



## Offre de thèse

*(Financement en attente de réponse à un appel à projet)*

**Intitulé du projet :** Etude de l'implication de la voie cGAS/STING dans le façonnement de l'infiltrat immunitaire des cancers ovariens

**Acronyme du projet :** STINGOMET

**Période d'exécution :** octobre 2024 – septembre 2027

**Unité de recherche :** U1086 Inserm ANTICIPE

**Équipe de recherche :** Laboratoire BioTICLA – Médecine de précision des cancers de l'ovaire

**Adresse :** **Bâtiment Recherche - Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse**

**N° - Libellé de la voie :** **3 avenue général Harris - BP 45206**

**Code postal :** **14076**

**Commune :** **Caen cedex 5**

**École doctorale de rattachement :** Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Ed497 N BISE)

**Contact :** Steven Lohard, [steven.lohard@unicaen.fr](mailto:steven.lohard@unicaen.fr), +33 (0)2 31 45 52 29

5 mots-clés associés au projet : Cancers des ovaires, immunogénicité, voie cGAS/STING, ADN cytosolique, tumoroïdes.

La date limite pour l'envoi des candidatures est le 20 mai 2024. Les personnes sélectionnées pour un entretien seront contactées fin mai 2024.

## Contexte et Objectifs :

Les cancers de l'ovaire sont responsables de plus de 3 500 décès par an en France et représentent la deuxième cause de décès par cancer gynécologique ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Le traitement standard de ces cancers comprend une chirurgie de cytoréduction associée à une chimiothérapie à laquelle la réponse du patient est généralement positive. Ensuite, les inhibiteurs de PARP sont utilisés comme traitement d'entretien pour les patients présentant une réponse clinique à la chimiothérapie. Cependant, l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie à base de platine et aux inhibiteurs de PARP favorise la récurrence tumorale et réduit le taux de survie à 5 ans à moins de 40 % [1]. Le développement d'options thérapeutiques supplémentaires représente donc un enjeu majeur de santé publique. En ce sens, et compte tenu de la présence d'un infiltrat immunitaire dans les tumeurs ovariennes [2], les immunothérapies telles que les bloqueurs de point de contrôle immunitaire (ICB) apparaissent comme une alternative prometteuse. De plus, l'effet à long terme de ce type de thérapie observé dans d'autres tumeurs pourrait être adapté à l'aspect récurrent du cancer de l'ovaire.

Comme mentionné ci-dessus, environ la moitié des tumeurs ovariennes est infiltrée par des lymphocytes intraépithéliaux, ce qui est en corrélation avec une augmentation de la survie des patientes [2]. Des lymphocytes T spécifiques de la tumeur ont également été isolés chez plus de 75 % des patientes [3], et près de 60 % des tumeurs ovariennes de stade III et IV présentent une expression de PD-L1 (> 1 %) [4]. Ces observations suscitent beaucoup d'espoir, mais l'efficacité des immunothérapies dans les cancers de l'ovaire reste à ce jour décevante [5]. Le manque d'efficacité des ICB pour le traitement des cancers de l'ovaire peut s'expliquer par la présence simultanée d'un microenvironnement tumoral (TME) immunosuppresseur dans la plupart des tumeurs infiltrées par des lymphocytes T. En effet, la forte expression de la chimiokine CCL5 par les tumeurs ovariennes déclenche un recrutement massif de cellules myéloïdes immatures et de macrophages dont le phénotype est biaisé vers un profil anti-inflammatoire, notamment par une diminution de l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et 86 [6]. La production de molécules immunosuppressives (telles que le TGF- $\beta$  et la PGE2) et d'enzymes cataboliques (telles que l'arginase) par ces cellules contribuent également à maintenir une pression immunosuppressive, faisant ainsi taire l'activité des cellules cytotoxiques [6]. La production de certaines chimiokines piégeant les lymphocytes T en marge de la tumeur, la sécrétion de cytokines favorisant l'activité des lymphocytes T régulateurs et l'établissement d'une matrice extracellulaire dense sont autant de mécanismes qui réduisent également l'efficacité des effecteurs anti-tumoraux tels que les lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules NK [7]. Les cellules tumorales ovariennes échappent ainsi à la réponse immunitaire anti-tumorale du fait de leur action sur le TME, et se caractérisent donc par un faible taux de réponse aux ICB.

Compte tenu de l'instabilité génomique des cancers de l'ovaire, le projet se concentre sur la voie de détection de l'ADN cytosolique, modulateur de l'inflammation, cGAS/STING. En effet, l'instabilité génomique est bien documentée pour le cancer de l'ovaire dans lequel un déficit de recombinaison homologue (HRD) est observé dans 50 % des cas [8]. L'instabilité génomique étant liée à la formation de micronoyaux et à la fuite d'ADN du noyau vers le cytoplasme [9], une forte activation de la voie cGAS/STING dans les cellules cancéreuses de l'ovaire est attendue. L'activation de cette voie par l'ADN cytosolique conduit à la translocation nucléaire d'IRF-3 et de NF- $\kappa$ B qui sont respectivement responsables de la production d'interféron de type I (IFN I) et de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, CXCL9, CXCL10...) [10]. Ces médiateurs inflammatoires jouent un rôle majeur dans l'attraction et l'activation des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. La forte implication de cette voie dans l'efficacité des ICB, mise en évidence dans les modèles précliniques de cancer colorectal et de mélanome génétiquement instables [11, 12], rend contre-intuitif l'environnement immunosuppresseur des cancers de l'ovaire et leur faible réponse aux ICB. Par conséquent, pour expliquer ces observations inattendues, nous émettons l'hypothèse que

le cancer de l'ovaire pourrait échapper à la voie cGAS/STING au cours de la carcinogenèse, soit par perte de fonction, soit par reprogrammation.

Soutenant notre hypothèse, une étude a mis en évidence que la voie cGAS/STING était défectueuse dans certaines lignées de cellules cancéreuses ovariennes, probablement par extinction épigénétique des gènes des deux partenaires (13). Ces données reflètent l'échappement actif des cellules cancéreuses de l'ovaire à la signalisation cGAS/STING ce qui est également illustré par la surexpression de MYSM1 réduisant l'activation de la protéine STING, de TREG1 dégradant l'ADN cytosolique et d'ENPP1 limitant l'activation paracrine de STING due à la diffusion du cGAMP dans les cellules voisines [9]. D'un autre côté, il semble que les activations aiguës et chroniques de la voie cGAS/STING puissent avoir des conséquences diamétralement opposées sur la tumeur. En effet, il a été démontré que l'activation chronique de la voie cGAS/STING génère une immunosuppression via l'inhibition de la signalisation de l'IFN, l'activation de la voie non canonique NF- $\kappa$ B et l'expression de la chimiokine CCL2 [14]. De plus, une étude a montré que l'activation chronique de cGAS-STING augmente la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire via l'axe IL-6-STAT3 [15]. L'impact de l'activité cGAS/STING sur la biologie du cancer de l'ovaire n'est donc pas clair pour l'instant et doit être étudié en profondeur avant d'envisager une quelconque modulation de cette voie. En d'autres termes, nous devons comprendre si les cancers de l'ovaire, dans un processus d'adaptation à la présence continue d'ADN cytosolique, parviennent à bloquer ou à reprogrammer le sécrétome dépendant de STING afin de façonner un TME immunosuppresseur.

À notre connaissance, aucune donnée n'existe concernant l'état d'activation des voies cGAS/STING chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et ses conséquences sur l'efficacité de l'ICB. À l'aide d'échantillons provenant de cohortes de patientes et d'organoïdes tumoraux dérivés de patients (PDO), **ce projet émergent au sein du laboratoire** permettra d'étudier pour la première fois le rôle de la voie cGAS/STING dans la formation du microenvironnement immunitaire du cancer de l'ovaire. À cette fin, nous allons (i) évaluer l'activité de la voie cGAS/STING dans des échantillons de tumeurs ovariennes, (ii) caractériser l'infiltrat immunitaire de ces tumeurs et (iii) étudier comment la voie cGAS/STING façonne l'infiltrat immunitaire des cancers ovariens à l'aide de tests fonctionnels sur PDO et cellules immunitaires autologues.

- [1] B.M. Reid, *et al.* *Cancer Biology & Medicine* 14 (2017) 9.
- [2] W.-T. Hwang, *et al.* *Gynecol Oncol* 124 (2012) 192–198.
- [3] S. Bobisse, *et al.* *Nat Commun* 9 (2018) 1092.
- [4] K.N. Moore, *et al.* *J Clin Oncol* 39 (2021) 1842–1855.
- [5] U.A. Matulonis, *et al.* *Ann Oncol* 30 (2019) 1080–1087.
- [6] L.E. Kandalaft, *et al.* *Nat Rev Cancer* 22 (2022) 640–656.
- [7] M. Zhang, *et al.* *Cancers (Basel)* 14 (2022) 2637.
- [8] T. Popova, *et al.* *Cancer Res* 72 (2012) 5454–5462.
- [9] M.A.T.M. van Vugt, E.E. Parkes, *Trends Cancer* 8 (2022) 174–189.
- [10] S. Lohard, *et al.* *Nat Commun* 11 (2020) 259.
- [11] H. Wang, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (2017) 1637–1642.
- [12] L. Vornholz, *et al.* *Science Advances* 9 (2023)
- [13] N.M.G.P. de Queiroz, *et al.* *Mol Cancer Res* 17 (2019) 974–986.
- [14] S.F. Bakhoun, L.C. Cantley, *Cell* 174 (2018) 1347–1360.
- [15] C. Hong, *et al.* *Nature* 607 (2022) 366–373.

## Projet détaillé :

Ce projet, financé par la région Normandie (AAP émergent, 144 000 euros), bénéficiera d'un environnement translationnel apporté par l'unité Inserm U1086 ANTICIPE, le CLCC F. Baclesse et l'unité de service PLATON. Il s'appuiera sur une cohorte de 20 modèles de PDTO de cancer ovarien préalablement établis par la plateforme ORGAPRED (Université de Caen Normandie) grâce au protocole OVAREX (NCT03831230) qui permet d'obtenir, outre des PDTO, des échantillons de chirurgie de résection et des cellules mononucléées dérivées du sang (PBMC) issues de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire prises en charge au CLCC F. Baclesse. Des échantillons FFPE, de l'ADN, de l'ARN ainsi que les données cliniques des tumeurs correspondant à chaque PDTO ont également été stockés au centre de ressources biologiques « Ovaessource » (certification NF S 96-900). Toutes ces ressources seront utilisées dans le projet qui sera divisé en 3 tâches consacrées à i) l'évaluation de l'activité cGAS/STING dans nos modèles PDTO et leur tumeur primaire appariée, ii) la caractérisation de l'infiltrat immunitaire de ces mêmes tumeurs et iii) une analyse fonctionnelle de l'impact de l'activité cGAS/STING des PDTO sur l'activité de cellules immunitaires autologues.

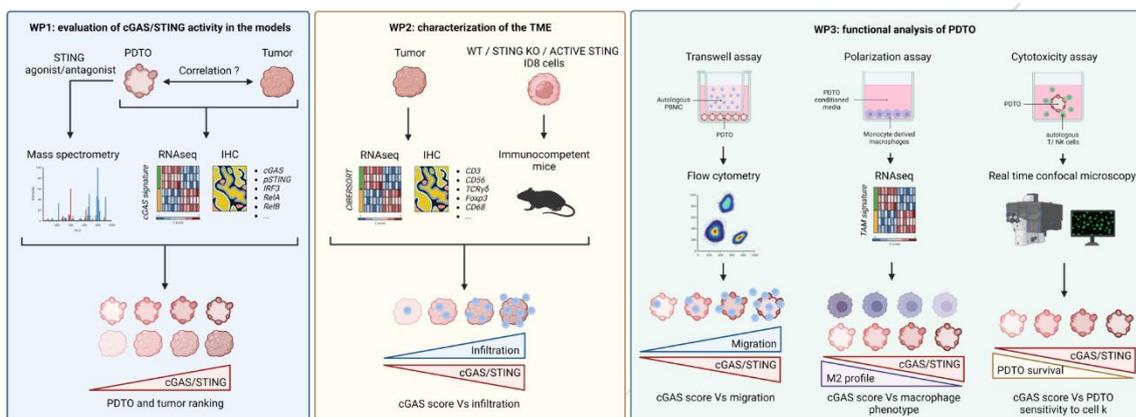


Figure 1 : schéma général du projet

**WP1 : Le premier WP sera dédié à l'évaluation de l'activité de la voie cGAS/STING dans les PDTO et leur tumeur d'origine.**

**Tâche 1 : Evaluation de l'activité de la voie cGAS/STING par IHC (réalisée partiellement par le doctorant).**

Un panel IHC multiplexé, d'ores-et-déjà mis au point, comprenant les principaux acteurs de la voie (tels que cGAS, IRF3, RelA et RelB) combiné à la cytokératine et à la coloration DAPI sera utilisé sur les PDTO pour évaluer l'état d'activation de leur voie cGAS/STING. Cette analyse sera également réalisée sur les tumeurs primaires pour évaluer une dérive potentielle et valider la pertinence du PDTO par rapport à la tumeur d'origine. Les IHC seront réalisées avec l'aide de la plateforme Virtual'His (Université de Caen Normandie) et les résultats analysés par le doctorant (avec l'aide du Dr Nicolas Elie, responsable scientifique de la plateforme Virtual'His).

**Tâche 2 : Evaluation de l'activité de la voie cGAS/STING via l'analyse du transcriptome (réalisée par le doctorant).**

Le doctorant effectuera une analyse des transcriptomes de la cohorte de PDTO et des tumeurs appariées, déjà disponibles au laboratoire, pour évaluer l'activité cGAS/STING à l'aide de signatures publiées [16]. Pour cela, le doctorant s'appuiera sur l'expertise de l'équipe en analyses bio-informatiques.

**Tâche 3 : Evaluation de l'activité de la voie cGAS/STING via l'analyse du protéome et d'un panel de métabolites (réalisée partiellement par le doctorant).**

Enfin, des analyses protéomiques et d'un panel de métabolites (avec l'aide respectivement des plateformes PROTEOGEN et PRISMM, Université de Caen Normandie) par spectrométrie de masse seront réalisées sur les PDTO, traités ou non avec des agoniste et antagoniste de STING, pour évaluer l'activation basale et la réactivité de la voie. Le doctorant aura en charge

le traitement des PDT0 et leur recueil après traitement pour l'analyse protéomique (quantification notamment des cytokines exprimées suite à l'activation de la voie cGAS/STING) ainsi que le recueil de leur surnageant pour l'analyse des métabolites (quantification notamment du cGAMP). La mise au point de ces analyses est en cours et sera terminée pour le début de la thèse.

Ces 3 approches complémentaires permettront une évaluation approfondie de l'activité cGAS/STING dans nos modèles et leur classement en fonction de l'activité de cette voie.

**WP2 : Le second WP consistera à caractériser l'infiltrat immunitaire des tumeurs ovariennes et à confronter ces résultats à l'état d'activation de la voie cGAS/STING évalué par le WP1.**

**Tâche 1 : Evaluation de l'infiltrat immunitaire par IHC (réalisée partiellement par le doctorant).**

Pour cela, un panel IHC multiplexé regroupant des marqueurs immunitaires (HLA-DR, CD20, CD8, Foxp3 et CD68) combiné à la cytokeratine et au DAPI a été mis au point à l'aide de la plateforme VirtualHis. Il sera attendu du doctorant une analyse des résultats (avec l'aide du Dr Nicolas Elie).

**Tâche 2 : Evaluation de l'infiltrat immunitaire par déconvolution des données de séquençage (réalisée par le doctorant).**

Les données de séquençage de l'ARN des tumeurs utilisées au cours du WP1 seront également utilisées pour exécuter des algorithmes de déconvolution (Cibersort, MCPcounter) afin d'estimer l'abondance relative des différentes populations immunitaires et compléter l'analyse IHC.

**Tâche 3 : analyse de l'infiltration immunitaire de modèles syngéniques de cancers ovariens murins présentant une modulation de l'expression ou de l'activité de STING (participation du doctorant).**

Nous modulerons l'expression de la protéine STING de cellules de cancers ovariens murins ID8 par invalidation du gène médié par la technique CRISPR-Cas9. A partir de ces cellules STING KO, nous établirons une lignée cellulaire exprimant de façon ectopique une protéine STING constitutivement active [12]. Après injection intrapéritonéale des cellules (WT, STING KO et STING actif) et croissance tumorale suivie par bioluminescence, nous recueillerons ces tumeurs et analyserons leur infiltrat immunitaire par IHC et cytométrie en flux. La participation du doctorant dans cette tâche aura, avant tout, une visée formatrice.

**Tâche 4 : analyse corrélative de l'infiltrat immunitaire avec l'état d'activation de la voie cGAS/STING (réalisée par le doctorant).**

Le doctorant mutualisera et interprétera les résultats des WP1 et 2 pour chaque tumeur à la lumière de son score cGAS/STING pour tester une corrélation potentielle entre l'activité cGAS/STING et l'infiltration de populations immunitaires spécifiques.

Malheureusement, ces analyses immunitaires ne seront pas possibles à partir de PDT0 car ces modèles ont perdu leur composante immunitaire lors des nombreux passages nécessaires à leur établissement. Néanmoins, un troisième WP sera exécuté pour combler cette lacune.

**WP3 : Le troisième WP consistera à étudier l'impact de l'activité de la voie cGAS/STING des PDT0 sur des cellules immunitaires autologues**

Pour cela, la plateforme ORGAPRED avec l'appui du laboratoire a mis en place des tests fonctionnels innovants utilisant les modèles de PDT0 et leurs cellules immunitaires autologues correspondantes. Les tâches du WP3 seront réalisées avec le soutien de la plateforme ORGAPRED sur une cohorte de 10 PDT0, 5 présentant une activité de la voie cGAS/STING forte et 5 une activité faible (données issues du WP1).

**Tâche 1 : évaluation de l'impact des PDT0 sur la migration des PBMC autologues (réalisée par le doctorant).**

Pour cela, le doctorant effectuera des tests en chambre de Boyden combinés à des analyses par cytométrie en flux pour évaluer la migration de chaque population immunitaire vers les PDT0. Le test de migration ainsi que le panel d'anticorps pour cytométrie en flux sont validés et déjà utilisés au laboratoire pour d'autres projets.

## Tâche 2 : évaluation de l'impact du sécrétôme des PDT0 sur le phénotype des macrophages (réalisée par le doctorant).

Le doctorant exposera les macrophages aux surnageants des PDT0 autologues. Ces macrophages seront ensuite analysés par séquençage d'ARN. Le phénotype de ces cellules sera ensuite évalué à l'aide des signatures disponibles de macrophages associés à la tumeur (Broad Institute).

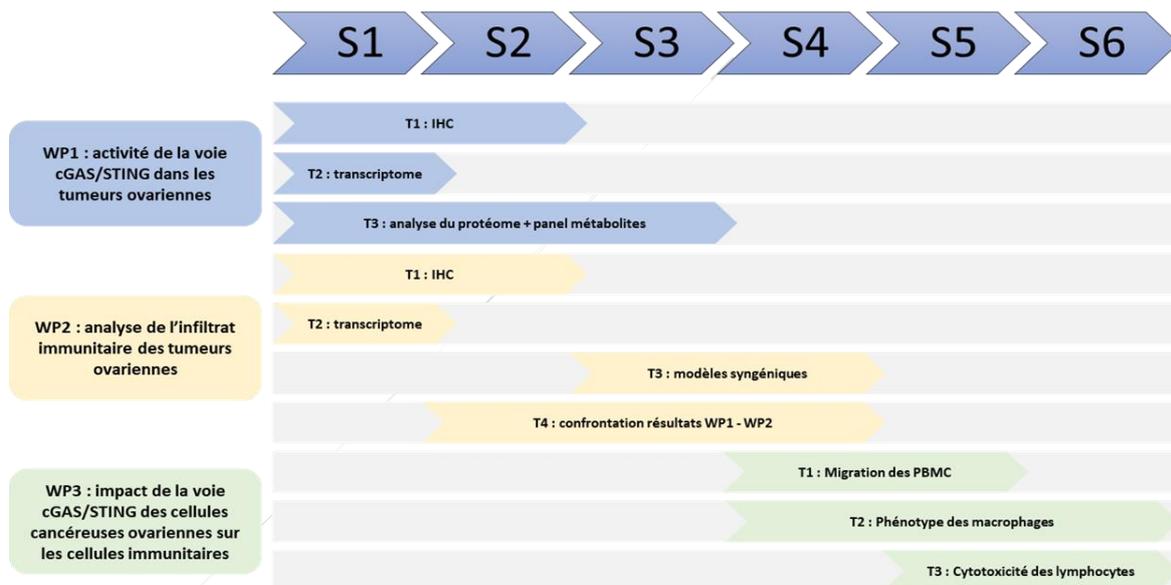
## Tâche 3 : évaluation de la sensibilité des PDT0 à l'action cytotoxique de lymphocytes autologues (réalisée par le doctorant).

Le doctorant aura pour mission de co-cultiver des PDT0 avec des cellules autologues T ou NK et d'évaluer leur viabilité après 3 jours de culture (analyse en point final par cytométrie en flux). Le nombre de cellules T ou NK nécessaire pour diminuer la viabilité du PDT0 de 50 % sera ensuite collecté et comparé entre les modèles.

Tous les tests du WP3 seront réalisés après **modulation de l'activité cGAS/STING à l'aide d'un agoniste ou antagoniste de STING** et interprétés à la lumière du score cGAS/STING de chaque modèle. Les données omiques des PDT0 (Transcriptome, protéome et métabolites) seront par ailleurs de nouveau analysées selon les résultats de ces tests fonctionnels pour tenter de comprendre leurs ressorts biologiques. En conclusion, ces tests *in vitro* apporteront des informations fonctionnelles et mécanistiques concernant les conséquences de l'activité cGAS/STING dans les cellules tumorales ovariennes sur la biologie des cellules immunitaires.

[16] H. Ishikawa, G.N. Barber, Nature 455 (2008) 674–678.

### Planning prévisionnel :



Le (ou la) candidat devra être titulaire d'un master en Biologie. Il devra être impliqué, curieux, et autonome. De plus, le (ou la) candidat devra être apte à travailler en équipe sur des projets pluridisciplinaires. Des notions sur la voie cGAS/STING et l'immunologie des cancers sont souhaitées. Sur le plan technique, le candidat devra avoir acquis une expérience dans la culture cellulaire, et les techniques classiques de biologie cellulaire et moléculaire (extraction acides nucléiques et protéines, RT-PCR quantitative, western blot, immunocytochimie ou histologie, cytométrie). Une expérience avec les approches d'édition du génome par CRISPR/Cas9 sera fortement appréciée.