

Projet de thèse

Titre : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'immuno-tolérance liée à la progression de la leucémie lymphoïde chronique

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

Direction : Nadine Varin-Blank (nadine.varin@inserm.fr)

Contexte scientifique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif présentant une forte hétérogénéité clinique de progression. Certaines lymphocytoses restent indolentes alors que d'autres sont rapidement progressives et sont accompagnées d'un important déficit immunitaire de la reconnaissance anti-tumorale. Ainsi, l'expansion clonale de lymphocytes B matures CD5⁺ CD19⁺ dans le sang s'accompagne dans la moelle et les ganglions lymphatiques d'une altération du microenvironnement tumoral dans des sites sanctuaires de prolifération leucémique. Ces mécanismes participent à l'échappement tumoral et malgré les 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. Ainsi, identifier les mécanismes et dialogues moléculaires altérés entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement conduisant à l'immunotolérance permettra d'envisager de nouveaux traitements de la maladie.

Nos travaux précédents ont montré que les cellules tumorales présentaient une expression faible de facteurs et cytokines pro-inflammatoires au profit d'une production de cytokines et de facteurs régulateurs jouant un rôle important dans la suppression directe ou indirecte de la réponse inflammatoire et dans le maintien de la tolérance, parmi lesquelles des cytokines immunosuppressives : l'IL10 et le TGFβ1. 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 solubles aux propriétés immunomodulatrices. De manière intéressante, l'expression de ces facteurs régulateurs par les cellules B tumorales a pu être corrélée à la progression de l'hémopathie sur deux cohortes de patients LLC. En utilisant des anticorps neutralisants ou des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation activées par ces facteurs, nous avons montré l'existence à la fois d'une boucle d'activation autocrine sur les cellules B et d'une induction de cellules T régulatrices au détriment des cellules T effectrices ou cytotoxiques fonctionnelles.

Nous avons également démontré l'expression par les cellules B-LLC du facteur de transcription FOXP3, caractéristique des cellules T régulatrices, et de l'enzyme modulatrice indoleamine 2,3-di-oxygénase (IDO), caractérisée dans certaines pathologies auto-immunes et catalysant la dégradation du tryptophane en kynurénine. Son expression est aussi associée à un état tolérogène des lymphocytes T. Nos expériences préliminaires montrent que l'expression d'IDO, induite par une stimulation inflammatoire par l'IFNγ et l'activation d'une voie STAT1/IRF1 peut être réprimée en présence de TGFβ1 et de l'activation sous-jacente des protéines Smad2/3. Ces résultats montrent l'intérêt de quantifier et définir les cinétiques et mécanismes d'expression de ces différents facteurs modulateurs afin de caractériser à la fois la transformation vers un phénotype régulateur des cellules leucémiques et leurs effets sur les cellules immunitaires de la surveillance anti-tumorale.

Objectifs du projet de Doctorat :

Afin d'appréhender de manière quantitative et fonctionnelle l'activation de voies de signalisation opposées dans l'expression de ces facteurs, nous aurons plusieurs approches complémentaires :

- 1) Analyse quantitative de l'effet paracrine et/ou autocrine des facteurs induisant l'expression des marqueurs de régulation (IL10, TGFβ1, FOXP3, IDO) dans les cellules leucémiques.

Nous conduirons pour cela des analyses quantitatives en multiplex des cytokines et facteurs sécrétés. Les cellules primaires de patients ou des lignées cellulaires établies seront analysées par des techniques de cytométrie en flux multicolores (BD Symphony) ou par analyse

biochimique après traitement avec différents inhibiteurs ou anticorps neutralisants déjà utilisés au laboratoire.

- 2) Analyse des mécanismes et partenariats conduisant à l'induction ou à la répression transcriptionnelle de l'expression de ces facteurs.

Nous avons déjà décrit une activation cellulaire consistant en deux vagues et conduisant à l'expression de facteurs de transcription eux-mêmes impliqués dans l'induction des immunomodulateurs. Nous poursuivons cette caractérisation des facteurs transcriptionnels (STATS, IRF, FOXP3) et de leur partenariat par une étude de promoteurs avec les techniques classiques de biologie moléculaire et de transcriptomique (qPCR, EMSA, CHIP). Ces méthodes sont déjà mises au point au laboratoire.


- 3) Analyse différentielle de l'expression de ces facteurs entre le sang périphérique et les sites sanctuaires ganglionnaires

Nous aborderons cette question par une analyse des mécanismes mis en jeu entre un environnement normoxique et un hypoxique qui miment respectivement ceux retrouvés dans le sang et les ganglions. Ces variations en oxygène ont été décrites dans d'autres systèmes tumoraux pour modifier l'expression de ces facteurs immunomodulateurs, ainsi que le métabolisme cellulaire, à la fois de la cellule leucémique et du microenvironnement.

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 les Prs Cymbalista et 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 une signature métabolique régulatrice indicative de la progression de la maladie et mieux comprendre les balances cellulaires régulant la clairance tumorale.

Ce projet devrait aussi permettre de définir de nouveaux marqueurs de stratification et de proposer une médecine spécialisée en fonction du profil immunitaire des patients.

Projet vu et validé par la directrice de Thèse et 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. Kessel A, Haj, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmune Rev*. 2012;11(9):670-7
3. 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
4. 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.