

Projet de Thèse SIMHEL

Titre : Impact des facteurs cytokiniques environnementaux sur la polarisation des cellules de Leucémie Lymphoïde Chronique

Laboratoire : Signalisation, microenvironnement et hémopathies lymphoïdes B (SIMHEL, U978 Inserm)

Direction : Christine Le Roy (christine.le-roy@inserm.fr)

Contexte scientifique :

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif touchant les lymphocytes B matures CD5⁺ CD19⁺ qui présentent un défaut de maturation terminale et qui répondent de manière différentielle selon les patients à la stimulation antigénique. Certains patients ont une forme indolente de la maladie qui n'affecte pas leur espérance de vie alors que d'autres montrent une progression clinique rapide accompagnée d'un déficit immunitaire important qui nécessite une prise en charge. Malgré des avancées thérapeutiques récentes utilisant des inhibiteurs des voies de signalisation du récepteur à l'antigène, la maladie reste incurable alors que des résistances apparaissent au cours de traitements prolongés.

Nos travaux ont montré que l'expansion clonale des lymphocytes B leucémiques s'accompagne dans la moelle et les ganglions lymphatiques d'une altération du microenvironnement tumoral. Un dialogue bi-directionnel entre les cellules tumorales et les cellules immunes environnantes participe à la perte de reconnaissance anti-tumorale, à une éducation du microenvironnement aux dépens des cellules saines et à un changement de profil fonctionnel des cellules leucémiques. Ainsi, une corrélation forte a pu être établie entre la progression de la maladie et le profil d'expression de plusieurs facteurs aux propriétés immunomodulatrices (« cellules régulatrices ») par les lymphocytes B. Ces facteurs régulateurs, dont l'IL10, le TGFβ1, le facteur de transcription FOXP3 et l'enzyme modulatrice indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), jouent un rôle important dans la suppression directe ou indirecte de la réponse inflammatoire et dans le maintien de la tolérance. Ces facteurs jouent également un rôle sur l'induction de cellules T régulatrices au détriment des cellules T effectrices ou cytotoxiques fonctionnelles. A partir d'échantillons frais de patients atteints de LLC, nous avons défini des populations lymphocytaires B leucémiques capables ou non de sécréter ces facteurs immunomodulateurs. Ces résultats montrent l'intérêt d'identifier les mécanismes moléculaires et l'influence des facteurs provenant du microenvironnement sur la modulation du profil régulateur des cellules leucémiques et de pouvoir éventuellement utiliser un blocage de cette polarisation comme cible thérapeutique afin de reconstituer une surveillance anti-tumorale.

Objectif du projet de doctorat :

L'objectif de ce projet de doctorat est d'identifier les acteurs moléculaires et les mécanismes mis en jeu par la cellule leucémique pour orienter son profil fonctionnel vers un phénotype immunorégulateur tout en bloquant le processus de maturation finale du lymphocyte B tumoral.

Afin d'identifier les voies de signalisation permettant cette polarisation des cellules leucémiques vers un profil régulateur en opposition à une réponse effectrice et de tester l'éventualité d'une réversion de ces mécanismes nous aurons plusieurs approches complémentaires :

- 1) Analyse qualitative et quantitative des facteurs environnementaux influençant l'expression des marqueurs de régulation (IL10, TGFβ1, FOXP3, IDO) dans les cellules leucémiques.
Nos expériences préliminaires montrent qu'une induction de l'expression de certains facteurs par l'IFNγ peut être réprimée en présence de TGFβ1. Des cellules primaires (PBMC) de patients seront analysées pour l'expression des cytokines et facteurs inducteurs au prélèvement et après culture in vitro par des techniques de cytométrie en flux multicolore (BD Symphony) et en multiplex pour une analyse des facteurs sécrétés. L'analyse quantitative portera sur des patients présentant une forme indolente ou progressive de la maladie.
- 2) Analyse des voies de signalisation conduisant à l'induction transcriptionnelle de l'expression de ces facteurs.

Nous avons déjà décrit un certain nombre de facteurs de transcription dont l'expression et l'activation permettent d'orienter la production de facteurs de prolifération et de différenciation ou à l'opposé de facteurs immunomodulateurs. Nous utiliserons pour ce faire des cellules primaires et des lignées leucémiques afin de définir les complexes régulateurs transcriptionnels impliqués dans l'expression de ces facteurs ; Nous avons d'ores et déjà établi les méthodes de biologie moléculaire et de transcriptomique (qPCR, EMSA, CHIP) nécessaires à ces expériences. Dans un premier temps, nous focaliserons notre étude sur les facteurs impliqués dans la régulation du TGF β 1, de l'IL10 et de IDO dont les facteurs : STATS, IRF, FOXP3, API et NFAT et de leur partenariat par une étude de promoteurs avec les techniques classiques

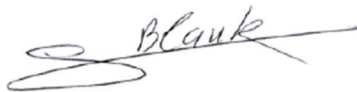
3) Analyse de l'inactivation de ces mécanismes sur la polarisation des cellules leucémiques

Nous effectuerons pour cela des analyses qualitatives et quantitatives des facteurs produits sur les cellules primaires après traitement avec des inhibiteurs de signalisation ou anticorps neutralisants déjà utilisés au laboratoire. Nous analyserons également la capacité des cellules leucémiques à inverser leur phénotype régulateur vers un profil de cellules effectrices et éventuellement induire un processus de maturation notamment par l'expression des enzymes responsables des mutations des gènes d'immunoglobulines (IGHV).

L'ensemble du projet bénéficie de notre lien privilégié avec le service d'hématologie de l'hôpital Avicenne et d'échantillons fraîchement prélevés auprès des patients suivis par le Pr V. Lévy après consentement éclairé (convention déjà en place). Dans ce cadre, nous avons également accès aux diverses données clinico-biologiques des patients. Ainsi, nous pourrions sur une cohorte de patients présentant des formes indolentes ou progressives de la maladie définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Projet vu et validé par la Directrice de Thèse
Christine Le Roy

et la Directrice du laboratoire
Nadine Varin-Blank



Références bibliographiques

1. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62.
2. Lotz M, Ranheim E, Kipps TJ. Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med*. 1994;179(3): 999-1004
3. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, and Antonia SJ. 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int. J. Cancer* 101: 151-155.
4. Lazarian G, Yin SY, Ten Hacken E, Sewastianik T, Uduman M, Font-Tello A, Gohil SH, Li SQ, Kim E, Joyal H, Billington L, Witten E, Zheng M, Huang T, Severgnini M, Lefebvre V, Rassenti LZ, Gutierrez C, Georgopoulos K, Ott CJ, Wang LL, Kipps TJ, Burger JA, Livak KJ, Neuberg DS, Baran-Marszak F, Cymbalista F, Carrasco RD, Wu CJ. A hotspot mutation in transcription factor IKZF3 drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation. *Cancer Cell*, 2021, {10.1016/j.ccell.2021.02.003}.
5. Mékinian A., Quinquenel A , Ait Belkacem K. , Kanoun F , Dondi E., Franckl E., Boubaya M., Mhibik M., Baran-Marszak F., Letestu R., Ajchenbaum-Cymbalista F., Lévy V., Varin-Blank N. and Le Roy C. Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression. *Cancer gene therapy*, 2023; <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00602-5>