

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : VEGRAN

Prénom : Frédérique

Section CNU : 65

Grade : *Chargée de recherche*

HDR : *Date de soutenance...29 octobre 2019.. Discipline : ...Immunologie..*

l'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

Faculté des Sciences de Santé

7 Boulevard Jeanne d'Arc

21000 DIJON

frederique.vegran@inserm.fr

0658816484

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) :

UMR INSERM 1231

François GHIRINGHELLI

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom :

Prénom :

Section CNU :

Grade :

HDR : *non* ; *oui* *Date de soutenance..... Discipline :*

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) :

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

UMR INSERM 1231

Equipe TIRECs « Thérapies and Immune Response in Cancers »

UFR Science de Santé. 7 boulevard Jeanne D'Arc

2100 DIJON. FRANCE

Directeur de Thèse : Frédérique VEGRAN

frederique.vegran@inserm.fr

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.

Etude des effets de l'Oxaliplatine sur les lymphocytes T régulateurs

La mise en place d'un environnement immunosuppresseur, caractérisé notamment par une forte infiltration de lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs), contribue à la progression du cancer. Les Tregs sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Foxp3. Elles possèdent de puissantes fonctions immunosuppressives, délétères en oncologie, car elles limitent la réponse immunitaire anti-tumorale. Plusieurs stratégies ont été développées pour cibler les Tregs, mais jusqu'à présent les résultats ont été décevants : manque de spécificité, effets secondaires importants...

Bien que certaines études indiquent que les Tregs sont stables quelles que soient les conditions dans lesquelles elles évoluent, des expériences de transfert adoptif ont montré que qu'ils peuvent dans certains cas, perdre l'expression de Foxp3 et leurs fonctions immunosuppressives. Une étude a notamment révélé que l'IL-12 pourrait être impliquée dans la conversion des Tregs en cellules productrices d'IFN γ . Ainsi, une autre approche pour cibler les Tregs consisterait à accroître leur plasticité.

Étant donné que la chimiothérapie reste le traitement de référence en oncologie humaine, il est essentiel d'examiner son impact non seulement sur les cellules tumorales, mais aussi sur les cellules immunitaires. La littérature décrit que des molécules comme la Cyclophosphamide, le Paclitaxel ou la Gemcitabine peuvent réduire le nombre de Tregs dans les tumeurs.

Nos données préliminaires ont montré que le traitement par Oxaliplatine, largement utilisé dans les cancers digestifs, induit l'expression des facteurs de transcription Ascl2, Sox2, Pou5F1 et Nanog dans les Tregs différenciées *in vitro*. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la pluripotence des cellules. Une analyse par cytométrie de flux indique que ce sont les cellules qui « survivent » au traitement qui expriment ces gènes. Enfin, les effets de l'Oxaliplatine ont également été observés *in vivo* sur les cellules de la rate de souris porteuses de tumeur et traitées avec de l'Oxaliplatine.

Ces données suggèrent que des mécanismes moléculaires induisant la pluripotence ou l'instabilité peuvent être déclenchés, voire contrôlés, dans les Tregs. Cette propriété pourrait être exploitée à des fins thérapeutiques pour modifier l'activité des Tregs et les faire passer d'un état pro-tumoral à anti-tumoral. Ainsi, ce projet vise à déterminer si l'Oxaliplatine peut induire des mécanismes conduisant à la reprogrammation des cellules Treg en suivant les objectifs ci-dessous.

Objectif 1 : Caractériser les modifications moléculaires induites par l'Oxaliplatine

Le profil transcriptomique des Tregs traitées avec l'Oxaliplatine sera déterminé par une analyse RNA-Seq. Les cellules CD4⁺ naïves seront isolées et purifiées par tri magnétique. Elles seront ensuite stimulées *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mimant le signal du TCR, en présence de TGF β , permettant l'induction de la polarisation Treg. Après trois jours de culture (temps nécessaire pour acquérir un profil Treg stable), les cellules seront traitées avec l'Oxaliplatine. Afin de déterminer si les modifications induites par l'Oxa sont transitoires ou non, une cinétique aux jours 1, 2, 3 et 6 post-traitement sera réalisée. Les voies de signalisation impliquées dans les processus de reprogrammation et, par conséquent, dans l'expression des gènes Ascl2, Sox2, Pou5F1 et Nanog incluent STAT3, PI3K, SMAD2/3, MAPK et Wnt et une étude a montré que l'un des mécanismes moléculaires responsables de la résistance des cellules à l'Oxa pourrait être la phosphorylation de GSK3B. Nous utiliserons des inhibiteurs pharmacologiques ciblant différentes voies de signalisation pour identifier la voie responsable de l'induction de Sox2, Pou5F1, Nanog et Ascl2 après

traitement par l'Oxa. Le Cisplatine sera utilisé comme témoin. Ces résultats seront confirmés par une stratégie de siRNA.

Objectif 2 : Identifier les modifications fonctionnelles induites par l'Oxaliplatine

Les expressions du facteur de transcription *Foxp3* et de la cytokine spécifique *IL10* sont inhibées après traitement à l'Oxaliplatine, ce qui laisse supposer que le traitement pourrait altérer leur fonction. Pour déterminer si les Tregs traitées avec l'Oxaliplatine conservent leurs fonctions immunosuppressives, nous évaluerons leurs capacités par cytométrie en flux, en étudiant les marqueurs membranaires CD127, CTLA-4, CD39, CD73 et CD25. La production de cytokines immunosuppressives (TGF β , IL-10 et IL-35) sera évaluée par ELISA. La fonctionnalité des Tregs traitées par l'Oxaliplatine sera évaluée à l'aide d'un test d'immunosuppression ex vivo au cours de co-cultures avec des cellules T CD8. La quantité d'IFN γ , IL-2 et TNF α produite par les cellules CD8+ sera mesurée par ELISA et cytométrie après marquage intra cellulaire. Des expériences similaires seront réalisées avec des Tregs isolées de souris traitées ou non avec l'Oxaliplatine.

Objectif 3 : Étudier les Tregs in vivo après traitement à l'Oxaliplatine chez la souris

Pour déterminer si l'Oxaliplatine peut être utilisée afin d'inverser les fonctions pro-tumorales des Tregs, nous utiliserons un modèle de transfert adoptif. Les Tregs seront différenciées in vitro en présence de TGF β , puis traitées avec l'Oxaliplatine. Ces cellules seront ensuite transférées chez des souris porteuses de tumeurs pulmonaires. Dix jours plus tard, les souris seront sacrifiées et l'effet anti-tumoral sera évalué en comptant le nombre de foyers tumoraux.

Pour savoir si l'effet anti-tumoral de l'Oxaliplatine est dû à l'abolition des capacités immunosuppressives des Tregs, nous analyserons l'état des Tregs chez des souris porteuses de tumeurs après traitement avec différentes doses d'Oxaliplatine. Pour cela, les souris seront injectées avec des cellules tumorales, puis après 7 jours, elles recevront un traitement à l'Oxaliplatine et les cellules immunitaires seront récupérées au cours d'une cinétique. Nous analyserons les proportions des différentes cellules de l'immunité dans les tumeurs (CD4, CD8, cellules dendritiques, macrophages...), leur production de cytokines et leur état d'activation puis corrélons ces données avec la vitesse de croissance tumorale.

Objectif 4 : Mettre en place des stratégies de transdifférenciation des Tregs

Le facteur de transcription *Foxp3* et l'expression spécifique de la cytokine *IL10* sont inhibés après le traitement à l'Oxaliplatine, mais aucune variation dans l'expression des gènes *Gata3*, *IL4*, *Rorc* et *IL17* n'a été observée, ce qui indique qu'aucune transdifférenciation des Tregs en Th2 ou Th17 ne se produit pas spontanément suite au traitement. Pour évaluer la capacité des Tregs traités à l'Oxa à acquérir un profil pluripotent et à subir une transdifférenciation, des Tregs seront traités avec de l'Oxaliplatine in vitro. Puis, les cellules seront traitées avec des cytokines de polarisation. Après traitement avec des doses croissantes, la capacité des cellules à acquérir un profil Th1, Th17, Th2, Th9 ou TFh sera analysée en étudiant l'expression des facteurs de transcription spécifiques (Tbet, GATA3, ROR γ t, PU1 et BCL6) ainsi que des cytokines clés (IFN γ , IL-17, IL-4, IL-9 et IL-21) au cours d'une cinétique sur 3 jours.

Le projet est soutenu par le Cancéropole Grand Est et par la Ligue régionale contre le cancer. Je dispose de fonds propres relatifs à une collaboration avec une entreprise privée.

L'ensemble nous assure 80KE par an de fonctionnement.

Connaissances et compétences requises

Connaissances : bases de l'immunologie

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

L'environnement immunosuppresseur créé par l'infiltration de lymphocytes T régulateurs (Tregs), qui limitent la réponse anti-tumorale, joue un rôle crucial dans la progression du cancer. Bien que des stratégies pour cibler les Tregs aient été développées, elles restent peu efficaces. Certaines études suggèrent que les Tregs peuvent perdre leur fonction immunosuppressive et se convertir en cellules productrices d'IFN γ , offrant ainsi une piste thérapeutique. L'oxaliplatine, chimiothérapie couramment utilisée dans les cancers digestifs, pourrait induire cette plasticité. Des recherches préliminaires ont montré que l'Oxaliplatine stimule l'expression de gènes associés à la pluripotence dans les Tregs. Ces gènes sont impliqués dans la reprogrammation des cellules, suggérant que l'Oxaliplatine pourrait modifier l'activité des Tregs pour les rendre anti-tumorales. Le projet se divise en quatre objectifs : 1. Analyser les modifications moléculaires induites par l'Oxaliplatine via une analyse RNA-Seq pour identifier les voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation. 2. Étudier les modifications fonctionnelles, en évaluant les marqueurs et la production de cytokines immunosuppressives des Tregs après traitement. 3. Étudier l'effet in vivo sur les Tregs dans un modèle murin de tumeurs pour vérifier si l'Oxaliplatine inverse leur effet pro-tumoral. 4. Mettre en place des stratégies de transdifférenciation, en testant la capacité des Tregs traitées à se reprogrammer en cellules anti tumorales. Ainsi, l'objectif final est d'explorer l'Oxaliplatine comme une option pour manipuler les Tregs à des fins thérapeutiques contre les cancers.

The immunosuppressive environment created by the infiltration of regulatory T cells (Tregs), which limit the anti-tumor immune response, plays a crucial role in cancer progression. Although strategies to target Tregs have been developed, they remain ineffective. Some studies suggest that Tregs may lose their immunosuppressive function and convert into IFN γ -producing cells, thus providing a therapeutic avenue. Oxaliplatin, a chemotherapy commonly used in digestive cancers, could induce this plasticity. Preliminary research has shown that Oxaliplatin stimulates the expression of genes associated with pluripotency in Tregs. These genes are involved in cellular reprogramming, suggesting that Oxaliplatin could alter the activity of Tregs to make them anti-tumoral. The project is divided into four objectives: 1. Analyze the molecular changes induced by Oxaliplatin via RNA-Seq to identify the signaling pathways involved in reprogramming. 2. Study functional changes by evaluating markers and the production of immunosuppressive cytokines in Tregs after treatment. 3. Investigate the in vivo effect on Tregs in a murine tumor model to verify if Oxaliplatin reverses their pro-tumoral effect. 4. Implement transdifferentiation strategies by testing the ability of Oxaliplatin-treated Tregs to reprogram into anti-tumoral cells. Thus, the final objective is to explore Oxaliplatin as a potential option for manipulating Tregs for therapeutic purposes against cancer.

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, Tregs, Chimiothérapie, Plasticité cellulaire