

**TITRE DU PROJET :**

Radiosensibilisation par des formulations riches en Acides Gras Polyinsaturés et Polyphénols et des leurres lipidiques : Positionnement d'Adjuvants Thérapeutiques à la Radiothérapie

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : DELMAS

Prénom : Dominique

**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)**

Unité Mixte de Recherche (UMR) 1231 INSERM, uB, AgroDijon "*Center For Translational and Molecular medicine - CTM*"; Equipe "*Therapies and Immune REsponse in CancerS - TIRECS*"

**- localisation**

UFR Sciences de Santé, 7 bd Jeanne d'Arc 21000 Dijon

**- nom du directeur de thèse**

Pr DELMAS Dominique

**- nom du co-directeur s'il y a lieu**

**- adresse courriel du contact scientifique**

[dominique.delmas@u-bourgogne.fr](mailto:dominique.delmas@u-bourgogne.fr)

**- description du projet (2 pages maximum)**

**A CONTEXTE SCIENTIFIQUE GENERAL DU PROJET**

La radiothérapie (RT) externe est un des acteurs majeurs du traitement du cancer, avec la chirurgie, la chimiothérapie et maintenant l'immunothérapie. Elle a de nombreuses indications, seule ou en association avec d'autres traitements comme des chimiothérapies, des thérapies ciblées (ciblant par exemple des mécanismes de réparation de l'ADN ou de néo-angiogenèse, des inhibiteurs du cycle cellulaire) ou encore plus récemment des immunothérapies. La RT consiste à délivrer localement des doses de radiations ionisantes au niveau de la tumeur, créant ainsi des dommages à l'ADN des cellules tumorales qui, s'ils ne sont pas réparés, entraînent un arrêt de prolifération et/ou la mort cellulaire. La RT a également la capacité de remodeler le microenvironnement tumoral (MET) en stimulant le recrutement de différents types de cellules immunitaires dans les tumeurs. Selon les modalités d'administration de la RT, la réponse immunitaire radio-induite peut être immuno- activatrice ou - suppressive. Chaque prescription de RT est basée sur une balance bénéfice / risque permettant de délivrer des doses efficaces sur les lésions tumorales tout en limitant les doses reçues aux organes à risque avoisinants. La fenêtre thérapeutique de la RT peut donc être élargie en augmentant la radiosensibilité des cellules tumorales et / ou en protégeant les organes à risque. La RT est couramment associée à la chimiothérapie pour en accroître l'efficacité. Toutefois, cette association se fait souvent au prix d'une toxicité plus importante et ne peut par conséquent être proposée à tous les patients. L'un des enjeux majeurs de la recherche en cancérologie est de diminuer la survenue des échecs thérapeutiques qui peuvent être liés à l'hôte (i.e. mauvaise tolérance, métabolisme accru), au cancer lui-même (i.e. résistance innée ou acquise) ou encore à son MET [i.e. surproduction de facteur pro-angiogénique (VEGF-A), infiltration de cellules immunosuppressives].

Dans ce cadre de recherche de nouvelles solutions thérapeutiques, il apparaît primordial de développer des **stratégies permettant à la fois d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux thérapeutiques classiques, de contourner les mécanismes de résistance innée ou acquise et de limiter la toxicité des traitements sur les cellules saines.**

Dans ce contexte, nous avons initié en partenariat avec le Centre Georges François Leclerc (CGFL, Dr. C. Mirjolet, Département de Radiothérapie) un projet de recherche transversal et translationnel visant à évaluer **le potentiel comme adjuvant pour le traitement des cancers par RT :**

- D'une formulation à base d'acides gras polyinsaturés [acide docosahexaénoïque (DHA) et acide eicosapentaénoïque (EPA)] et de resvératrol : le Resvega® (RGA)

- De leurres lipidiques (LL $\alpha$ CD36) ciblant les récepteurs CD36 qui sont fortement exprimés dans divers types de tumeurs et dont l'expression est à la fois associée à des stades avancés, à une chimio et radio-résistance et de fait à un mauvais pronostic.

La formulation RGA, dont l'innocuité chez l'Homme est avérée, a fait l'objet d'une étude antérieure de notre équipe, permettant de montrer qu'elle limitait la progression de la DMLA au travers d'une inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* dans des modèles rétinien (Courtat *et al.*, 2021, Int J Mol Sci). Cette capacité à inhiber la production du VEGF-A ouvre une perspective intéressante quant à son utilisation dans d'autres pathologies telles que le cancer colorectal (CCR) où la composante angiogénique contribue fortement au développement tumoral et à la survenue de résistances notamment à la RT. Par ailleurs, des résultats préliminaires dans le modèle de CCR murin MC38 nous ont permis d'objectiver l'efficacité antitumorale du RGA administré seul. L'utilisation du RGA pourrait donc s'avérer intéressante en association avec la RT, nos données préliminaires indiquant qu'il amplifie la perte de viabilité cellulaire radio-induite et de clonogénicité des cellules cancéreuses MC38 et CT26 *in vitro*, et ce même à des concentrations qui, à elles seules, n'induisent pas de mort cellulaire (de 0,31 à 2,5  $\mu$ M), ce qui illustre sa capacité à radiosensibiliser les cellules cancéreuses.

Si cette étude du rôle radiosensibilisant du RGA sera poursuivie pour identifier les actions moléculaires sur les cellules cancéreuses et celles du microenvironnement (e.g. cellules immunitaires, endothéliales...), il s'agira aussi de comparer son efficacité aux composés que sont les acides gras DHA et EPA, le resvératrol, utilisés seuls. Nous étendrons notre stratégie d'identification d'adjuvants thérapeutiques efficaces avec le ciblage spécifique par les leurres lipidiques du récepteur membranaire permettant la captation d'acides gras exogènes que sont les CD36, dont le rôle est de plus en plus décrit dans la médiation des métastases, la résistance aux thérapies y compris la RT et l'évasion immunitaire.

## **B OBJECTIFS DU PROJET ET METHODOLOGIES**

Cette thèse a pour objectif d'étudier la capacité de la formulation RGA et de leurres lipidiques ciblant CD36 (LL $\alpha$ CD36) à agir comme sensibilisants aux rayonnements à base de photons (RT).

Notre étude sera menée dans des lignées cellulaires de CCR murines (MC38 et CT26) et humaines (HCT116), *in vitro* ainsi que dans un modèle *in vivo* syngénique de croissance tumorale (C57Bl6/J, BALB/c, souris immunocompétentes), tous disponibles et communément utilisés à l'UMR 1231.

Les modèles *vivo* nous donneront accès à l'ensemble des cellules du MET, permettant ainsi une étude large de nos formulations et agents à la fois sur les cellules cancéreuses, immunitaires et endothéliales.

**Ce projet de recherche s'attachera à répondre à 4 objectifs :**

**1°) Déterminer l'effet radiosensibilisateur du RGA et LL $\alpha$ CD36 sur des cellules tumorales *in vitro*.** Le cycle cellulaire et l'apoptose des cellules traitées seront analysés par cytométrie en flux et immunofluorescence (**Tâche 1.1**). Le taux de survie cellulaire clonogénique sera évalué afin de quantifier des paramètres de radiosensibilité octroyée par nos agents candidats, comme la fraction de cellules survivantes à une dose de 2 et 5 Gy [SF (pour *survival fraction*) 2 et SF5] ou encore à une dose qui, utilisée seule, n'a pas d'effet (**Tâche 1.2**).

**2°) Caractériser les mécanismes sous-jacents à leur impact sur la radiosensibilité des cellules tumorales *in vitro*.** L'efficacité sur les cellules cancéreuses de la RT+/- agents candidats sera évaluée par identification et quantification des cassures double-brin radio-induites de l'ADN et analyse de leur taux de réparation par immunomarquage du  $\gamma$ H2AX (**Tâche 2.1**), ainsi que par mesure des concentrations intracellulaires des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) par cytométrie en flux (**Tâche 2.2**). La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses étant un processus biologique associé à la radorésistance, nous évaluerons dans le cadre de traitement par nos agents candidats, si une inhibition des phénomènes d'invasion est observée notamment au travers d'une modulation de la TEM (**Tâche 2.3**). Cette étude sera complétée par l'analyse de l'expression et de l'activation des acteurs moléculaires impliqués (eg. MMP-2, -9 et -14) par zymographie ainsi que des voies de signalisation mises en jeu (**Tâche 2.4**).

**3°) Evaluer l'efficacité antitumorale de combinaison de traitement avec le RGA et LL $\alpha$ CD36 en association avec la RT *in vivo*.** Des souris porteuses de tumeurs syngéniques en sous-cutané seront soumises à une irradiation de 3 fractions de 8 Gray (3x8 Gy) ciblant la tumeur par rayonnements photoniques, par le dispositif de RT 3D guidée par l'image (SARRP, X-Strahl). Ces animaux seront, pour certains, traités quotidiennement par différentes doses de RGA ou de leurres lipidiques par gavage pendant 2 semaines avant l'irradiation et nous suivrons la croissance tumorale ainsi que la survie des animaux au cours du temps.

**4°) Etudier l'impact du RGA et LL $\alpha$ CD36 sur la réponse immunitaire intratumorale basale ou induite par RT et l'angiogenèse.** Si la réponse anti-tumorale induite par la RT fait intervenir les cellules immunitaires du MET, il est aussi à noter que les 3 principaux constituants du RGA, (DHA, EPA et resvératrol) peuvent favoriser la réponse immunitaire antitumorale. Aussi, nous étudierons l'impact de nos traitements combinatoires ou agents seuls sur la composante immunitaire du MET. Nous avons au sein de l'UMR déjà décrit que l'infiltration maximale de L $\gamma$ CD8<sup>+</sup>, NK et Treg est observée 7 jours après la RT délivrée en 3x8 Gy. Pour les groupes traités par RT +/- agents candidats, nous récupérerons les tumeurs 7 jours après la RT puis, après dissociation des tumeurs, nous caractériserons par cytométrie en flux les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs grâce à divers panels d'identification de cellules

lymphoïdes, myéloïdes et de cytokines impliquées dans les processus d'inflammation et dans la réponse immunitaire antitumorale (**Tâche 4.1**). La néo-angiogenèse tumorale étant associée à l'accumulation de cellules immunitaires pro-tumorales et à la formation d'un MET immunosuppresseur, nos agents candidats pourraient alors participer à l'immunomodulation au sein du MET de par leur fonction anti-angiogénique. L'impact de la combinaison RT+RGA sur l'angiogenèse tumorale, qui est un marqueur pronostique pour de nombreux types de cancer, sera aussi évalué en réalisant un marquage immunohistochimique spécifique des cellules endothéliales (anticorps anti-CD31) sur des coupes de tumeurs collectées 7 jours après RT (**Tâche 4.2**).

**Si nous démontrons/confirmons l'intérêt thérapeutique de ces combinaisons *in vivo*, nous évaluerons les mécanismes moléculaires modulés par nos agents candidats** (études des voies de signalisation de la réparation de l'ADN, de l'activation de la voie de l'interféron de type I impliquée dans la réponse immunitaire anti-tumorale) (**Tâche 5.1**). Nous nous intéresserons à leur impact sur la radiosensibilisation des cellules souches cancéreuses du fait de leur radiorésistance intrinsèque, largement responsable des échecs thérapeutiques (**Tâche 5.2**). D'autre part, le RGA pouvant aussi présenter un effet radioprotecteur pour les cellules saines (résultats préliminaires *in vitro* obtenus sur fibroblastes), l'évaluation de toxicités radio-induites avec la combinaison RT+RGA sera une étape intéressante et indispensable. Nous pourrions évaluer notamment l'impact sur des toxicités telles que la fibrose radio-induite. Enfin, l'utilisation actuelle du RGA en clinique permettra le développement rapide d'un essai combinant celui-ci avec de la RT, particulièrement pour des lésions proches d'organes à risque (**Tâche 5.3**).

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

Ce projet de recherche bénéficie de l'environnement humain et scientifique pour son déroulement, grâce à une collaboration étroite et complémentaire entre les membres de l'équipe 1 du centre Inserm CTM 1231 et les radiocliniciens du Centre de Lutte contre le Cancer GF Leclerc (Dr Céline Mirjolet). Par ailleurs, cet axe de recherche s'intègre dans l'un des 3 réseaux structurants du Cancéropôle Est « Radiations Ionisantes en BIOlogie, THérapies combinées et Imagerie Moléculaire - RIBIOTHIM-onco ». Ce projet bénéficie du financement récurrent Inserm et a été amorcé par 2 financements obtenus en 2022, une subvention BQR (Bonus Qualité Recherche) - Programme de recherche en réseau et le Prix Jeune Chercheur / Aide à l'installation de la Ligue contre le Cancer, Comité de Côte-d'Or.

### **- Connaissances et compétences requises**

Le/la candidat(e) devra posséder de solides connaissances en biochimie et biologie cellulaire, ainsi qu'une maîtrise des techniques d'études classiques telles que l'immunoblotting, la qPCR ou encore l'immunofluorescence ou plus spécifique avec la cytométrie en flux. Une expérience dans les domaines de l'oncologie et de l'expérimentation animale sont des atouts supplémentaires.

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

Dans le cadre d'un projet d'étude transversal et translationnel, dont les résultats déjà acquis *in vitro* sont prometteurs, nous souhaitons évaluer l'intérêt thérapeutique d'une formulation composée d'acides gras et de polyphénols, le Resvega® (RGA), et du ciblage spécifique par les leurres lipidiques (LL) du récepteur membranaire CD36 associés à une modalité de radiothérapie (RT) anticancéreuse. Notre objectif est d'établir une preuve de concept *in vitro* et préclinique de leur capacité à accroître le différentiel de réponse entre cellules tumorales et cellules de tissus sains lors de l'irradiation par RT conventionnelle. Ce projet vise à identifier de nouvelles modalités de traitement, qui, par leurs actions anti-angiogéniques, immunomodulatrices, radiosensibilisantes sur les cellules cancéreuses et/ou protectrices sur les tissus sains pourraient respectivement augmenter l'efficacité anti tumorale des RT et réduire l'incidence des effets secondaires indésirables. L'étude que nous proposons dans ce projet a pour ambition de démontrer de façon robuste, via l'utilisation de modèles *in vivo* ectopique et orthotopique, l'efficacité de la combinaison RGA et LL avec une RT. L'efficacité de la RT passe par 2 grands mécanismes : i) via une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales par induction de cassures doubles brin de l'ADN non réparées, et ii) via l'induction d'une réponse immunitaire intratumorale. Nos résultats permettront de décrire l'impact de nos agents candidats sur ces 2 principes d'action de la RT. Les réponses cellulaires et moléculaires à ces nouvelles modalités de traitement feront l'objet d'une attention toute particulière, comme la caractérisation de leur impact sur l'angiogenèse, l'infiltrat immunitaire, les dommages à l'ADN et leur réparation.

As part of a transdisciplinary and translational research project with promising *in vitro* results to date, we aim to evaluate the therapeutic value of Resvega® (RGA), a formulation of fatty acids and polyphenols, and the specific targeting of the CD36 membrane receptor by lipid decoys (LD), in combination with an anticancer radiotherapy (RT) modality. Our aim is to establish *in vitro* and preclinical proof-of-concept of their ability to increase the response differential between tumor cells and healthy tissue cells during irradiation with conventional photon RT. The aim of this project is to identify new treatment modalities which, through their anti-angiogenic, immunomodulatory and radiosensitizing actions on cancer cells and/or protective actions on healthy tissues, could

respectively increase the anti-tumor efficacy of RT and reduce the incidence of the complications it can cause. The aim of the study proposed in this project is to demonstrate robustly, using ectopic and orthotopic in vivo models, the efficacy of combining RGA and LD with RT. The efficacy of RT is mediated by 2 major cellular and molecular mechanisms: i) via a direct cytotoxic action on tumor cells through the induction of unrepaired DNA double-strand breaks, and ii) via the induction of an intratumoral immune response. Our results will enable us to describe the impact of our candidate agents on these 2 principles of RT action. Cellular and molecular responses to these new treatment modalities will be the focus of particular attention, as will characterization of their impacts on angiogenesis, immune infiltration, DNA damage and repair.

**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 Colorectal, Radiorésistance, Adjuvants Thérapeutiques, Acides Gras, Polyphénols, Ciblage de CD36