéreuses pouvaient produire des VEs qui ciblent des cellules saines de l'organisme, compromettant ainsi leurs fonctions et leur homéostasie (Georgievski et al., Cell Death and Disease, 2022 ; Gautheron et al., Cell Death and Discovery, 2023). Dans un modèle d'étude in vitro sur des lignées cellulaires, nous avons également démontré que les VEs produites par les cellules tumorales peuvent promouvoir l'angiogenèse et accélérer la migration des cellules endothéliales. Ces modifications favoriseraient la formation d'un environnement propice au développement et à la croissance de la tumeur. Enfin, les cellules immunitaires de l'organisme peuvent pénétrer par diapédèse à travers la paroi endothéliale au sein d'une tumeur, depuis des organes périphériques tels que la rate et les ganglions, via le sang. Les VEs des cellules tumorales peuvent cibler et impacter les cellules immunitaires saines du microenvironnement tumoral. En utilisant un modèle d'étude in vitro basé sur des inserts de culture cellulaire, des travaux préliminaires dans notre équipe ont montré que les VEs produites par les cellules tumorales peuvent cibler les cellules immunitaires ; essentiellement les lymphocytes T, B, les cellules dendritiques et les macrophages associés aux tumeurs (TAM), réduisant ainsi leur nombre et leur passage à travers la couche de cellules endothéliales. Ainsi leur ciblage par les VEs pourrait constituer un mécanisme de défense de la tumeur afin de réduire l'immunité antitumorale.

Méthodes expérimentales : Nous avons développé dans l'équipe un modèle murin d'étude du développement du lymphome, offrant la possibilité de mener des expérimentations à la fois in vitro et in vivo. (i) En utilisant des inserts de culture cellulaire (TransWell), nous pouvons étudier la migration des cellules immunitaires à travers une couche de cellules endothéliales cultivées sur une coupelle contenant un filtre, afin de représenter la barrière endothéliale. Les cellules immunitaires isolées de la rate d'une souris développant le lymphome peuvent être déposées dans la partie supérieure de la coupelle (mimant la circulation sanguine), tandis que les cellules EL4 ou les VEs produites par ces cellules EL4, purifiées et dosées in vitro, peuvent être déposées dans la partie inférieure (zone tumorale). (ii) En outre, les cellules cancéreuses EL4 peuvent être administrées, en sous-cutané, au niveau du flanc des souris congéniques C57BL/6, qui développeront une tumeur en quelques jours. Il est possible d'administrer de nouvelles molécules thérapeutiques aux souris, telles que des inhibiteurs de la production de VEs, afin d'étudier le rôle de ces vésicules sur la vascularisation et le blocage de l'immunité antitumorale dans la niche tumorale in vivo.

Projet de recherche :

A- Rôle des VEs sur la vascularisation tumorale. Le projet vise à approfondir le rôle des VEs sur la croissance des cellules endothéliales in vitro, en étudiant leurs effets sur le métabolisme, la croissance, la morphologie et les voies de signalisation des cellules endothéliales, ainsi que sur l'expression des intégrines et des récepteurs à la surface cellulaire impliqués dans la diapédèse. Le candidat utilisera des outils de cytométrie en flux et de microscopie, ainsi qu'un analyseur du métabolisme (SeaHorse) pour étudier la respiration mitochondriale et les taux de consommation d'oxygène et d'acidification extracellulaire. Une étude protéomique permettra également de préciser les effets des VEs sur l'expression de protéines spécifiques, notamment les protéines de choc thermique (HSP ; heat shock proteins) impliquées dans la réponse au stress. Nous avons aussi prévu

d'analyser le contenu des VEs par des études de protéomique afin d'identifier les protéines cargos responsables de l'accélération de la vascularisation.

B- Impact des VEs sur l'immunité antitumorale. Les résultats de notre équipe suggèrent que la production de VEs par les cellules tumorales pourrait bloquer in vivo le passage des cellules immunitaires à effet antitumoral du sang vers la tumeur. Le candidat validera cette hypothèse en utilisant des VEs exprimant un marqueur fluorescent vert sur des inserts de culture cellulaire pour confirmer que ces populations de l'immunité ciblées captent bien les VEs. L'analyse de cette capture se fera par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Étant donné que certaines de ces populations peuvent phagocyter les microorganismes et que les VEs sont des nanoparticules biologiques, il sera alors intéressant d'étudier le mécanisme de capture des VEs par ces populations de cellules immunitaires. La capture des VEs issues des cellules cancéreuses pourrait engendrer un stress aux cellules immunitaires ciblées. Par conséquent, il est prévu d'étudier l'effet de cette capture sur la mort cellulaire et l'apoptose des populations immunitaires ciblées, ainsi que sur la perte de l'expression des marqueurs d'activation spécifiques (pour les lymphocytes) par cytométrie en flux. Avec des tests ELISA, la perte de la capacité de production de cytokines et de chimiokines sera étudiée suite au traitement des cellules immunitaires avec les VEs. Il est prévu d'étudier la perte d'activité des Lymphocyte T4 et T8 sur leur capacité à inhiber les cellules cancéreuses.

C- Développement de nouvelles thérapies. Des inhibiteurs de la production de VEs, tels que la calpeptine, peuvent être injectés in vivo. L'un des objectifs importants de la thèse sera d'administrer cet inhibiteur aux souris développant un lymphome avec les cellules EL4. Il est alors prévu d'étudier l'effet bénéfique de cet inhibiteur sur la réduction de la vascularisation dans la tumeur in vivo et sur l'augmentation de la présence des cellules immunitaires dans la tumeur. Des essais thérapeutiques précliniques sur notre modèle murin EL4, avec la calpeptine administrée seule, ou associée à la chimiothérapie et à l'immunothérapie (anti-PD1), sont envisagés.

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

Association Enfants Cancers Santé : 40,000 euros, pour le fonctionnement (porteur du projet : Ronan Quéré). Association Contre le Cancer (ARC) : 50,000 euros, pour le fonctionnement (porteur du projet : Ronan Quéré).

- connaissances et compétences requises

Le (la) candidat(e) doit souhaiter travailler sur des modèles murins, la formation de niveau 1 en expérimentation animale se fera au cours de la 1^{ière} année de thèse. Il (elle) devra avoir des connaissances dans l'étude des voies signalétiques du cancer et plus particulièrement en hématologie. Il (elle) doit avoir effectué déjà un stage de Master dans le domaine de la biologie moléculaire et/ou cellulaire, avoir des connaissances en cytométrie en flux.

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

Résumé en français

Les lymphomes, constituants majeurs des cancers sanguins, émanent de cellules hématopoïétiques, résultant d'anomalies génétiques induisant une prolifération cellulaire incontrôlée. Les vésicules extracellulaires (VEs), émises par diverses cellules, jouent un rôle crucial dans la communication intercellulaire en transportant des molécules telles que des ARN, des protéines et des lipides. Dans le contexte tumoral, les VEs produites par les cellules cancéreuses influencent le microenvironnement, favorisant la progression tumorale en modifiant les fonctions des cellules endothéliales, promouvant l'angiogenèse et facilitant la

migration cellulaire. De plus, elles altèrent les interactions entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales, compromettant ainsi la réponse immunitaire antitumorale. Les expériences in vitro, utilisant des inserts de culture cellulaire, permettent d'analyser la migration des cellules immunitaires à travers une barrière endothéliale, tandis que les études in vivo sur des souris implantées avec des cellules tumorales offrent un moyen de comprendre l'impact des VEs sur la progression tumorale et la réponse immunitaire. Le projet de recherche vise à approfondir la compréhension du rôle des VEs dans les lymphomes. D'abord, une étude approfondie de l'impact des VEs sur la vascularisation tumorale sera menée, analysant leurs effets sur la croissance vasculaire, la morphologie cellulaire et les voies de signalisation liées au stress. Ensuite, l'effet des VEs sur l'immunité antitumorale sera investigué pour comprendre comment ces vésicules compromettent la fonction des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes, et inhibent la réponse immunitaire antitumorale. Enfin, le développement de nouvelles thérapies ciblant les VEs sera exploré, utilisant des inhibiteurs de leur production pour bloquer leur action dans le microenvironnement tumoral. Ce projet de recherche vise à approfondir la compréhension du rôle des VEs dans les lymphomes et à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Résumé en anglais

Lymphomas, major constituents of blood cancers, originate from hematopoietic cells, resulting from genetic abnormalities inducing uncontrolled cell proliferation. Extracellular vesicles (EVs), emitted by various cells, play a crucial role in intercellular communication by transporting molecules such as RNA, proteins, and lipids. In the tumoral context, EVs produced by cancer cells influence the microenvironment, promoting tumor progression by altering endothelial cell functions, promoting angiogenesis, and facilitating cell migration. Moreover, they alter interactions between immune cells and tumor cells, compromising the anti-tumor immune response. In vitro experiments, using cell culture inserts, allow analysis of immune cell migration through an endothelial barrier, while in vivo studies on mice implanted with tumor cells provide insight into the impact of EVs on tumor progression and immune response. The research project aims to deepen understanding of EVs' role in lymphomas. Firstly, a thorough study of EVs' impact on tumor vascularization will be conducted, analyzing their effects on vascular growth, cellular morphology, and stress-related signaling pathways. Secondly, the effect of EVs on anti-tumor immunity will be investigated to understand how these vesicles compromise immune cell function, such as lymphocytes, and inhibit the anti-tumor immune response. Finally, the development of new therapies targeting EVs will be explored, using inhibitors of their production to block their action in the tumor microenvironment. This research project aims to deepen understanding of EVs' role in lymphomas and identify new therapeutic strategies.

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 :

Cancer, lymphome, vésicules extracellulaires, stress, heat shock proteins, immunité anti tumoral, vascularisation, thérapie, modèle murin, étude préclinique.