

**TITRE DU PROJET : Etude de la régulation de l'activation des lymphocytes T lors de la synapse immunologique entre les TIL et les cellules tumorales dans les métastases hépatiques de cancers gastrointestinaux**

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : DOUSSOT

Prénom : Alexandre

**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 Right – Equipe TICI (Therapeutic Innovations in Cancer Immunology)

- localisation  
8 Rue du Dr JFX GIROD, 25000 Besançon

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

- adresse courriel du contact scientifique  
[adoussot@chu-besancon.fr](mailto:adoussot@chu-besancon.fr)

- description du projet (2 pages maximum)

Ce projet sera réalisé en conjointement avec l'équipe du Dr Romain LOYON, chercheur dans l'équipe TICI à l'UMR Right. Le projet nécessitera des ressources biologiques notamment des prélèvements de tumeur qui seront obtenus via le service de chirurgie digestive du CHU de Besançon auquel j'appartiens. Le circuit est d'ores et déjà en place, et plusieurs dizaines de prélèvements ont déjà été envoyés à l'UMR.

Les immunothérapies anticancéreuses qui ciblent les points de contrôle immunitaires (ICI), telles que CTLA-4, PD-1 et son ligand PD-L1, ont transformé le paysage thérapeutique pour de nombreux cancers. Cependant, malgré des réponses cliniques convaincantes observées dans divers types de tumeurs, seule une fraction des patients obtient des réponses durables poussant les chercheurs à décortiquer les mécanismes modulant la réponse immunitaire au sein de la tumeur.

Les cancers colorectaux (CCR) sont caractérisés par une extrême hétérogénéité en terme de biologie, de réponse aux traitements et de survie des patients nécessitant le développement de nouvelles immunothérapies spécifiques, particulièrement pour les patients métastatiques. Les CCR MSI-H, qui représentent environ 5% des CCR métastatiques, présentent un fort infiltrat en cellules immunitaires T, en macrophages et ont un microenvironnement riche en IFN de type I comparés aux autres CCR. Aussi, les traitements par ICI ont montré des résultats convaincants en terme de survie chez les patients MSI-H. En

revanche, les patients MSS, qui constituent la vaste majorité des CCR (95% des patients métastatiques), ne répondent pas aux traitements actuels par ICI malgré le facteur pronostic établi de l'infiltrat lymphocytaire dans cette pathologie. En effet, l'immunoscore, un système de notation basé sur la quantification des lymphocytes T cytotoxiques et mémoire dans le noyau de la tumeur et les marges invasives de la tumeur, est un marqueur pronostique cliniquement utile dans les CCR quel que soit le statut microsatellitaire de la tumeur. A la différence de tumeurs dites « chaudes » possédant un infiltrat lymphocytaire important sensible aux immunothérapies, les tumeurs dites « immunosupprimées » possèdent un infiltrat lymphocytaire exprimant les checkpoints inhibiteurs (PD-1, CTLA-4, TIM3 et LAG3) mais également un microenvironnement immunosuppresseur caractérisé notamment par la présence de TGF- $\beta$  et d'IL-10.

Durant ces dernières années, un faisceau de preuves a mis en avant l'implication du récepteur de chémokine CX3CR1 dans l'infiltrat tumorale, le contrôle de la tumeur et la réponse aux immunothérapies :

- Dans un modèle de vaccination chez la souris, l'expression de CX3CR1 est augmenté sur les lymphocytes T CD8, via le rôle « helper » des lymphocytes T CD4, augmentant ainsi le potentiel des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) à atteindre le site tumoral et à contrôler la tumeur. En effet, CX3CL1 (Fractalkine), le ligand de CX3CR1, est exprimé par une large variété de cancers chez l'Homme (<https://www.proteinatlas.org/>) et CX3CR1 a été décrit comme étant impliqué dans le trafic des lymphocytes T vers la tumeur. Plus récemment, des analyses transcriptomiques ont révélées que ces lymphocytes T CD8 CX3CR1+ ayant reçu l'«help» des CD4, présentent des fonctions cytotoxiques et de sécrétion de cytokines effectrices accrues.

- Dans le cadre du traitement des mélanomes métastatiques par chimiothérapie en combinaison avec des immunothérapies anti-PD-1, les auteurs ont montré que les CTL CX3CR1+ issus des cellules mononuclées (CMN) du sang périphérique des patients sont plus résistant à la toxicité induit par la chimiothérapie grâce à l'expression d'une pompe à efflux spécifique (ABCB1) potentialisant ainsi l'effet des immunothérapies.

- Grâce à deux modèles de souris porteuses de tumeurs dérivées d'adénocarcinome de colon MC38 et CT26, les auteurs ont montré que le traitement par ICI induisait un contrôle de la tumeur et une augmentation de la survie et que cet effet était associé à une augmentation des lymphocytes T CD8 CX3CR1+ comparativement aux groupes traités par les isotopes. De plus, l'analyse du répertoire des TCR a mis en évidence un degré élevé de similarité et de clonalité des séquences de TCR entre les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) CD8+ totaux et les lymphocytes T CD8+ CX3CR1+ du sang périphérique chez les souris. Enfin, chez l'homme, la même équipe a montré que dans le cas d'un cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) traités par anti-PD-1, l'augmentation de l'expression de CX3CR1 sur les lymphocytes T CD8+ du sang périphérique était associée à une meilleure survie globale et sans progression.

- Au laboratoire Right, nous avons déjà pu montrer que CX3CR1 était diminué sur les TIL CD8 de métastases hépatiques de CCR (obtenues via le service de chirurgie digestive du CHU de Besançon) par rapport aux lymphocytes T CD8 du sang périphérique chez les patients. Ces données préliminaires suggèrent la mise en place d'un microenvironnement défavorable pour CX3CR1.

Notre hypothèse est que la présence de TGF- $\beta$  dans le microenvironnement tumoral des métastases hépatiques de CCR diminue l'expression de CX3CR1 sur les lymphocytes T CD8 nécessaire à l'activation optimal modulant ainsi l'efficacité antitumorale des TIL CD8+.

De plus, les thérapies cellulaires adoptives représentent une réelle révolution en cancérologie. L'utilisation de la fonction cytotoxique des LT a inspiré des stratégies d'immunothérapies innovantes basées sur le développement de cellules génétiquement modifiées pour exprimer un CAR c'est-à-dire un récepteur spécifique d'un antigène membranaire exprimé par les cellules cibles. Ainsi, ils sont redirigés sur les cellules tumorales qui expriment cette cible et ils exercent leurs fonctions cytotoxiques afin d'éliminer les cellules cibles. En plein essor depuis maintenant une décennie avec l'approbation par la FDA (Food and Drug Administration) de plusieurs CAR-T ciblant CD19 ou BCMA (B-cell maturation antigen) dans des hémopathies B ou dans le myélome, ces derniers ont bouleversé les approches thérapeutiques en oncohématologie. Cependant, malgré ce formidable succès pour le traitement des hémopathies B, l'utilisation des CAR-T pour le traitement des tumeurs solides s'est révélé être un échec lors des essais cliniques. En effet, il a été montré dans des modèles in vivo que les lymphocytes génétiquement modifiés pour exprimer un CAR-T (ou un TCR transgénique (TCRtg)) acquièrent un phénotype épuisé lorsqu'ils pénètrent dans le microenvironnement tumoral conduisant à l'hypothèse que l'épuisement/la dysfonction des cellules CAR-T est un obstacle majeur à la thérapie cellulaire par CAR-T des tumeurs solides.

De nouvelles données récentes publiées par l'équipe de Carl June en décembre 2021 ont précisé ces observations en démontrant l'acquisition par les LT CD8 CAR-T d'un phénotype NK-like exprimant des récepteurs inhibiteurs de type NK dans un modèle d'épuisement in vitro. De plus, ils ont montré la régulation négative de CX3CR1. Ce profil CAR-T CX3CR1-dysfonctionnel a également été validé dans des échantillons de patients portant des tumeurs solides traités par des cellules CAR-T ciblant la mésothéline. L'ensemble de ces données suggèrent que la dysfonction des cellules CAR-T lors de leur utilisation pour le traitement des tumeurs solides intervient lors de l'exposition répétée à l'antigène conduisant à l'acquisition d'un phénotype épuisé expliquant en partie l'échec de ce type de thérapie dans les cancers solides. Ainsi, nous souhaitons également valider notre hypothèse dans ce contexte ce qui permettrait d'ouvrir la voie au développement de nouvelles conceptions biotechnologiques utilisant CX3CR1 dans les constructions CAR-T pour le traitement des tumeurs solides.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer le rôle de CX3CR1 dans l'organisation de la synapse immunologique. La modulation de l'expression de CX3CR1 sera également étudiée notamment sa régulation par le TGF- $\beta$ . De plus, des expériences seront menées pour restaurer l'expression de CX3CR1 sur les TIL constituant une étape préliminaire importante à une future utilisation de ces cellules lors d'immunothérapies à bases de transfert adoptifs de TIL chez des patients atteints de cancers. Enfin, un modèle de cellules génétiquement modifié sera mis en place afin de confirmer l'intérêt de CX3CR1 dans l'optimisation des approches de thérapie cellulaire à base de cellules génétiquement modifiées pour le traitement des cancers solides.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)  
Financement de l'équipe et financement collaboratif avec le Dr Romain Loyon

- Connaissances et compétences requises

Connaissances de la biologie des cancers et de l'immunologie

Compétences : biologie moléculaire, cytométrie en flux, culture cellulaire dont culture de lymphocytes T, transduction.

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

Les récents progrès scientifiques ont permis de démontrer le rôle majeur du système immunitaire dans la lutte contre les cellules cancéreuses. En effet, la réactivation du système immunitaire chez les patients atteints de cancer est une stratégie ayant fait ses preuves pour de nombreux cancers excepté pour les cancers colorectaux (CCR). Les CCR sont des types de cancers présentant une grande hétérogénéité et dans lesquels la présence de lymphocyte dans la tumeur a été décrit comme un élément important pour la guérison des patients. Cependant dans certains cas, des molécules immunosuppressives présentes dans l'environnement tumorale modulent négativement le système immunitaire. L'enjeu de ce projet est de comprendre les mécanismes mis en œuvre modulant le système immunitaire et notamment les lymphocytes T au sein de la tumeur pour à terme développer de nouvelles stratégies permettant la reprogrammation de ces cellules chez les patients notamment lors de thérapie cellulaire à base d'infusion de TIL. Ce projet permettra également de développer de nouvelles approches biotechnologiques afin d'optimiser les immunothérapies existantes comme les CAR-T qui restent actuellement sans succès pour le traitement des tumeurs solides.

Recent scientific advances have demonstrated the major role played by the immune system in the fight against cancer cells. Indeed, reactivating the immune system in cancer patients is a proven strategy for many cancers, with the exception of colorectal cancer (CRC). CRC is a highly heterogeneous type of cancer, in which the presence of lymphocytes in the tumor has been described as an important factor in patient recovery. However, in some cases, immunosuppressive molecules present in the tumor environment negatively modulate the immune system. The aim of this project is to understand the mechanisms involved in modulating the immune system, and in particular the T lymphocytes within the tumor, with a view to developing new strategies for reprogramming these cells in patients, particularly during TIL infusion-based cell therapy. This project will also enable the development of new biotechnological approaches to optimize existing immunotherapies such as CAR-T, which are currently unsuccessful in the treatment of solid tumors.

**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 : TIL, Synapse, Activation, Immunothérapie, Cancer, Metastases**