

TITRE DU PROJET

Implication du facteur de transcription OSR1 dans les fibroblastes associés aux réponses immunitaires antitumorales : biomarqueur et cible thérapeutique dans les cancers du pancréas

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

Directeur de thèse HDR :

Nom : **LAKKIS**

Prénom : **Zaher**

Section CNU : 52-02

Grade : *PU-PH*

HDR : Date de soutenance : 2021. Discipline : Chirurgie digestive

Coordonnées :

Service de Chirurgie Viscérale, Digestive et Cancérologique,
CHU Besançon, 3 Boulevard Fleming 25030 Besançon Cedex
03 81 66 93 44 – zlakkis@chu-besancon.fr

Unité d'appartenance : INSERM UMR1098 RIGHT, Pr Adotevi

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

Unité de recherche / Localisation

INSERM UMR1098 RIGHT

Université de Franche-Comté/EFS Bourgogne Franche-Comté

Groupe : Therapeutic Innovation in Cancer Immunology (TICI)

8 rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, BP 1937

25020 BESANCON cedex

Directeur de thèse : Pr Zaher LAKKIS

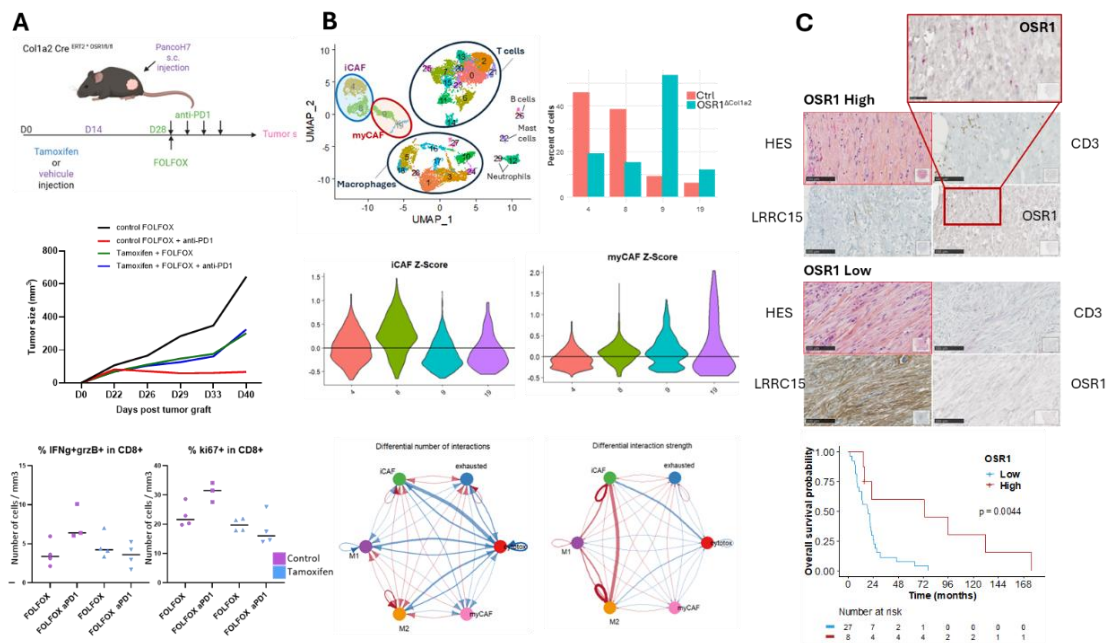
zlakkis@chu-besancon.fr

Titre du projet

Implication du facteur de transcription OSR1 dans les fibroblastes associés aux réponses immunitaires antitumorales : biomarqueur et cible thérapeutique dans les cancers du pancréas

Description du projet

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.



Rationnel : L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) se caractérise par une composante stromale dense et l'activation des fibroblastes associés au cancer (CAF) liés au TGFβ1. Parmi ceux-ci, les myofibroblastes immunosuppresseurs (myCAF) jouent un rôle important dans la médiation de la résistance aux thérapies antitumorales, qui est une caractéristique de la progression des PDAC. La différenciation des précurseurs fibroblastiques en myCAF ou en CAF inflammatoires (iCAF) est un facteur déterminant du microenvironnement tumoral immunitaire et influence l'efficacité des réponses immunitaires contre la tumeur.

Notre équipe a mené un programme de recherche mettant en évidence que l'inhibition du TGF-β1, en association avec une chimio-immunothérapie, favorise la différenciation d'une sous-population de iCAF avec une expression élevée de CXCL9/10 et améliore l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Vienot *et al.*, *Oncoimmunology* 2022). Cependant, les mécanismes moléculaires régissant la différenciation des sous-populations de CAF, en particulier les facteurs de transcription impliqués dans le développement des phénotypes myCAF et iCAF, restent mal compris.

Nos résultats issus de single-cell RNA-seq (scRNAseq) mettent en évidence que cette sous-population de iCAF CXCL9/10 est caractérisée par l'expression d'un marqueur : Odd skipped-related 1 (OSR1). Ce facteur de transcription intervient notamment dans le développement de différents organes et l'organisation des organes lymphoïdes secondaires chez l'embryon (Wang *et al.* 2005; Vallecillo-García *et al.* 2023). De plus, OSR1 semble réguler l'inflammation par l'intermédiaire des macrophages et influencer leur polarisation (Liu *et al.* 2023; Kotsaris *et al.* 2023). **Cependant peu de travaux étudient l'expression de OSR1 et son rôle au sein des fibroblastes associés au cancer. Contrairement myCAF, les facteurs de transcription soutenant la différenciation des iCAF reste à déterminer. Nous émettons l'hypothèse que OSR1 génère une activité transcriptionnelle dans les iCAF favorisant l'attraction des lymphocytes et les réponses aux immunothérapies.**

Nos premiers résultats confirment que l'expression de OSR1 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la différenciation des iCAF et associé aux réponses immunitaires antitumorales dans le microenvironnement tumoral des cancers du pancréas (manuscrit en cours).

Objectifs : Nous souhaitons caractériser l'expression de OSR1 chez les patients suivis pour un cancer du pancréas et évaluer son impact pronostique et sur la réponse aux traitements afin de valider son application clinique. Nous visons également à identifier les mécanismes régulant OSR1 afin de restaurer son expression en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques combinant chimio-immunothérapie.

Données préliminaires : Nos résultats préliminaires *in vivo* ont mis en évidence que l'expression stromale de OSR1 détermine l'infiltration immunitaire et l'efficacité des chimio-immunothérapies. Nos travaux mettent également en évidence d'une part la présence de OSR1 dans les iCAF de PDAC de patients, et d'autre part sa corrélation à l'infiltrat immunitaire et à la survie.

Figure 1 : Implication de OSR1 dans l'infiltrat immunitaire antitumoral. Modèle pancréatique murin déficient pour OSR1 dans les fibroblastes (*Osr1*^{ΔCol1a2}) inductible par tamoxifène et exposé à la chimio-immunothérapie : (A) croissance tumorale et infiltrat CD8 mesuré par cytométrie ; (B) scRNAseq de ces tumeurs avec enrichissement en iCAF et des interactions avec les lymphocytes T CD8 cytotoxiques en présence de OSR1 (CellChat). (C) RNAscope OSR1 et immunohistochimie CD3 (infiltrat lymphocytaire) et LRRC15 (marqueur de myCAF) issus de PDAC de 35 patients.

Matériel disponible développé au laboratoire et équipes associées : Notre équipe a développé des modèles permettant d'induire les différentes sous-populations de CAF à partir de cellules souches mésenchymateuses (MSC) dérivées d'adipocytes (ASC52^{tel}) ainsi qu'à partir de cellules stellaires pancréatiques (PSC). Une technique de CRISPR a aussi été développée permettant de réaliser un KO OSR1 dans les fibroblastes. Notre équipe a également acquis un modèle murin génétiquement déficient pour OSR1 dans les fibroblastes (collaboration avec l'équipe du Dr Linglin Xie aux Etats-Unis, Department of nutrition, Texas A&M University) (Liu et al. 2023). Des modèles de tumeurs orthotopiques du pancréas (KPC) sont en cours de développement. Nous avons également à disposition des échantillons tumoraux de patients opérés d'un cancer du pancréas issus de la cohorte du CHU de Besançon (n=220). Dans le cadre de nos collaborations, nous disposons d'une cohorte de validation de patients opérés d'un cancer du pancréas (Pancréas-CGE, n=150, NCT02818907). Enfin, nous disposons aussi des prélèvements biologiques issus de l'étude DOVIPA (n=35 ; NCT06757244) : phase II incluant des patients avec un cancer du pancréas métastatique traités en 1^e ligne par la combinaison de chimiothérapie FOLFIRINOX + anti-PD1 dostarlimab + vitamine D3.

Programme expérimental

Etape 1. Identification des mécanismes régulant l'expression de OSR1 dans les fibroblastes

Objectifs : Déterminer les mécanismes de régulation par lesquels OSR1 est impliqué dans la différenciation des iCAF.

Méthodes : Nous générerons *in vitro* des myCAF et iCAF à partir des modèles de différenciation issus des ASC52^{tel} et PSC traités par TGF β , IL1 ou mis en coculture direct ou transwell avec des lignées tumorales pancréatiques (Capan-1, Panc1). Les ASC52^{tel} seront utilisées en condition contrôle ou KO OSR1. Un scRNAseq nous permettra d'étudier les voies de signalisation impliquant OSR1 dans la différenciation de ces CAF, d'interroger les réseaux moléculaires impliqués dans les communications intercellulaires associés à l'expression de OSR1 (utilisation de Cellchat et NicheNet), identifier des gènes régulateurs candidats (SCENIC) et simuler quelles voies seraient affectées en cas de perturbation d'OSR1 (CellOracle). Ces analyses nous permettront de définir les facteurs de transcription co-exprimés avec OSR1 afin d'identifier les voies de signalisation activées et pouvant induire OSR1 dans les CAF.

Résultats attendus : Cette étape servira à identifier les mécanismes de régulation permettant l'induction de OSR1 dans les iCAF. L'identification des voies de signalisation induisant OSR1 nous permettra aussi de déterminer de futures cibles thérapeutiques pour restaurer l'expression de OSR1 dans les cancers du pancréas.

Etape 2. Validation de l'expression de OSR1 chez les patients avec un cancer du pancréas

Objectifs : Développer une mesure de OSR1 applicable en clinique et confirmer sa corrélation avec l'infiltrat immunitaire.

Méthodes : Nous étendrons l'analyse de OSR1 par RNAscope à l'ensemble de la cohorte du CHU de Besançon. En parallèle, sera testé sur ces mêmes patients des marquages de OSR1 par immunofluorescence et par immunohistochimie, à l'aide d'anticorps validés et en cours de production par notre équipe. Ces mesures seront corrélées aux données du RNAscope dans le but de i) valider l'expression protéique de OSR1 dans les cancers du pancréas et ii) développer une mesure de OSR1 fiable et reproductible en clinique. Ces analyses seront ensuite reproduites dans une cohorte de validation (Pancréas-CGE, NCT02818907). Nous évaluerons l'association entre l'expression de OSR1 et les survies sans récurrence et globale des cancers du pancréas. Nous évaluerons ensuite l'association entre l'expression de OSR1 et l'infiltrat immunitaire (CD3/CD8/CD20) et le phénotype des CAF (α SMA/FAP/LRRC15) caractérisés par immunohistochimie.

Résultats attendus : Cette étape vise à valider chez l'Homme la présence de OSR1 dans les cancers du pancréas avec le développement d'une mesure applicable en clinique et comme biomarqueur pronostique favorable et associé à un remaniement du microenvironnement tumoral.

Etape 3. Développement d'approches thérapeutiques induisant l'expression de OSR1

Objectifs : Identifier les composés biochimiques combinés à la chimio-immunothérapie favorisant l'expression de OSR1.

Méthodes : Nos résultats préliminaires suggèrent l'importance de la signalisation RXR et qu'un traitement par calcipotriol peut augmenter l'expression de OSR1. Nous utiliserons les modèles de différenciation de CAF à partir d'ASC52^{tel} et PSC comportant un promoteur de OSR1 permettant de rapporter (expression de la luciférase) l'expression de OSR1. Nous exposerons ces fibroblastes au calcipotriol ainsi qu'aux médiateurs candidats identifiés à l'étape 1. Un screening de chimiothèque sera également effectué à l'aide de molécules comprenant tous les composés approuvés par la FDA. Des expériences *in vivo* utilisant des modèles orthotopiques pancréatiques (KPC) seront réalisées. Ces souris seront traitées par chimio-immunothérapie (FOLFOX+anti-PD1) associé au calcipotriol ou autres composés identifiés. L'expression de OSR1 et la caractérisation du phénotype myCAF/iCAF seront mesurées par immunohistochimie et cytométrie afin de valider les combinaisons induisant OSR1 et la différenciation en iCAF. Nous disposons des échantillons de l'essai thérapeutique DOVIPA (NCT06757244), évaluant la chimio-immunothérapie + vitamine D3. Les biopsies tumorales réalisées avant et après deux mois de traitement nous permettront de caractériser le contexte immunitaire en fonction de l'infiltration des iCAF OSR1+.

Résultats attendus : Cette étape permettra d'évaluer les stratégies thérapeutiques combinant chimio-immunothérapie et vitamine D/calcioptriol visant à induire OSR1 dans les CAF afin de proposer de nouvelles approches pour reprogrammer le microenvironnement et améliorer l'efficacité des immunothérapies.

Résultats attendus et perspectives

Sur le plan scientifique, ce projet vise à approfondir les connaissances spécifiques portées sur le microenvironnement tumoral et les CAF, dans l'objectif d'augmenter l'efficacité des chimio-immunothérapies. L'identification de OSR1 en tant que facteur de transcription contribuant à la différenciation des iCAF soutiendra la sélection de biomarqueurs appropriés à l'étude du stroma dans les cancers du pancréas et permettra de développer de nouvelles méthodes d'analyse avec une application en clinique. Une deuxième perspective est le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'induire OSR1. En définitive, nous nous efforcerons d'intégrer les résultats de cette étude dans l'élaboration d'études interventionnelles reposant sur la reprogrammation du microenvironnement tumoral en faveur d'un stroma inflammatoire.

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

Financement Fondation ARC Pancréas : 400 000 euros

Connaissances et compétences requises

Champs d'application scientifique explorés dans le projet:

- influence des fibroblastes dans le micro-environnement tumoral
- immunologie des lymphocytes T et cellules myéloïdes
- étude des interactions entre fibroblastes et cellules myéloïdes
- régulation moléculaire des sous-population de fibroblastes

Expériences et techniques requises:

- culture cellulaire, tri cellulaire
- extraction RNA et RT-PCR
- cytométrie, Western Blot
- immunohistochimie, immunofluorescence
- expérimentations murines
- analyses bio-informatiques : Analyses de données bulk et single-cell RNA-Seq, Langages R, Bash/Python, Analyses d'enrichissement et deconvolution.

Résumé en français et anglais

Le cancer du pancréas est un enjeu de santé publique majeur. La présence de cellules fibroblastiques autour des cellules cancéreuses constitue une des caractéristiques principales conférant au cancer des propriétés de résistance à la chimiothérapie et à l'immunothérapie. Notre équipe travaille sur les voies de signalisation permettant le contrôle des interactions entre les cellules tumorales, les cellules immunitaires et les fibroblastes associés au cancer, composants principaux du microenvironnement tumoral. L'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires et sa régulation négative par les fibroblastes contribue à cette résistance aux traitements. Nous avons précédemment identifié une sous-population de fibroblastes favorisant les réponses immunitaires et la réponse aux traitements. Nous souhaitons identifier des mécanismes régulant la différenciation de cette sous-population de fibroblastes afin d'identifier des cibles thérapeutiques ainsi que des biomarqueurs applicables en clinique. Nous utiliserons des techniques de séquençage de l'ARN et d'immunohistochimie afin de caractériser les marqueurs spécifiques de cette sous-population, ainsi que leurs modulations. L'enjeu pour

les patients est d'utiliser les données de ce projet pour déterminer de nouvelles stratégies thérapeutiques de régulation du microenvironnement tumoral.

Pancreatic cancer is a major public health challenge. The presence of fibroblastic cells surrounding cancer cells is one of the main characteristics that confer resistance to chemotherapy and immunotherapy. Our team studies the signaling pathways that control interactions between tumor cells, immune cells, and cancer-associated fibroblasts, which are key components of the tumor microenvironment. Tumor infiltration by immune cells and its negative regulation by fibroblasts contribute to treatment resistance. We have previously identified a subpopulation of fibroblasts that promotes immune responses and enhances treatment efficacy. We aim to identify the mechanisms regulating the differentiation of this fibroblast subpopulation in order to uncover therapeutic targets and clinically applicable biomarkers. We will use RNA sequencing and immunohistochemistry techniques to characterize the specific markers of this subpopulation, as well as their modulation. The ultimate goal for patients is to use the findings from this project to define new therapeutic strategies for regulating the tumor microenvironment.

Domaine de compétence :

Biologie
Santé, médecine humaine

Mots clés :

Fibroblastes associés au cancer
OSR1
Réponses immunitaires
Reprogrammation du microenvironnement tumoral

