

TITRE DU PROJET :

Dynamique de la chromatine dans l'hématopoïèse et la lymphomagenèse ; vers l'identification de nouveaux mécanismes YTHDC1-dépendants d'intérêt physiopathologique et thérapeutique

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : **ROSSI**

Prénom : **Cédric**

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : **CALLANAN**

Prénom : **Mary**

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)

UMR 1231 Inserm/Université de Bourgogne CTM (*Center for Translational and Molecular medicine*)

Directeur : François Ghiringhelli

Équipe Epi2THM (*Epigenetics, epidemiology and personalized treatment in hematological malignancies*)

Responsable : Mary Callanan

- localisation

UMR 1231 Inserm, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, 7 bd Jeanne d'Arc, 21079 DIJON Cedex

- nom du directeur de thèse et du co-directeur

Directeur : Pr. Cédric Rossi ; Co-Directeur : Pr. Mary Callanan

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.

- adresse courriel du contact scientifique

mary.callanan@u-bourgogne.fr
cedric.rossi66@gmail.com

- description du projet (2 pages maximum)

Contexte de l'étude

Chez l'adulte, l'établissement et le maintien des cellules sanguines sont régis par l'hématopoïèse. Celle-ci est finement régulée par des mécanismes génétiques, épigénétiques et épitranscriptomiques modulant l'expression des gènes nécessaires au développement et à la différenciation des cellules sanguines. Des perturbations au niveau de ces réseaux de régulation étant fréquemment associées au développement tumoral, il est important de les caractériser pour mettre en évidence les acteurs moléculaires impliqués dans les hémopathies malignes.

L'information épigénétique, codée par des modifications chimiques de l'ARN nucléaire, de l'ADN et des histones ainsi que par l'organisation structurale de la chromatine, contrôle la fonction du génome indépendamment de la séquence d'ADN. Ces marques épigénétiques sont induites par des enzymes « writers », reconnues par des « readers » et effacées par des « erasers ». Ces mécanismes étant potentiellement réversibles, leur exploration est un sujet d'étude majeur en oncologie. Une nouvelle piste d'investigation dans le domaine de l'épigénétique des cancers concerne la régulation épigénétique dépendante de l'ARN, en particulier l'étude du rôle des régulateurs ARN-guidés de l'organisation chromatinienne. Notre équipe s'intéresse à l'un d'entre eux, le facteur YTHDC1, un « lecteur » épigénétique qui reconnaît la marque N6-méthyladénosine (m6A) des ARN et qui est impliqué dans l'assemblage d'un compartiment chromatinien silencieux – l'hétérochromatine – et ainsi dans le silencing stable des gènes et des éléments répétés au cours du développement et dans la différenciation cellulaire. Le facteur YTHDC1 semblent agir dans l'assemblage de la l'hétérochromatine en équilibre avec d'autres facteurs, notamment de la famille des PRMT (Arginine méthyltransférase) suggérant un lien entre ces voies de signalisation au niveau de la chromatine.

L'identification par séquençage d'exome, d'une mutation somatique clonale perte de fonction, YTHDC1 S458*, chez un patient atteint d'un lymphome à cellules du manteau (LCM) hautement réfractaire aux traitements, couplée à la découverte de perturbations importantes de l'expression de YTHDC1 dans les LCM et dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) nous conduit à penser que la dérégulation fonctionnelle de YTHDC1 correspond à un nouveau mécanisme d'intérêt physiopathologique et thérapeutique dans les lymphomes agressifs.

Un criblage supplémentaire sur les exomes de patients atteints de LBDGC a permis d'identifier 16 autres mutations somatiques de YTHDC1, ainsi qu'une dérégulation de son expression génique associée à un pronostic défavorable dans les LBDGC du sous-type ABC. Des analyses immunohistochimiques ont confirmé l'hétérogénéité d'expression de YTHDC1 dans un groupe de patient atteints de LCM et de LBDGC. Nous avons également constaté que l'expression du mutant YTHDC1 S458* entraîne une mauvaise localisation/expression de YTHDC1 sauvage, suggérant un mécanisme de dominance négative.

Des expériences d'inactivation par CRISPR-Cas9 dans la lignée cellulaire Jeko-1 (LCM) ont révélé que YTHDC1 est un gène essentiel. Les analyses RNA-seq dans ces cellules YTHDC1 KO ont montré l'engagement de multiples voies de signalisation importantes pour la biologie des lymphomes. Conformément à la pertinence fonctionnelle de ces résultats, des essais de xéno greffes (injection dans la veine de la queue) ont révélé une migration accrue des cellules JeKo-1 déficientes en YTHDC1 vers les ganglions lymphatiques, suggérant un effet pro-tumoral d'une faible expression de YTHDC1 dans ce modèle.

Dans l'ensemble, nos découvertes pointent vers un nouveau mécanisme physiopathologique dans les lymphomes agressifs, mettant en évidence le rôle potentiel de l'altération de la fonction de YTHDC1 (par mutation ou dosage génétique) en tant que moteur de la maladie. Ces résultats suggèrent également que YTHDC1 pourrait avoir une valeur de biomarqueur prometteuse pour les approches de médecine de précision dans ces lymphomes à cellules B.

Projet de recherche

Nous estimons que YTHDC1 représente un acteur clef du contrôle de l'hématopoïèse et que son dérèglement peut induire ou accélérer des processus de lymphomagenèse. Ainsi, cette protéine doit être une cible pour le développement de nouvelles thérapeutiques et ses mécanismes d'action doivent être décryptés. Le projet de recherche s'articule donc autour de trois objectifs :

- 1- Identifier les cibles chromatinienne et ARN de YTHDC1 (ChiP-seq, Hyper-TRIBE, RNA-seq, RIP-seq) dans les modèles cellulaires de lymphomes agressifs (cibles oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs) (collaboration avec l'équipe de Michael Kharas, MSKCC, NYC). Au vue du lien fonctionnel potentiel entre YTHDC1 et les membres de la famille PRMT, une crible ChiP-seq anti-PRMT2 sera également effectué.
- 2- Évaluation de la contribution des cibles identifiés dans les processus de lymphomagenèse par cribles fonctionnels in vitro et in vivo (CRISPR-Cas9 ou CRISPRi ou CRISPRa, selon le contexte) couplés à du 'data mining' de données publiques 'omics' et clinique dans le lymphome / lymphopoïèse humaine normale.
A noter, les aspects bioinformatiques sont assurés par un bioinformaticien dans l'équipe.
- 3- Validation des candidats 'haut potentiels' sur biopsies tumorales de patients atteint de lymphome (analyses histopathologiques et moléculaires) (cribles protéiques par IHC, crible NGS et 'immune contexture') (avec le Pr Laurent Martin – Plateforme de pathologie du CHU de Dijon et l'unité IGEO dirigée par le Pr Callanan) (en étroite collaboration le groupe coopérateur LYSA – Lymphoma Study Association).

La mise en œuvre de ce projet va permettre l'identification des mécanismes par lesquels l'altération de la protéine d'intérêt influe sur le développement des lymphomes agressifs. Ce projet se déploiera ainsi au niveau translationnel en identifiant des nouveaux marqueurs et des cibles thérapeutiques potentielles.

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

L'Inserm, l'Université de Bourgogne et la région Bourgogne Franche-Comté participent au financement à travers les fonds récurrents annuels alloués à l'équipe.

Financement du groupe LYSA – onco-épigénomique (personnel technique et ingénieur)

L'équipe est également affiliée au LabEx LipSTIC (renouvelé le 1^{er} Janvier 2020 pour 5 ans). Le projet entre dans le cadre d'un financement récurrent du LabEx pour les 5 prochaines années (minimum de 15 000 € par an).

Une demande de subvention (50 000 €) sera effectuée (Juin 2024) dans le cadre de l'appel à projets de la Ligue Contre le Cancer. Un projet PL Bio est visé en 2025.

- connaissances et compétences requises

L'étudiant.e devra avoir effectué un Master 2 Recherche (ou équivalent BAC+5) dans les domaines de la biologie cellulaire, moléculaire et en physiologie, et avoir de solides connaissances dans les mécanismes moléculaires des cancers. Une expertise sur les voies de signalisation, les mécanismes de l'hématopoïèse/leucémogénèse/lymphomagenèse sera un plus. L'étudiant.e devra avoir un bon niveau en anglais, lu, écrit et parlé, des compétences en biologie cellulaire (culture cellulaire, cytométrie en flux) et en biologie moléculaire (PCR, Western blot). Elle/il devra avoir accompli au moins un stage qui a nécessité des expérimentations biologiques effectuées sur un modèle animal et ne devra pas appréhender l'expérimentation *in vivo*. Une expertise sur les techniques suivantes sera un atout : manipulation des modèles murins, anesthésie, prélèvement de sang, injections intraveineuses et prélèvement d'organes.

Nous assurons cette formation doctorale de façon à permettre à l'étudiant(e) la présentation dans des congrès nationaux et internationaux dès la deuxième année.

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

Ces dernières années, la survie des patients atteints d'un lymphome B non-Hodgkinien (LNH) s'est améliorée chez les patients réfractaires/récidivants. Malgré ces avancées, les échecs thérapeutiques persistent, particulièrement pour les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) et les lymphomes à cellules du manteau (LCM). L'information épigénétique, codée par des modifications chimiques de l'ARN, de l'ADN et des histones ainsi que par l'organisation structurale de la chromatine, contrôle la fonction du génome indépendamment de la séquence d'ADN. Ces marques épigénétiques sont régulées par des complexes « écrivains », « lecteurs » et « effaceurs ». Nous nous intéressons à YTHDC1, un « lecteur » nucléaire qui interagit avec la marque m⁶A (N⁶-methyladenosine) des ARN. Il est impliqué dans le « silencing » stable de gènes spécifiques de lignage et d'éléments répétés incluant les éléments transposables. Il pourrait également être impliqué dans l'organisation du microenvironnement nucléaire. Ce projet vise à étudier les mécanismes d'action de YTHDC1 dans les lymphomes agressifs. Ces études, couplées aux analyses chez les patients, nous permettront d'évaluer l'intérêt pronostique et thérapeutique potentiel, avec des avancées attendues dans le domaine de la médecine de précision pour les lymphomes agressifs.

In recent years, survival of patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) has improved in refractory/recurrent patients. Despite these advances, therapeutic failures persist, particularly in mantle cell lymphoma (MCL) and diffuse large-cell B lymphoma (DLBCL).

Epigenetic information, encoded by chemical modifications of RNA, DNA and histones, as well as by the structural organization of chromatin, controls genome function independently of DNA sequence. These epigenetic marks are regulated by "writer", "reader" and "eraser" complexes. We are interested in YTHDC1, a nuclear "reader" that interacts with the m6A (N6-methyladenosine) mark of RNAs. It is involved in the stable silencing of lineage-specific genes and repeats, including transposable elements. It may also be involved in the organization of the nuclear microenvironment. The aim of this project is to investigate the mechanisms of action of YTHDC1 in aggressive lymphomas. These studies, coupled with analyses in patients, will enable us to assess the potential prognostic and therapeutic interest, with expected advances in the field of precision medicine for aggressive lymphomas.

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, médecine, santé

Mots clés : YTHDC1 ; Hétérochromatine ; Lymphomes agressifs ;