

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse – financement acquis
ANNEE 2025

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : [GARNACHE OTTOU](#)

Prénom : [FRANCINE](#)

Section CNU : [82](#)

Grade : [PU PH](#)

HDR : Date de soutenance : [2009](#). Discipline : [Biologie-Santé](#)

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

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

[EFS-BFC, 8 rue Dr JFX Girod, 25000 Besançon](#)

fgarnache@chu-besancon.fr

[03 70 63 25 77](tel:0370632577)

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

[UMR1098 RIGHT](#)

[Pr O. Adotevi](#)

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : [Renosi](#)

Prénom : [Florian](#)

Section CNU : [82](#)

Grade : [MCU-PH](#)

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

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

[EFS-BFC, 8 rue Dr JFX Girod, 25000 Besançon](#)

frenosi@chu-besancon.fr

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

[UMR1098 RIGHT](#)

[Pr O. Adotevi](#)

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)

[UMR1098 RIGHT, equipe TICl, axe 1](#)

- localisation

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.

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

Pr F Garnache Ottou
Dr F Renosi (codirection)

- adresse courriel du contact scientifique

fgarnache@chu-besancon.fr
frenosi@chu-besancon.fr

- titre du projet

CAR-FUSION : Optimisation de la persistance fonctionnelle des CAR-T cells par une protéine de fusion modulant l'immunosuppression tumoral et le phénotype mémoire des CAR-T cells

- description du projet (2 pages maximum)

Notre équipe a développé une expertise clinico-biologique spécifique sur l'étude des leucémies à cellules dendritiques plasmocytoïdes (LpDC) et les LAM (leucémies aiguës myéloïdes) avec excès de pDC (LAM-pDC), qui sont des leucémies très agressives. Nous avons développé un **réseau national hémopathies pDC (ROMI)**, laboratoire médical de référence JORF n°0167 2021) qui a permis de créer une cohorte nationale et des bio collections pour réaliser des travaux de recherche sur ces entités. Ces leucémies sont résistantes aux chimiothérapies, ainsi pour améliorer leur prise en charge, nous avons développé des lymphocytes T (LT) génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique à un antigène (**CAR-T, chimeric antigen receptor T cell**) dirigé contre **CD123 (CAR123)** exprimé dans 100% des LpDC et 70% des LAM-pDC. Ce CAR123 a montré sa très bonne efficacité dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (Bôle-Richard E *et al.*,2020 et Fredon M *et al.*,2024) et devrait être évalué en clinique à moyen terme.

Depuis la « révolution CAR-T », plusieurs CAR-T dirigés contre CD19 sont utilisés en clinique pour le traitement d'hémopathies B. Malgré leur efficacité certaine, en situation de « vraie vie », 40 à 50% des patients rechutent environ à 1 ans (Bachy E *et al.*,2022), en relation en grande partie avec l'absence de persistance à long terme des CAR-T chez les patients ou l'inhibition des CAR-T par l'environnement immunosuppresseur médullaire de ces leucémies (Schuster SJ *et al.*,2019).

Les LpDC et LAM-pDC expriment **ILT-3 (LILRB4 : leukocyte immunoglobulin like receptor B4)**, qui est une molécule **immunosuppressive** capable d'interagir avec les **LT** via le récepteur **LAIR-1**, induisant une réduction de leur cytotoxicité (Xiang Z *et al.*,2024). Des données transcriptomiques obtenues par notre équipe (en cours de publication) montrent que les blastes de LpDC présentent une forte interaction avec les LT via l'interaction **ILT-3/LAIR-1**. Ces données renforcent l'idée qu'ILT-3 exprimé par les blastes joue un **rôle immunosuppresseur sur les LT du micro-environnement leucémique et pourrait inhiber les CAR-T** injectés à un patient (qui expriment LAIR-1). Les données de RNAseq suggèrent un impact d'autres couples ligand/récepteur tel que **CD274 (PD-L1) / CD80**, qui mériteraient d'être explorés par la suite car potentiellement impliqués dans une régulation négative des LT par les pDC tumorales.

En effet les hémopathies à pDC concernent un type cellulaire du système immunitaire (les pDC) impliqué dans la **modulation de l'immunité innée et adaptative** (Reizis B *et al.*,2019). Néanmoins, les interactions au sein du microenvironnement leucémique ont été peu étudiées, et plus particulièrement dans les LAM-pDC dont la description est plus récente. Récemment, nos travaux réalisés à partir de données de scRNAseq et bulk RNAseq, ont mis en évidence dans les LAM-pDC, la participation de nombreux types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire : **pDC, cDC**

(DC conventionnelles type 2), **monocytes** et des **lymphocytes T et B**. Ces différents médiateurs de l'immunité semblent être responsables d'un **épuisement lymphocytaire** (*exhaustion*) via l'expression de différents gènes (comme *TIGIT, TOX, TNF, GMZK, RUNX3*) et d'une polarisation **T régulateur**, ce qui est suggéré par la modélisation des interactions cellulaires via l'algorithme CellChat, à partir des données de scRNAseq. Ces données sont corroborées par la description dans les leucémies de divers mécanismes d'échappement immunitaire impliquant de nombreux modulateurs immuno-régulateurs (Tomasoni C *et al.*,2023). **Ainsi la caractérisation des cellules du microenvironnement leucémique est un élément clé de l'identification des résistances aux immunothérapies et aux thérapies adoptive.**

CD27 (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 7*) est exprimé naturellement sur les LT CD4+ et CD8+, et lors de son activation, il favorise l'activation des LT, leur expansion clonale, leur survie et il permet aux LT de se différencier vers un **phénotype mémoire** via l'expression de différents facteurs de transcription. Dans le contexte des CAR-T, il a été montré que la costimulation CD27 induit des voies anti apoptotiques, diminue l'expression de PD-1 et ainsi améliore la survie des CAR-T, limite leur épuisement et améliore le contrôle anti tumoral (Chen H *et al.*,2021;Jaeger-Ruckstuhl *et al.*,2024).

Les objectifs de ce travail seront de poursuivre l'évaluation des mécanismes immunosuppresseurs mis en place dans le microenvironnement leucémique des hémopathies à pDC; de chercher à bloquer ces mécanismes induisant une inhibition des CAR123; tout augmentant la production de CAR-T mémoires capables de se maintenir à long terme chez les patients.

Pour ceci, notre équipe souhaite développer de nouvelles stratégies grâce à l'ajout d'un corecepteur qui permettra de réguler l'activation des CAR-T de façon à générer des LT plus résistants à l'épuisement avec également une résistance aux signaux inhibiteurs du microenvironnement leucémique. Ainsi, les CAR-T pourraient conserver leurs fonctions effectrices, même pendant une exposition prolongée à leur antigène *in vivo* dans un environnement immunosuppresseur.

Ainsi, dans un 1^{er} temps, pour contourner l'inhibition induite par ILT-3 déjà identifiée, nous développerons un **corecepteur contenant une partie extracellulaire reconnaissant ILT-3 associée au domaine intracellulaire de CD27**. Ce corécepteur permettra de réorienter les effets inhibiteurs de la signalisation d'ILT-3 sur les LT vers un effet favorable pour le CAR-T *via* CD27 (en intracellulaire). Le **corécepteur indépendant : ILT3/CD27 (I7)** sera ajouté au CAR123 par des méthodes de modifications lentivirales des LT maîtrisées au sein du laboratoire. Nous passerons par différentes étapes afin de valider les différentes parties du corécepteur. Nous évaluerons le scFv (*single chain Fragment variable*) ciblant ILT-3 (séquence obtenue dans les bases de données public) dans la construction du CAR123 qui est connue pour induire une bonne activation des LT. Seul le scFv CD123 sera substitué par le scFv ILT-3 dans le *backbone* du CAR123, permettant de valider la reconnaissance d'ILT-3 et l'induction de l'activation lymphocytaire. Des mutations ponctuelles des séquences CDR3 des chaînes légères et lourdes du scFv pourront être effectuées par la suite, si la reconnaissance d'ILT-3 n'est pas assez forte. Nous ferons de même pour évaluer le module CD27 intracellulaire en le plaçant dans la construction du CAR123, à la place de CD28 (le CAR123 princeps est un CAR-T de 3eme génération possédant les 2 modules de costimulation CD28 et 4.1BB), sans cette fois-ci modifier la partie extracellulaire. Ceci permettra de montrer, que le CD27 inséré modifie l'activation du CAR123 et favorise le développement de CAR-T à phénotype mémoire comparativement au CAR123 princeps. Puis nous développerons le **corécepteur I7 complet** avec le domaine transmembranaire de CD27 et un *hinge* extracellulaire CD8a. Le plasmide sera commandé et le surnageant lentiviral sera produit au laboratoire selon les méthodes bien établies au laboratoire. Ce travail sera réalisé à partir de LT primaires sains de donneur de sang (EFS-BFC). Nous évaluerons les rendements de transduction obtenus pour le CAR123 et I7 ainsi que leur stabilité d'expression au fil du temps par CMF. Les différents modèles cellulaires présent au laboratoire exprimant +/- CD123 et +/- ILT-3 (MOLM-13 et CAL-1 : CD123⁺/ILT-3⁺ ; KG-1 : CD123⁺/ILT-3⁻ ; NALM-6 : CD123⁻/ILT-3⁻) ainsi que les nombreux PDX (*patient derived xenograft*) et une bio collection de cellules primaires (réseau ROMI) permettront l'évaluation de la fonctionnalité des CAR123-I7 en comparaison aux CAR123 princeps. L'ensemble des modèles d'évaluation *in vitro* (profil phénotypique, activation, cytotoxicité, prolifération, sécrétion de cytokines, profil d'épuisement, imagerie IncuCyte®) ainsi que les modèles *in vivo* (souris immunodéprimées) sont maîtrisés.

L'exploration du microenvironnement leucémique débutera par une exploration des données de **scRNAseq et de RNAseq** sur les populations triées du microenvironnement médullaire leucémique afin de rechercher des **signatures suppressives** (cellules myéloïdes suppressives (MDSC), d'exhaustion immunitaire). Puis une exploration en CMF des cellules composant le microenvironnement sera réalisée sur des échantillons de moelle de LpDC, de LAM-pDC, de LAM sans excès de pDC et de donneurs sains. Les panels permettront d'identifier les **MDSC**, les **monocytes**, les **cDC**, les **pDC**, les **macrophages** (M2 et M1), **LT** (stades de différenciation, statut sénescence et épuisé), les **LT régulateurs**, les **cellules NK** et **lymphocytes B** (incluant les B régulateurs). En lien avec les résultats obtenus, nous réaliserons des modèles de **co-culture** à partir de cellules triées, impliquant blastes de LAM-pDC ou de LpDC, +/- les cellules du microenvironnement identifiées précédemment, face à des lymphocytes T et B naïfs afin de montrer sur le plan fonctionnel, l'impact des blastes et cellules suppressives sur leur activation. Le suivi de co-culture sera réalisé par CMF, et évaluera la prolifération lymphocytaire, leur phénotype et leur sécrétion cytokinique.

Ces données devraient permettre **d'identifier de nouvelles stratégies de modulation de la réponse antileucémique mis en place par ces différentes populations cellulaires dans ces hémopathies**. Les acquisitions biotechnologiques obtenues dans la 1^{ère} partie de ce projet permettront de créer **d'autres corécepteurs** adaptés à d'autres mécanismes d'inhibition potentiellement identifiés comme par exemple cibler à la fois les cellules leucémiques et une population cellulaire immunosuppressive particulière.

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

- **Ligue contre le cancer CCIR Est 2024** (obtenu) : Optimisation des stratégies thérapeutiques des hémopathies à pDC à travers le criblage de la cellule souche leucémique et du microenvironnement tumoral, demande de financement entre notre équipe et l'équipe de MT Rubio Nancy (100 K€ et **50 KE** pour Besançon)
- **ITMO Aviesan 2024** (obtenu) : Characterization and modulation of the stromal and immune microenvironment in bad prognosis acute myeloid leukemia (CAMILAKT) / 634 K€ dont **232 K€** pour Besançon
- Ce projet bénéficie également du soutien (budget, infrastructure...) de l'équipe car c'est un axe thématique majeur de l'unité garantissant sa réalisation.

- connaissances et compétences requises

L'étudiant(e) devra être compétent(e) en immunologie et en hématologie, être familier avec les techniques de cytométrie en flux et de culture cellulaire (lignées, cellules primaires, CFU-assay) ainsi qu'en ingénierie cellulaire (transfection, transduction, clonage). Des connaissances techniques de biologie moléculaire (PCR et RNA-seq, analyse de données), de biochimie (Western-Blot, ELISA), d'analyse statistique et d'expérimentation animale seront appréciées.

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

Le projet CAR-FUSION vise à améliorer l'efficacité des thérapies **CAR-T** (*Chimeric Antigen receptor*) anti-CD123 (**CAR123**) pour traiter les leucémies CD123+ résistantes aux chimiothérapies. L'objectif est de renforcer la persistance des CAR123 en modifiant leur réponse aux signaux inhibiteurs du microenvironnement leucémique.

Ces leucémies expriment la molécule immunosuppressive **ILT-3**, qui inhibe les fonctions des CAR-T via le récepteur LAIR-1, réduisant leur efficacité après administration chez les patients. Pour contrer cette inhibition, nous proposons de développer un **corecepteur**, composé d'un domaine extracellulaire de **reconnaissance d'ILT-3** et du domaine intracellulaire de **CD27**, un facteur de

costimulation favorisant la **survie** et la différenciation des CAR-T en **CAR-T mémoire** (qui sont capables de rester efficaces à long terme). Ainsi, cette approche vise à **rediriger les effets inhibiteurs de l'ILT-3 vers des signaux favorables à la fonction des CAR-T via CD27**, permettant aux CAR-T de mieux résister aux signaux immunosuppresseurs du microenvironnement leucémique et d'assurer le maintien de leur efficacité à plus long terme chez les patients.

Nous créerons et ajouterons le module **ILT3-CD27 (I7)** au **CAR123** (déjà validé dans le laboratoire) et évalueront les fonctions de ce **CAR123-I7** dans les modèles leucémiques disponibles au laboratoire. D'autre part, nous poursuivrons l'analyse des mécanismes immunosuppresseurs qui se mettent en place dans ces leucémies de façon à identifier d'autres mécanismes responsables d'inhibition de la fonction des CAR-T.

Ce travail devrait permettre de bloquer un mécanisme d'échappement de la leucémie et de favoriser le développement de CAR-T mémoire, pour obtenir un contrôle à long terme de la pathologie et éviter les rechutes. Le travail biotechnologique associé à la 1^{ère} partie de ce projet permettra également par la suite, de créer d'autres corécepteurs, adaptés à d'autres mécanismes d'inhibition mis en place par les hémopathies.

The **CAR-FUSION** project aims to improve the efficacy of CAR-T (Chimeric Antigen receptor) anti-CD123 (**CAR123**) therapies for chemotherapy-resistant **CD123+ leukemias**. The aim is to enhance the persistence of CAR123 by modifying their response to inhibitory signals from the leukemic microenvironment.

These leukemias express the immunosuppressive molecule **ILT-3**, which inhibits CAR-T functions via the **LAIR-1** receptor, reducing their efficacy after administration in patients. To counter this inhibition, we propose to develop a **coreceptor**, composed of an **extracellular ILT-3** recognition domain and the intracellular domain of **CD27**, a costimulatory factor promoting the **survival** and differentiation of CAR-Ts into **memory CAR-Ts** (which are able to remain effective over the long term). Thus, this approach aims to **redirect the inhibitory effects of ILT-3 towards signals favorable to CAR-T function via CD27**, enabling CAR-Ts to better resist the immunosuppressive signals of the leukemic microenvironment and ensure their longer-term efficacy is maintained in patients.

We will create and add the **ILT3-CD27 (I7)** module to CAR123 (already validated in the laboratory) and evaluate the functions of this **CAR123-I7** in leukemia models available in the laboratory. We will also continue to analyze the immunosuppressive mechanisms at work in these leukemias, in order to identify other mechanisms responsible for inhibiting CAR-T function.

This work should make it possible to **block a leukemia escape mechanism** and **promote the development of memory CAR-Ts**, to obtain **long-term control of the pathology and avoid relapses**. The biotechnological work associated with the 1st part of this project will also enable the subsequent creation of other coreceptors, adapted to other inhibition mechanisms set up by haemopathies.

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 : Leucémie, microenvironnement, immunosuppression, CAR-T cells, corecepteur, cellulés mémoires, persistance