

Nom du laboratoire :

UMR978 INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » SIMHEL

Nom de la directrice de thèse et du co-directeur et leurs coordonnées :

Dr Nadine VARIN-BLANK, DR INSERM / Dr Denis LESAGE, MCF Université Sorbonne Paris Nord

UMR978, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY

Email : nadine.varin@inserm.fr; denis.lesage@univ-paris13.fr

Téléphone : **01 48 38 77 72 ; 01 48 30 88 58**

Titre : Rôle et régulation du facteur FOXP3 dans les sous-populations B au cours de la progression de la Leucémie Lymphoïde Chronique

Projet de thèse :

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie B fréquente chez l'adulte âgé qui se caractérise par une grande variabilité clinique en termes de progression et de récurrence de la maladie d'une part, et de sensibilité et de réponse aux traitements d'autre part. Les patients LLC présentent des manifestations cliniques allant d'une forme indolente à une forme progressive, associées ou non à des complications comme : des risques infectieux, des maladies auto-immunes et des cancers secondaires. Actuellement, seules les formes progressives nécessitent un traitement, associant ou non des chimiothérapies, immunothérapies et/ou des inhibiteurs d'effecteurs de voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules malignes. En revanche, ces traitements n'aboutissent que très rarement à une rémission totale de la maladie et sont souvent associés à l'émergence de sous-populations B leucémiques résistantes aux traitements. Dans ce contexte, nos travaux ont identifié plusieurs sous-populations lymphocytaires B de LLC qui, par leurs sécrétions cytokiniques et leurs actions régulatrices (inhibition du nombre de monocytes, des cellules CD8+ et Th1 et augmentation des cellules CD4+ Tregs) diminuent la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisent la progression de la maladie (Mékinian A *et al.*, soumis ; Mhibik M *et al.*, Brevet # EP18305700.9). La caractérisation phénotypique de ces sous-populations démontre l'expression différentielle de marqueurs de surface tels que le CD19 (cellules B), le CD27 (cellules B mémoires), le CD25 (cellules B activées) et le CD5 (cellules « B1a/b » régulatrices). L'étude fonctionnelle de ces mêmes cellules révèle qu'elles produisent différents facteurs solubles, dont l'Interleukine 10 (IL-10) et le facteur de croissance TGFβ1, décrits pour être des facteurs clés de l'immuno-modulation. Étonnamment, une des sous-populations de lymphocytes B pathologiques exprime le facteur de transcription FOXP3, qui joue un rôle déterminant dans les lymphocytes T régulateurs. Par ailleurs, chez des volontaires sains, FOXP3 est exprimé dans une sous-population de cellules B CD19⁺/CD5⁺ dotée d'une capacité d'apoptose spontanée plus importante que celle retrouvée dans la même sous-population négative pour FOXP3. Néanmoins, le rôle immunologique de FOXP3 reste énigmatique dans les cellules B normales ou leucémiques.

Les objectifs de ce projet de thèse consistent donc à déterminer le rôle immunologique de FOXP3 exprimé par la sous-population B de LLC, à caractériser les facteurs qui régulent l'expression de ce facteur et à identifier son impact fonctionnel sur le profil transcriptionnel des cellules B de LLC.

1) Les cellules B de LLC expriment de façon ectopique plusieurs protéines normalement retrouvées dans les lymphocytes T : CD5, CD25, Lck, Zap70, NFAT... et FOXP3. Ce dernier est crucial pour le développement et la fonction immunosuppressive des cellules T régulatrices. Par analogie avec ces dernières, nous analyserons l'impact fonctionnel de l'inhibition de FOXP3 par l'utilisation d'un peptide synthétique perméable, bloquant spécifiquement l'interaction de FOXP3 avec le facteur de transcription NFAT. Tout d'abord, nous vérifierons si la protéine FOXP3 exprimée par les lymphocytes B de LLC met en place un mode d'action similaire à celui utilisé par les Treg pour le maintien du phénotype « régulateur », en mesurant l'expression de l'IL-2 et des marqueurs CD25 et CTLA-4 par cytométrie en flux. Puis, nous évaluerons le rôle de FOXP3 dans la survie des cellules leucémiques en analysant à la fois le pourcentage de

cellules Annexine V / Iodure de Propidium par cytométrie en flux et, l'activité métabolique (MTS) des cellules B. Cette analyse fonctionnelle sera complétée par une mesure de la contribution de FOXP3 aux altérations de signalisation trouvées dans les cellules B de LLC en quantifiant l'activation/l'expression de différents effecteurs, de facteurs de transcription et de cytokines. Enfin, l'impact de l'expression de FOXP3 sur les capacités régulatrices des cellules B de LLC sera déterminé par leur co-culture avec des lymphocytes T conventionnels naïfs, des cellules NK (cytotoxiques ou régulateurs) ou des monocytes/NLC et en évaluant les proportions de ces types cellulaires par cytométrie en flux.

2) La différenciation et l'activation de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs sont initiées par une induction de la transcription de FOXP3 par le TCR et la stabilisation de l'expression du gène *Foxp3* par un mécanisme transcriptionnel d'autorégulation. Par similitude avec la physiologie des Treg, la modulation de l'expression de la transcription de FOXP3 dans les cellules B de LLC sera évaluée par une mesure de son taux d'ARNm par PCR quantitative et comparée aux taux protéiques (immunoblot) en réponse aux stimulations des voies du BCR, de l'IL-10 et du CD5 notamment. Pour identifier les déterminants de l'expression ectopique de la protéine FOXP3 dans les cellules B de LLC, nous utiliserons des approches a) de séquençage à haut débit (NGS methylation assay) sur les régions promotrices du gène *Foxp3* et b) de CHIP permettant de confirmer l'implication de facteurs de transcription associés tels que NFAT, STAT, NF-κB et SMAD. Le rôle activateur ou répresseur de l'activité immunorégulatrice de ces différents facteurs de transcription sera confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques (cf. §1). En collaboration avec l'équipe du Pr. V SOUMELIS, les effets antagonistes ou synergiques de ces facteurs de transcription seront déterminés par une analyse *in silico*.

3) Pour caractériser les hétérogénéités moléculaire et fonctionnelle liées à l'expression de la protéine FOXP3 chez les patients atteints de LLC, une approche transcriptomique (Plateforme de Cochin) sera utilisée en prenant des lymphocytes B leucémiques purifiés issus de 12 patients LLC, naïfs de traitement et cliniquement stables (MTS < à 25% et absence de marqueurs de progression) ou évolutifs (> 25% et présence de signes cliniques) (Service d'Hématologie Biologique de l'hôpital Avicenne ; Pr. F. Cymbalista, membre de UMR978). Après marquage extracellulaire (CD5, 19, 25 et 27) et intracellulaire (FOXP3), les cellules marquées seront triées pour leur positivité ou non au FT (FOXP3⁻ ou FOXP3⁺). Les résultats de cette approche méthodologique originale permettront de définir une signature transcriptomique différentielle liée à l'expression de FOXP3 dans des cellules de patients stables ou progressifs pour **a)** des protéines membranaires (CD), **b)** des co-facteurs transcriptionnels, modulateurs de l'expression de FOXP3 ou associés à celui-ci; **c)** des facteurs solubles produits. Une sélection des ARN les plus différentiellement exprimés entre les 2 sous-populations FOXP3⁺ et FOXP3⁻ sera validée par PCR quantitative. Par la suite, une corrélation entre les taux d'ARN et les protéines correspondantes sera établie notamment par l'approche technologique du RNA Flow. Ces résultats devraient définir **a)** une signature phénotypique de la sous-population B FOXP3⁺, **b)** un panel de co-facteurs expliquant le rôle de FOXP3 dans les réponses biologiques de cette sous-population et **c)** l'impact de cette sous-population FOXP3⁺ dans son dialogue direct ou indirect avec les autres cellules du micro-environnement par la production de leurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

L'ensemble de ce projet contribuera à une meilleure connaissance des propriétés de maintien et de survie des cellules de LLC dans le contexte immunitaire dérégulé observé chez les patients.